

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA**



**“IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE PUDRICIÓN  
RADICULAR DE MANDARINA CLEOPATRA EN HUARAL,  
ALTERNATIVAS DE CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO”**

**Presentada por:**

**JULIO PATRICIO CHINO COLOMA**

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

**Lima – Perú**

**2023**

## Document Information

<b>Analyzed document</b>	TESIS_JULIO PATRICIO CHINO COLOMA.pdf (D146149001)
<b>Submitted</b>	10/11/2022 7:01:00 PM
<b>Submitted by</b>	Leonor Mattos Calderón
<b>Submitter email</b>	leomattos@lamolina.edu.pe
<b>Similarity</b>	4%
<b>Analysis address</b>	leomattos.unalm@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

### Universidad Nacional Agraria La Molina / TESIS PHYTOPHTHORA INFESTANS.BORRADOR Final. NUEVO TITULO.r.docx

<b>SA</b>	Document TESIS PHYTOPHTHORA INFESTANS.BORRADOR Final. NUEVO TITULO.r.docx (D145061815) Submitted by: leomattos@lamolina.edu.pe Receiver: leomattos.unalm@analysis.arkund.com		<b>17</b>
-----------	--	---	-----------

<b>W</b>	URL: <a href="https://www.pacal.org/n/Datos/documentos/PACAL%20CICLO%201806.pdf">https://www.pacal.org/n/Datos/documentos/PACAL%20CICLO%201806.pdf</a> Fetched: 10/3/2021 7:40:43 PM		<b>1</b>
----------	---	---	----------

<b>SA</b>	<b>ARTICULO (2) (Recuperado automáticamente) (1).docx</b> Document ARTICULO (2) (Recuperado automáticamente) (1).docx (D122160502)		<b>1</b>
-----------	---	---	----------

<b>SA</b>	<b>TFG phytophthora.pdf</b> Document TFG phytophthora.pdf (D139183771)		<b>1</b>
-----------	---	---	----------

## Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA  
 “IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE PUDRICIÓN RADICULAR DE MANDARINA CLEOPATRA EN HUARAL,  
 ALTERNATIVAS DE CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO” Presentada por: JULIO PATRICIO CHINO COLOMA TESIS PARA  
 OPTAR EL GRADO DE MAESTRO MAGISTER SCIENTIAE EN FITOPATOLOGÍA LIMA – PERÚ 2022  
 UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA  
 “IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE PUDRICIÓN RADICULAR DE MANDARINA CLEOPATRA EN HUARAL,  
 ALTERNATIVAS DE CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO” Presentada por: JULIO PATRICIO CHINO COLOMA TESIS PARA  
 OPTAR EL GRADO DE MAESTRO MAGISTER SCIENTIAE Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado: M.S. Andrés  
 Casas Díaz Dra. Leonor Mattos Calderón PRESIDENTE ASESOR Mg. Sc. Carlos Cadenas Giraldo Mg. Sc. Julián Chura  
 Chuquija MIEMBRO MIEMBRO  
 DEDICATORIA Dedico este trabajo a la memoria de mis padres Dionisio Chino Cusullaca y Susana Coloma Tito. Quienes  
 me brindaron su amor y su apoyo incondicional tanto en mi formación personal como profesional. A Dios, por haberme  
 acompañado y guiado, por ser la fuente de mi fortaleza, por darme sabiduría y por brindarme una vida llena de  
 aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad. A mi amada Marcelina Larico Chata, quien me motivó a estudiar la  
 maestría y a continuar escalando la senda de esta noble profesión.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA**

**“IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE PUDRICIÓN  
RADICULAR DE MANDARINA CLEOPATRA EN HUARAL,  
ALTERNATIVAS DE CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO”**

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

**Presentada por:**

**JULIO PATRICIO CHINO COLOMA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

**M. Sc. Andrés Casas Díaz  
PRESIDENTE**

**Dra. Leonor Mattos Calderón  
ASESOR**

**Mg.Sc. Carlos Cadenas Giraldo  
MIEMBRO**

**Mg.Sc. Julián Chura Chuquija  
MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a la memoria de mis padres Dionisio Chino Cusullaca y Susana Coloma Tito. Quienes me brindaron su amor y su apoyo incondicional tanto en mi formación personal como profesional.

A Dios, por haberme acompañado y guiado, por ser la fuente de mi fortaleza, por darme sabiduría y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi amada Marcelina Larico Chata, quien me motivó a estudiar la maestría y a continuar escalando la senda de esta noble profesión.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Departamento de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), por facilitarme los equipos y ambientes del laboratorio para el desarrollo de la investigación.

Al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), por brindarme las instalaciones y los equipos del laboratorio para los análisis moleculares.

A la empresa Silvestre Perú S.A.C. y Neoagrum S.A.C., por apoyarme con el financiamiento del trabajo de investigación.

A mi profesora y patrocinadora Dra. Leonor Mattos Calderón, quien me apoyó con su tiempo y sus valiosos consejos en la realización de este trabajo de investigación.

A los miembros del jurado Mg. Sc. Carlos Cadenas Giraldo, M. S. Andrés Casas Díaz y Mg. Sc. Julián Chura Chuquiya, por sus aportes en la mejora de esta investigación.

A mis amigos y compañeros de la maestría Guilmar Balabarca de la Cruz, José Soto Heredia, Juan José Oviedo Quirós y Joel Flores Ticona, por su apoyo y sus consejos durante el desarrollo de la investigación.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1	Los cítricos.....	3
2.1.1	Origen y usos.....	3
2.1.2	Taxonomía.....	3
2.1.3	Características morfológicas.....	4
2.1.4	Características del portainjerto mandarina Cleopatra.....	7
2.2	Características de la pudrición radicular en cítricos.....	8
2.2.1	Sintomatología.....	8
2.2.2	Epidemiología.....	8
2.3	Plaguicidas químicos utilizados en el control de la pudrición radicular.....	9
2.3.1	Metalaxyl.....	9
2.3.2	Fosfitos.....	10
2.3.3	Azoxystrobin.....	11
2.3.4	Extracto de Lauráceas.....	12
2.3.5	Ácido urónico.....	12
2.3.6	Nitrato de calcio.....	13
2.4	Productos biológicos utilizados para el control de la pudrición radicular.....	13
2.4.1	<i>Trichoderma harzianum</i> .....	13
2.4.2	<i>Bacillus subtilis</i> .....	15
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1	Ubicación del experimento.....	17
3.2	Recolección de muestras de campos de cultivo.....	17
3.3	Aislamiento y purificación de colonias.....	17
3.3.1	Preparación de medio selectivo CMA-PAR (PH).....	18
3.3.2	Obtención de aislamientos de muestras de raíces.....	18
3.3.3	Obtención de aislamientos de muestras de suelo.....	19
3.4	Identificación morfológica de los aislamientos.....	19
3.4.1	Caracterización de las estructuras asexuales.....	19
3.4.2	Caracterización de las estructuras sexuales.....	20
3.5	Relaciones de temperaturas en el crecimiento micelial.....	21
3.6	Prueba de patogenicidad.....	21

3.6.1	Material vegetal.....	21
3.6.2	Preparación del inóculo e inoculación.....	21
3.6.3	Reaislamiento.....	21
3.7	Identificación molecular.....	22
3.7.1	Extracción del ADN.....	22
3.7.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional.....	22
3.7.3	Secuenciamiento.....	24
3.7.4	Análisis bioinformático.....	24
3.8	Pruebas de control químico y biológico <i>in vitro</i> .....	25
3.8.1	Prueba de medio envenenado.....	26
3.8.2	Prueba de enfrentamiento.....	26
3.8.3	Evaluaciones.....	27
3.9	Pruebas de control químico y biológico en invernadero.....	27
3.9.1	Unidad experimental.....	27
3.9.2	Preparación del inóculo e inoculación.....	27
3.9.3	Tratamientos, dosis y momentos de aplicación de productos químicos y biológicos.....	29
3.9.4	Evaluaciones.....	31
3.10	Diseño experimental.....	32
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1	Aislamiento del agente causal de la enfermedad.....	33
4.2	Identificación morfológica de los aislamientos.....	34
4.2.1	Características morfométricas asexuales.....	34
4.2.2	Características morfométricas sexuales.....	43
4.3	Relaciones de temperaturas en el crecimiento micelial.....	44
4.4	Prueba de patogenicidad.....	45
4.5	Identificación molecular.....	47
4.5.1	Extracción y electroforesis de muestras de ADN.....	47
4.5.2	PCR convencional.....	48
4.5.3	Secuenciamiento y análisis filogenético.....	50
4.6	Pruebas de control químico y biológico <i>in vitro</i> .....	56
4.6.1	Prueba de control químico <i>in vitro</i> .....	56
4.6.2	Prueba de control biológico <i>in vitro</i> .....	63
4.7	Prueba de control químico y biológico en invernadero.....	65

4.7.1	Altura de planta.....	65
4.7.2	Peso fresco de la planta.....	69
4.7.3	Peso seco de la planta.....	72
4.7.4	Peso fresco de raíces.....	75
4.7.5	Peso seco de raíces.....	78
4.7.6	Severidad de la pudrición radicular.....	81
V.	CONCLUSIONES.....	91
VI.	RECOMENDACIONES.....	92
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
VIII.	ANEXOS.....	106

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de las regiones <i>cox II</i> e ITS.....	23
<b>Tabla 2:</b> Reactivos y cantidades en la preparación del Master Mix.....	23
<b>Tabla 3:</b> Condiciones de termociclado para la PCR de la región <i>cox II</i> . ....	24
<b>Tabla 4:</b> Condiciones de termociclado para la PCR de la región ITS. ....	24
<b>Tabla 5:</b> Tratamientos, productos comerciales y dosis, utilizados en la prueba de control químico de la pudrición radicular <i>in vitro</i> . ....	25
<b>Tabla 6:</b> Tratamientos, productos comerciales y dosis, utilizados en la prueba de control biológico de la pudrición radicular <i>in vitro</i> . ....	26
<b>Tabla 7:</b> Tratamientos, productos comerciales y dosis, utilizados en el control químico de la pudrición radicular en invernadero. ....	29
<b>Tabla 8:</b> Tratamientos, productos comerciales y dosis, utilizados para el control biológico de la pudrición radicular en invernadero. ....	30
<b>Tabla 9:</b> Momentos de aplicaciones de los productos químicos y biológicos.....	30
<b>Tabla 10:</b> Escala de evaluación de severidad de pudrición radicular.....	32
<b>Tabla 11:</b> Características morfométricas asexuales de los aislamientos de <i>Phytophthora</i> spp.....	38
<b>Tabla 12:</b> Características morfométricas asexuales del aislamiento JC2 con otras especies de <i>Phytophthora</i> que infectan cítricos. ....	39
<b>Tabla 13:</b> Características morfométricas sexuales de los aislamientos de <i>Phytophthora</i> spp.....	41
<b>Tabla 14:</b> Características morfométricas sexuales del aislamiento JC2 con otras especies de <i>Phytophthora</i> que infectan cítricos. ....	42
<b>Tabla 15:</b> Resultados de la prueba de patogenicidad de los aislamientos en estudio.....	46
<b>Tabla 16:</b> Cuantificación de los productos de PCR y cobertura de las secuencias de los aislamientos en estudio.....	51
<b>Tabla 17:</b> Identificación molecular de los aislamientos en estudio.....	52
<b>Tabla 18:</b> Análisis de variancia para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>P. nicotianae</i> en la prueba de control químico <i>in vitro</i> .....	59
<b>Tabla 19:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) en la prueba de control químico de <i>P. nicotianae in vitro</i> . ....	59
<b>Tabla 20:</b> Análisis de variancia para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>P. nicotianae</i> en la prueba de control biológico <i>in vitro</i> .....	64
<b>Tabla 21:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para la prueba de control biológico de <i>P. nicotianae in vitro</i> . ....	64

<b>Tabla 22:</b> Análisis de variancia para altura de planta (cm) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero. ....	66
<b>Tabla 23:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para altura de planta (cm) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	67
<b>Tabla 24:</b> Análisis de variancia para altura de planta (cm) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero. ....	68
<b>Tabla 25:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para altura de planta (cm) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	68
<b>Tabla 26:</b> Análisis de variancia para peso fresco de la planta (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	69
<b>Tabla 27:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso fresco de la planta (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	70
<b>Tabla 28:</b> Análisis de variancia para peso fresco de la planta (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	71
<b>Tabla 29:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso fresco de la planta (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	71
<b>Tabla 30:</b> Análisis de variancia para peso seco de la planta (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	73
<b>Tabla 31:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso seco de la planta (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	73
<b>Tabla 32:</b> Análisis de variancia para peso seco de la planta (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	74
<b>Tabla 33:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso seco de la planta (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	75
<b>Tabla 34:</b> Análisis de variancia para peso fresco de raíces (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero. ....	76
<b>Tabla 35:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso fresco de raíces (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	76
<b>Tabla 36:</b> Análisis de variancia para peso fresco de raíces (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	77
<b>Tabla 37:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso fresco de raíces (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	78
<b>Tabla 38:</b> Análisis de variancia para peso seco de raíces (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero. ....	79
<b>Tabla 39:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso seco de raíces (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	79

<b>Tabla 40:</b> Análisis de variancia para peso seco de raíces (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero. ....	80
<b>Tabla 41:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso seco de raíces (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	81
<b>Tabla 42:</b> Análisis de variancia para el porcentaje de severidad de la pudrición radicular en la prueba de control químico en invernadero. ....	82
<b>Tabla 43:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para el porcentaje de severidad de la pudrición radicular en la prueba de control químico en invernadero. ....	82
<b>Tabla 44:</b> Análisis de variancia para el porcentaje de severidad de la pudrición radicular en la prueba de control biológico en invernadero. ....	87
<b>Tabla 45:</b> Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para el porcentaje de severidad de la pudrición radicular en la prueba de control biológico en invernadero. ....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> A) Árbol de mandarino afectado por pudrición radicular. B) Raíces con síntomas de pudrición y descortezamiento. C) Siembra de raíces infectadas en medio CMA-PAR (PH). D) Colonia de crecimiento tipo aracnoide del patógeno. ....	34
<b>Figura 2:</b> A) Micelio cenocítico e hinchamientos hifales. B) Esporangio prominentemente papilado. C) Clamidospora. D) Anteridio anfígeno y oospora aplerótica. Bar = 10 $\mu\text{m}$ .....	37
<b>Figura 3:</b> Relaciones de temperatura en el ritmo de crecimiento de micelio (mm/día) de los aislamientos de <i>Phytophthora</i> en estudio, para la identificación a nivel de especie. ....	44
<b>Figura 4:</b> Prueba de patogenicidad. Síntomas: A) Planta sana-testigo (izquierdo) y planta enferma-inoculada (derecha), B) Raíces sanas, C) Raíces con pudrición radicular, D) Hojas sanas y E) Hojas maduras cloróticas con aclareo de nervadura central. ....	47
<b>Figura 5:</b> Bandas integras de ADN de los aislamientos revelados por electroforesis. Leyenda: A) Marcador de peso molecular de 1 kb, B) Muestra de ADN del aislamiento JC1, C) Muestra de ADN del aislamiento JC2, D) Muestra de ADN del aislamiento JC3, E) Muestra de ADN del aislamiento JC4, F) Muestra de ADN del aislamiento JC5, G) Muestra de ADN del aislamiento JC6, H) Muestra de ADN del aislamiento JC7, I) Muestra de ADN del aislamiento JC8 y J) Marcador de peso molecular de 1 kb. ....	48
<b>Figura 6:</b> Productos de amplificación por PCR de la región <i>cox II</i> con los cebadores FM58/FM66. Leyenda: A) Marcador de peso molecular de 100 pb, B) Control negativo, C) Muestra no amplificada del aislamiento JC1, D) Muestra del amplicón del aislamiento JC2, E) Muestra del amplicón del aislamiento JC3, F) Muestra del amplicón del aislamiento JC4, G) Muestra del amplicón del aislamiento JC5, H) Muestra del amplicón del aislamiento JC6, I) Muestra del amplicón del aislamiento JC7 y J) Muestra del amplicón del aislamiento JC8. ....	48
<b>Figura 7:</b> Evaluación complementaria de los productos de amplificación por PCR de la región <i>cox II</i> . Leyenda: A) Control negativo, B y C) Muestra del amplicón del aislamiento JC1, D y E) Muestra del amplicón del aislamiento JC7 y F) Marcador de peso molecular de 100 pb.....	49
<b>Figura 8:</b> Productos de amplificación por PCR de la región ITS con los cebadores ITS6/ITS4. Leyenda: A) Marcador de peso molecular de 100 pb, B) Control negativo, C) Muestra del amplicón JC1, D) Muestra del amplicón del aislamiento JC2, E) Muestra del amplicón del aislamiento JC3, F) Muestra del amplicón del aislamiento JC4, G) Muestra del amplicón del aislamiento JC5, H) Muestra del amplicón del aislamiento JC6, I) Muestra del amplicón del aislamiento JC7 y J) Muestra del amplicón del aislamiento JC8.....	50
<b>Figura 9:</b> Árbol filogenético de los aislamientos en estudio de <i>P. nicotianae</i> en base a la región <i>cox II</i> del ADNmt y su relación con otros, utilizando la inferencia bayesiana (Los aislamientos en estudio están resaltados en negrita). ....	54

<b>Figura 10:</b> Árbol filogenético de los aislamientos en estudio de <i>P. nicotianae</i> (Sin. <i>P. parasitica</i> ) en base a la región ITS del ADNr y su relación con otros, utilizando la inferencia bayesiana (Los aislamientos en estudio están resaltados en negrita). .....	55
<b>Figura 11:</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>P. nicotianae</i> en la prueba de control químico <i>in vitro</i> .....	60
<b>Figura 12:</b> Prueba de alimento envenenado en el control químico de <i>P. nicotianae</i> en medio AV8C <i>in vitro</i> . Leyenda: A) T1 (Testigo – <i>P. nicotianae</i> ), B) T2 (Metalaxyl), C) T6 (Fosetyl aluminio), D) T10 (Extracto de lauráceas), E) T9 (Ácidos urónicos), F) T5 (Fosfito de calcio), G) T3 (Fosfito de potasio), H) T4 (Fosfito de cobre), I) T8 (Azoxystrobin) y J) T7 (Nitrato de calcio). .....	62
<b>Figura 13:</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio de <i>P. nicotianae</i> en la prueba de control biológico <i>in vitro</i> .....	64
<b>Figura 14:</b> Prueba de enfrentamiento en el control biológico de <i>P. nicotianae</i> en medio AV8C <i>in vitro</i> . Leyenda: A) T2 ( <i>T. harzianum</i> T22), B) T3 ( <i>B. subtilis</i> AP-01) y C) T1 (Testigo – <i>P. nicotianae</i> ).....	65
<b>Figura 15:</b> Comparativo de promedios de altura de plantas (cm) en los tratamientos de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	67
<b>Figura 16:</b> Comparativo de promedios de altura de plantas (cm) en los tratamientos de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	69
<b>Figura 17:</b> Comparativo de promedios de peso fresco de plantas (g) en los tratamientos de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	70
<b>Figura 18:</b> Comparativo de promedios de peso fresco de plantas (g) en los tratamientos de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	72
<b>Figura 19:</b> Comparativo de promedios de peso seco de plantas (g) en los tratamientos de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	74
<b>Figura 20:</b> Comparativo de promedios de peso seco de plantas (g) en los tratamientos de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	75
<b>Figura 21:</b> Comparativo de promedios de peso fresco de raíces (g) en los tratamientos de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	77
<b>Figura 22:</b> Comparativo de promedios de peso fresco de raíces (g) en los tratamientos de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	78
<b>Figura 23:</b> Comparativo de promedios de peso seco de raíces (g) en los tratamientos de control químico de la pudrición radicular en invernadero.....	80
<b>Figura 24:</b> Comparativo de promedios de peso seco de raíces (g) en los tratamientos de control biológico de la pudrición radicular en invernadero.....	81
<b>Figura 25:</b> Comparativo de promedios de porcentajes de severidad de la pudrición radicular en los tratamientos de control químico en invernadero. ....	83

**Figura 26:** Evaluación de severidad de pudrición radicular a los 52 días después de la inoculación con *P. nicotianae* en la prueba de control químico en invernadero. Leyenda: A) T1 (Testigo no inoculado), B) T6 (Fosfito de calcio), C) T4 (Fosfito de potasio), D) T10 (Ácidos urónicos), E) T3 (Metalaxyl), F) T8 (Nitrato de calcio), G) T9 (Azoxystrobin), H) T5 (Fosfito de cobre), I) T7 (Fosetyl aluminio), J) T11 (Extracto de lauráceas) y K) T2 (Testigo inoculado). ..... 84

**Figura 27:** Comparativo de promedios de porcentajes de severidad de la pudrición radicular en los tratamientos de control biológico en invernadero. .... 88

**Figura 28:** Evaluación de severidad de pudrición radicular en la prueba de control biológico a los 52 días después de la inoculación con *P. nicotianae* en invernadero. Leyenda: A) T1 (Testigo no inoculado), B) T4 (*Bacillus subtilis* AP-01, C) T3 (*Trichoderma harzianum* T22) y D) T2 (Testigo inoculado). .... 89

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Medio de cultivo agar jugo V-8 modificado. ....	106
<b>Anexo 2:</b> Protocolo CTAB 2% para la extracción del ADN total. ....	107
<b>Anexo 3:</b> Evaluaciones morfológicas de las características asexuales del aislamiento JC2 de <i>Phytophthora</i> , para la identificación a nivel de especie. ....	109
<b>Anexo 4:</b> Evaluaciones de las características morfológicas sexuales del aislamiento JC2 de <i>Phytophthora</i> , para la identificación a nivel de especie. ....	111
<b>Anexo 5:</b> Relaciones de temperaturas en el ritmo de crecimiento micelial de los aislamientos de <i>Phytophthora</i> en estudio, para la identificación a nivel de especie. ....	112
<b>Anexo 6:</b> Datos meteorológicos registrados en la prueba de control químico y biológico en invernadero. ....	112
<b>Anexo 7:</b> Evaluación de la inhibición del crecimiento micelial (mm) de <i>Phytophthora nicotianae</i> en la prueba de control químico <i>in vitro</i> . ....	113
<b>Anexo 8:</b> Evaluación de la inhibición del crecimiento micelial (mm) de <i>Phytophthora nicotianae</i> en la prueba de control biológico <i>in vitro</i> . ....	114
<b>Anexo 9:</b> Evaluaciones de altura de plantas de mandarina Cleopatra (cm) en la prueba de control químico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	115
<b>Anexo 10:</b> Evaluaciones de peso fresco de plantas de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control químico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	116
<b>Anexo 11:</b> Evaluaciones de peso seco de plantas de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control químico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	117
<b>Anexo 12:</b> Evaluaciones de peso fresco de raíces de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control químico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	118
<b>Anexo 13:</b> Evaluaciones de peso seco de raíces de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control químico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	119
<b>Anexo 14:</b> Evaluaciones de severidad de la pudrición radicular de mandarina Cleopatra (%) en la prueba de control químico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	120
<b>Anexo 15:</b> Evaluaciones de altura de plantas de mandarina Cleopatra (cm) en la prueba de control biológico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	121
<b>Anexo 16:</b> Evaluaciones de peso fresco de plantas de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control biológico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	121
<b>Anexo 17:</b> Evaluaciones de peso seco de plantas de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control biológico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	122

<b>Anexo 18:</b> Evaluaciones de peso fresco de raíces de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control biológico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	122
<b>Anexo 19:</b> Evaluaciones de peso seco de raíces de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control químico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	123
<b>Anexo 20:</b> Evaluaciones de severidad de la pudrición radicular de mandarina Cleopatra (%) en la prueba de control biológico de <i>Phytophthora nicotianae</i> en invernadero. ....	123
<b>Anexo 21:</b> Secuencias de la región cox II de los aislamientos en estudio y de referencia (GenBank) de <i>Phytophthora nicotianae</i> utilizadas en el análisis bioinformático.....	124
<b>Anexo 22:</b> Secuencias de la región ITS de los aislamientos en estudio y de referencia (GenBank) de <i>Phytophthora nicotianae</i> utilizadas en el análisis bioinformático.....	130

## RESUMEN

En el Perú, Huaral destaca como la más importante y dinámica zona productora de cítricos del país, pero a menudo es afectado por enfermedades de pudrición radicular que reducen la producción. Por tal motivo, el objetivo de la investigación ha sido identificar la especie o las especies de oomicetos pertenecientes al género *Phytophthora* que afectan el sistema radicular y evaluar la eficacia del control químico y biológico. Se extrajeron muestras de raíces secundarias con síntomas de pudrición radicular y de suelo, de varios campos de cultivo de cítricos en Huaral. Los aislamientos y la purificación se realizaron en medio selectivo CMA-PAR (PH) para *Phytophthora*, obteniéndose ocho aislamientos. La prueba de patogenicidad resultó positiva para cinco aislamientos. La identificación de los aislamientos patogénicos fue mediante la caracterización morfométrica y molecular. En la caracterización morfométrica los aislamientos presentaron micelio cenocítico, esporangios (papilados, no caducos, generalmente ovoides, esféricos y muy pocos obpiriformes), clamidosporas (intercalares y terminales), heterotáticos, oogonios esféricos y lisos, anteridios anfígenos y oospora aplerótica; por consiguiente, según la clave de identificación de Erwin y Ribeiro (1996), correspondió a la especie *Phytophthora nicotianae*. La identificación molecular se realizó mediante la amplificación por PCR convencional de la región cox II del ADNmt e ITS del ADNr, utilizando los cebadores FM66 / FM58 e ITS6 / ITS4, respectivamente; confirmándose la identificación para la especie *Phytophthora nicotianae*. En la prueba de control químico *in vitro* los productos a base de metalaxyl, fosetyl aluminio y extracto de lauráceas fueron los mejores. En la prueba de control biológico *in vitro* el mejor resultado se obtuvo con *Trichoderma harzianum* T-22. En invernadero el mejor control químico se obtuvo con los productos fosfito de calcio, fosfito de potasio, ácidos urónicos y metalaxyl. En la prueba de control biológico el mejor resultado se obtuvo con *Bacillus subtilis* AP-01.

**Palabras clave:** Mandarina, Pudrición radicular, *Phytophthora nicotianae*, Fosfitos, PCR, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*.

## ABSTRACT

In Peru, Huaral stands out as the most important and dynamic citrus-producing area in the country, but it is often affected by root rot diseases that reduce production. For this reason, the objective of the research has been to identify the species or species of oomycetes belonging to the genus *Phytophthora* that affect the root system and evaluate the effectiveness of chemical and biological control. Secondary root samples with symptoms of root and soil rot were extracted from several citrus cultivation fields in Huaral. Isolations and purification were performed in CMA-PAR (PH) selective medium for *Phytophthora*, obtaining eight isolates. The pathogenicity test was positive for five isolates. The pathogenic isolates were identified by morphometric and molecular characterization. In the morphometric characterization, the isolates presented coenocytic mycelium, sporangia (papillate, not deciduous, generally ovoid, spherical and very few obpiriform), chlamydospores (intercalary and terminal), heterothallic, spherical and smooth oogonia, amphigenic antheridia and aplerotic oospore; therefore, according to the identification key of Erwin and Ribeiro (1996), it corresponded to the species *Phytophthora nicotianae*. Molecular identification was performed by conventional PCR amplification of the cox II region of mtDNA and ITS of rDNA, using primers FM66/FM58 and ITS6/ITS4, respectively; confirming the identification for the species *Phytophthora nicotianae*. In the *in vitro* chemical control test, the products based on metalaxyl, fosetyl aluminum and lauraceae extract were the best. In the *in vitro* biological control test, the best result was obtained with *Trichoderma harzianum* T-22. In the greenhouse, the best chemical control was obtained with the products calcium phosphite, potassium phosphite, uronic acids and metalaxyl. In the biological control test, the best result was obtained with *Bacillus subtilis* AP-01.

**Keywords:** Tangerine, Root rot, *Phytophthora nicotianae*, Phosphites, PCR, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*.

## I. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son una de las especies más cultivadas en todo el mundo. En muchos países productores como el Perú, es considerado la fruta de mayor importancia económica por los ingresos que se obtiene a través de la comercialización tanto en el mercado nacional como internacional. Según las cifras del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), durante la campaña del 2020, Perú logró exportar 268 mil toneladas de cítricos, encabezados por la mandarina con 200 mil toneladas, limones con 19 mil toneladas, naranja con 29 mil toneladas, tangelo con 18 mil toneladas y toronja con 2 mil toneladas; siendo Ica, Junín y Lima (Huaral) las principales regiones exportadoras de cítricos (El Peruano 2021).

Los cítricos son sensibles a varias especies de oomicetos pertenecientes al género *Phytophthora*, que causan las enfermedades conocidas como: gomosis (gummosis), podredumbre del cuello de la raíz y parte basal del tronco (foot and collar rot), podredumbre de las raíces absorbentes (feeder root rot) y “aguado” o podredumbre marrón de los frutos (Brown rot). Todas ellas repercuten muy directamente en la economía del cultivo (SEF 2000).

La gomosis de los cítricos puede ser causada por más de 12 especies de *Phytophthora* (*P. parasítica*, *P. citrophthora*, *P. citrícola*, *P. palmivora*, *P. cryptogea*, etc.), las cuales no responden de igual forma a las estrategias del control (Klotz 1978), lo que da mayor ventaja a *Phytophthora*.

Actualmente, la pudrición radicular de los cítricos causado por *Phytophthora spp.* es uno de los principales problemas de la citricultura en Huaral, que ocasiona pérdidas significativas en la producción y la calidad de la fruta, por lo que el manejo integrado se convierte en una herramienta tecnológica de trascendental importancia y por consiguiente el uso estratégico, racional y oportuno de las medidas de control químico y biológico.

Dada la importancia del cultivo y considerando la existencia de una escasa información, se planteó como objetivo general de la investigación, identificar el agente causal de la pudrición

radicular de la mandarina Cleopatra y posibles alternativas de control químico y biológico tanto *in vitro* como en invernadero. Y los objetivos específicos fueron:

- Aislar e identificar el agente causal de la pudrición radicular tanto morfológica como molecularmente a nivel de especie, existente en cultivos de cítricos injertados sobre el patrón mandarino Cleopatra en Huaral.
- Determinar la eficacia de control químico y biológico frente al patógeno causante de la pudrición radicular tanto *in vitro* como en invernadero.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 LOS CÍTRICOS

#### 2.1.1 Origen y usos

El origen de los agrios (comúnmente llamados cítricos) se localiza en Asia oriental, en una zona que abarca desde la vertiente meridional del Himalaya hasta China meridional, Indochina, Tailandia, Malasia e Indonesia. Actualmente su cultivo se desarrolla en casi todas las regiones tropicales y subtropicales comprendidas entre los paralelos 44° N y 41° S (Agusti 2003).

Los cítricos engloban un valioso grupo de planta cuya importancia comercial es enorme y sus frutos, muy ricos en vitamina C, se consumen en fresco y también industrializados en forma de zumos, gajos, jaleas y mermeladas, obteniéndose además subproductos para cosmética y medicina (Zaragoza *et al.* 2011).

El zumo de los cítricos es muy rico en vitamina C, con un contenido de ácido ascórbico entre 35 y 59 mg por 100 ml de zumo, albergando también pequeñas cantidades de vitaminas del grupo B (B6, tiamina, riboflavina, ácido pantoténico y niacina). También contiene minerales sobre todo potasio, calcio y fósforo y pectinas que al ser componentes de la fibra son capaces de estimular la motilidad del intestino (Zaragoza *et al.* 2011).

#### 2.1.2 Taxonomía

Los cítricos pertenecen al orden Geraniales, suborden Geraníneas, familia Rutaceae, subfamilia Aurantioideas y tribu Citreae, que comprende 3 subtribus. Una de ellas, la citrinae, abarca 13 géneros entre los que se encuentran los 3 principales que han dado origen a la citricultura comercial (*Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella*), llamados comúnmente los agrios (Zaragoza *et al.* 2011).

De los tres géneros, el *Citrus* agrupa a las naranjas y mandarinas comerciales, el *Fortunella* a los cítricos conocidos como kumquats o naranjita Kin-kan y el *Poncirus* agrupa a los

naranjos trifoliados (Olivera 1991). Las especies del género Citrus son las más importantes bajo el punto de vista agronómico (Agusti 2003).

### **2.1.3 Características morfológicas**

Los árboles cítricos son seres vivos en constante cambio. Su parte aérea, sus raíces y los tejidos vasculares que las unen, experimentan cambios anatómicos periódicos, de modo que crecen, envejecen y mueren. La función perdida a lo largo de estos procesos es acometida por nuevos tejidos que se añaden a los ya existentes. La constancia y regularidad en la formación de nuevos tejidos depende, en gran medida, de la latitud y altitud en las que crecen las plantas; así, en las áreas de clima templado la floración y fructificación tiene lugar anualmente, mientras que en las áreas tropicales estos procesos se suceden continuamente (Agusti 2003).

#### **a. Raíces**

La raíz de los agrios es sólida, blanca y bajo condiciones de cultivo, posee gran cantidad de pelos radiculares. En la zona madura de la raíz primaria, el número de arcos xilemáticos suele ser de ocho. Las raíces secundarias que surgen de ellas son de dos tipos: unas finas y fibrosas, que se unen formando una masa densa denominada barbada y otras largas y consistentes; el conjunto se caracteriza por explorar un gran volumen de suelo. En éstas el número de arcos xilemáticos ya queda reducido a cinco. Sus sucesivas ramificaciones forman, junto con la raíz primaria, el almacén del sistema radicular (Agusti 2003).

Las raíces principales, en número de dos a tres, sujetan sólidamente el árbol al suelo desarrollándose hasta una profundidad de 2 ó 3 metros. Las raíces secundarias se dividen en finas raíces que constituyen la barbada. El papel de estas es nutricional, ya que es a partir de esta barbada como el agua y los elementos minerales son absorbidos desde el suelo. Esta barbada se localiza en general en los primeros 50 cm del suelo, donde se encuentra las condiciones óptimas para su funcionamiento (Loussert 1992).

#### **b. Tallos**

En el tronco, al igual que en las ramas, anatómicamente observamos dos sectores opuestos. La parte interna, el leño o xilema, formado por el tejido conductor lignificado, conformado por tráqueas y traqueidas, por donde asciende el agua y las sales disueltas que las raíces toman del suelo. Hacia el exterior de la corteza, el floema, separado del xilema, por el cambium, tejido meristemático secundario que origina floema (parte principal de la corteza),

hacia afuera y leño hacia adentro. El cambium es responsable también del crecimiento en diámetro del tronco, ramas y raíces leñosas (Palacios 2005).

Las yemas axilares se hallan cubiertas por varios profilos (escamas) y se localizan en las axilas de las hojas. Al igual que las yemas apicales, situadas en el extremo de los tallos, constan de un meristemo rodeado de varios primordios foliares. En general, junto a una yema principal, más desarrollada, aparecen varias yemas accesorias, en la axila de una misma hoja. El conjunto lo completa una espina que se sitúa en posición opuesta al primer perfilo y recibe el nombre de nudo (Agusti 2003).

### **c. Hojas**

Todos los agrios son árboles con hojas perennes, lo que constituye un carácter de adaptación a inviernos poco rigurosos. Sólo el *Poncirus trifoliata* pierde sus hojas en invierno, lo que le permite resistir mejor las bajas temperaturas invernales; su utilización como portainjertos se recomienda, por tanto, en clima mediterráneo continental (Loussert 1992).

Las hojas de los agrios presentan una gran variedad de tamaños y formas, no solamente entre especies y variedades sino según su edad y la del árbol. En general los árboles jóvenes están provistos de hojas más largas y más anchas que los árboles adultos (Loussert 1992).

El limbo es oval u oblongo, de color verde oscuro en el haz y verde claro en el envés (Agusti 2003).

En algunas especies de *Citrus* las hojas están provistas de alas, más o menos desarrolladas, en su base, y a menudo están asociadas a una espina más o menos ulcerante (naranja amargo, pomelo, naranja dulce). Por el contrario, en otras especies estas alas se hallan ausentes y la espina está poco desarrollada (limonero, mandarino, clementino). El *Poncirus trifoliata* y sus híbridos los citranges están provistos de hojas compuestas por tres folíolos, lo que permite reconocerlos fácilmente en el vivero (Loussert 1992).

La epidermis del haz está formada por células parenquimáticas rectangulares, muy próximas entre sí, sin espacios entre ellas, y cubiertas por una fina lámina cuticular. La epidermis del envés también está formada por células semejantes a las de la epidermis del haz, pero en ésta los estomas se hallan intercalados (Agusti 2003).

La cantidad de estomas en el haz de la hoja es de 5 a 6 veces menor que las encontradas en el envés, donde abunda tejido parenquimático esponjoso y existe en la epidermis un mayor

número de estomas por centímetro cuadrado. Es aquí, en el envés de las hojas, donde la transpiración es óptima, pudiendo la planta eliminar agua al estado de vapor (Palacios 2005).

#### **d. Flores**

Las flores varían en tamaño según la especie, encontrándose flores pequeñas, medianas y grandes. Generalmente son de color blanco, pero en el caso específico de limoneros, presentan una coloración rosado-violáceo (Palacios 2005).

Las flores de los cítricos son normalmente hermafroditas, liberan polen cuando el estigma, ubicado en un plano inferior, está receptivo. La autopolinización puede ocurrir incluso antes de la anthesis (Talon 1997).

Las flores son producidas en racimos florales llamadas inflorescencias que desarrollan en la axila foliar en los brotes de desarrollo precedente. En la mayoría de los cítricos las flores son hermafroditas y producen polen viable, lo que les permite fructificar sin necesidad de que existan variedades polinizantes. Hay casos como el del naranjo Washington Navel y la mandarina Satsuma que tienen muy poco o nada de polen viable por lo que sus flores no necesitan ser polinizadas para que fructifique. Por otro lado, existen cítricos como la mandarina Clementina cuyas flores son autos incompatibles y requieren ser polinizadas por otro cultivar de mandarina o de tangelo para formar frutos. El tangelo Minneola produce más fruta cuando sus flores son polinizadas por la mandarina Dancy. En estos casos se justifica la inclusión de colmena de abejas para mejorar la producción (Mont 1998).

#### **e. Frutos**

El fruto de los cítricos es una baya denominada hesperidio. Surge como consecuencia del crecimiento del ovario y está formado por, aproximadamente, diez unidades carpelares unidas alrededor del eje floral por el que contactan entre sí, formando así lóculos en cuyo interior crecen las semillas y los sacos de zumo (Agusti 2003).

El pericarpio es la parte del fruto exterior a los lóculos y se divide en tres partes. El exocarpo o flavedo, que es la parte más externa del fruto. Está formado por una epidermis, cubierta por una cutícula, y unidas a ella varias capas de células que forman un parénquima compacto. El endocarpo, que es la parte más interna del pericarpio y constituye parte de la membrana locular. Está formado por una epidermis (la parte más interna en contacto con el lóculo) y varias capas de células que forman un parénquima compacto. Entre ambos se encuentra el

mesocarpo o albedo, formado por un tejido parenquimático de varias filas de células, con grandes espacios intercelulares, y de aspecto esponjoso. Cuando el fruto madura, la corteza puede separarse del endocarpo y está formada por el exocarpo y el mesocarpo. Es el primero el que adquiere la coloración de cada variedad (Agusti 2003).

La pulpa de la fruta de los cítricos está compuesta de sacos de jugo, los cuales están unidas a la pared externa de cada gajo. Las semillas están unidas a los bordes internos de las paredes de los gajos. El número de semillas producidas varían grandemente con el cultivar, y algunos cultivares no producen semilla (Mont 1998).

#### **2.1.4 Características del portainjerto mandarina Cleopatra**

La aparición de enfermedades graves en este cultivo ha sido el motivo que ha llevado a la búsqueda de patrones que hicieran posible su continuación. Fue en primer lugar la podredumbre de pie o gomosis, la que es causada por varias especies de *Phytophthora*, primero en la isla S. Miguel (Azores) en 1842, en 1845 en Portugal y ya después por todo el Mediterráneo. Todo ello hizo que se suspendiera el cultivo de éstos a partir de semillas y obligó al injerto de variedades sobre patrones tolerantes a esta enfermedad (Amorós 2003).

El patrón mandarino “Cleopatra” se adapta también a una amplia variedad de suelos que van desde arenas ligeras a arcillas pesadas, aunque los injertos realizados sobre ellos son más productivos cuando están en suelos más pesados. Es resistente a la alta salinidad, a los suelos calcáreos y tolerante al pH elevado (Davies y Albrigo 1999).

La mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) es moderadamente tolerante a *Phytophthora* del pie del tronco y poco tolerante a la pudrición de la raíz, porque los árboles dañados en las raíces rebrotan muy lentamente (Young *et al.* 1982).

La resistencia del mandarino Cleopatra a *Phytophthora sp.* es inferior que los citranges. Es tolerante a tristeza, exocortis y psoriasis (Soler y Soler 2006).

La resistencia a la gomosis de la *Phytophthora* no es absoluta, se han señalado numerosos casos de ataque a este patrón. De hecho, si el mandarino Cleopatra se utiliza en suelos ligeros o medianamente pesados (más permeables) es muy raramente atacado por la gomosis de la *Phytophthora*. Sin embargo, el problema de su resistencia a esta enfermedad le resta calidad (Loussert 1992).

## **2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA PUDRICIÓN RADICULAR EN CÍTRICOS**

### **2.2.1 Sintomatología**

La gomosis afecta principalmente la base del tronco (zonas próximas al injerto) pero puede presentarse también a lo largo del mismo. El principal síntoma es la abundante formación de goma de color oscuro o casi negro en la superficie de la corteza, mientras que los tejidos internos mueren sin afectar el leño (a veces éste es de color marrón debido a la infiltración de una delgadísima capa de goma). Las lesiones son variables en forma y tamaño, pero crecen más rápidamente en sentido vertical que lateralmente. Los tejidos corticales muertos se deshidratan gradualmente y en la parte afectada, la corteza aparece hundida y con fisuras, mientras que los tejidos adyacentes permanecen vivos, dando lugar a un típico cancro (SEF 2000).

Los árboles afectados y en estado avanzado de la enfermedad, presentan hojas decoloradas, nervaduras amarillentas, limbos pequeños, brotes de escaso desarrollo (en ocasiones defoliados) y frutos de pequeño tamaño. En árboles muy jóvenes pueden provocar rápidamente su muerte, en particular en los semilleros de los viveros (Agusti 2003).

*Phytophthora spp.* infecta el córtex de las raíces y causa un deterioro de las raíces fibrosas. El córtex se hace blando, se decolora y aparece húmedo. Las raíces fibrosas se desprenden de su córtex, dejando sólo el cilindro central (tejido vascular) que sobresale de los extremos de las raíces (APS 2002).

La infección del fruto por *Phytophthora spp.* produce una podredumbre parda. El área afectada es de color pardo ligero y correoso y no hundido comparada con la corteza adyacente. En condiciones húmedas se forma un micelio blanco en la superficie de la corteza del fruto (APS 2002).

### **2.2.2 Epidemiología**

*Phytophthora spp.* están normalmente presentes en las plantaciones de cítricos de todo el mundo. Así, en muchas situaciones, *Phytophthora spp.* son un problema endémico. Sin embargo, debido a que son policíclicos en las raíces dentro de una estación, en un año dado pueden aparecer epidemias. Las poblaciones de hongos en el suelo se mantienen por infección repetida de las raíces fibrosas. En condiciones favorables de alto grado de humedad y temperatura, el hongo produce esporangios que liberan zoosporas móviles, que son atraídas a la zona de alargamiento de nuevas raíces por nutrientes que son naturalmente exudados de

esta zona radicular. En contacto con la raíz, las zoosporas se enquistan, germinan y después infectan el área de la zona de alargamiento. Una vez que el hongo ha penetrado en la punta de la raíz, la infección puede avanzar en el córtex, produciendo la podredumbre de toda la raíz. El ciclo se puede repetir mientras las condiciones sean favorables y se disponga de tejido susceptible (APS 2002).

*Phytophthora spp.* sobreviven más probablemente a los períodos desfavorables en los desechos de las raíces. El córtex podrido se desprende y el hongo produce clamidosporas, que pueden persistir en el suelo durante largos períodos de tiempo. Cuando vuelven las condiciones favorables, las clamidosporas germinan indirectamente produciendo esporangios y zoosporas, o directamente produciendo micelio (APS 2002).

El aumento de inóculo de *Phytophthora* se debe a la rápida producción de esporangios y zoosporas a partir de tejidos vegetales infectados, los cuales se ven favorecidos por la alta presencia de agua en los árboles (Erwin y Ribeiro 1996).

Las especies de *Phytophthora* gozan de buena adaptación a un rango amplio de temperaturas, que van desde 4-6° C hasta 32-33° C, por lo que, en las zonas tropicales, subtropicales y templadas, son patógenos importantes. Su presencia en el suelo es permanente y la mayor actividad parasitaria se produce cuando la temperatura media del ambiente oscila entre 18 y 24° C (SEF 2000).

## **2.3 PLAGUICIDAS QUÍMICOS UTILIZADOS EN EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN RADICULAR**

### **2.3.1 Metalaxyl**

El metalaxyl es uno de los mejores fungicidas sistémicos que se utilizan para controlar a los oomicetos. Es persistente y se utiliza ampliamente para el tratamiento de suelos y semillas para controlar el ahogamiento de las plántulas y la pudrición de las semillas causados por los hongos *Pythium* y *Phytophthora* y como tratamiento del suelo para controlar los canchales y las pudriciones del tallo de plantas anuales y perennes causados por *Phytophthora*, así como ciertos mildiús (como el mildiú del tabaco) (Agrios 2002).

Metalaxyl tiene un efecto supresor específico sobre el ARN ribosomal (RNAr) (Davidse 1987; Davidse *et al.* 1983). Davidse (1987) explica que la inhibición de la síntesis de RNAr conduce finalmente a la inhibición del crecimiento fúngico, porque la reducción del RNAr priva a la célula de los ribosomas que regulan la síntesis de proteínas. Por lo tanto, el

metalaxyl no suele inhibir la germinación de esporangios o zoosporas enquistadas con tanta eficacia como el crecimiento micelial, porque las esporas intactas aparentemente tienen suficientes ribosomas para que se formen los tubos germinativos; sin embargo, cuando los tubos germinativos de *Phytophthora* penetran en la hoja, el micelio absorbe el metalaxyl que ha sido trasladado al follaje tratado. El metalaxyl provoca entonces una malformación y el cese del crecimiento del micelio infectante (Erwin y Ribeiro 1996).

El metalaxyl puede ser aplicado al suelo a la dosis de 0,2 g de m.a./litro en el agua de riego. Asegura a la vez una buena protección del sistema radicular, y su absorción (producto sistémico) permite curar los chancros desarrollados en el tronco y ramas principales. También puede ser utilizado localizado en el tronco a razón de 60 g de m.a./litro (Loussert 1992).

El metalaxyl es muy eficaz para el control de infección por *Phytophthora* en cítricos y es mejor aplicado como pintura de tronco o en drench al suelo (Timmer y Castle 1985).

### **2.3.2 Fosfitos**

Los fosfitos son oxianiones derivados del ácido fosforoso ( $H_3PO_3^-$ ), que regularmente se combinan con cationes no metales como potasio, sodio, calcio o amonio. Los términos fosfito y fosfonato son comúnmente utilizados en la literatura para referirse a las sales derivadas del ácido fosforoso, al igual que hidrógenofosfanatos, ortofosfitos, compuestos del ácido fosfónico o compuestos del ácido fosforoso (Deliopoulos *et al.* 2010).

El fosetyl Al, más conocido con el nombre comercial de Aliette (80 por ciento de m.a.), se utiliza principalmente en pulverización sobre las hojas. Es también un producto sistémico (absorbido por las hojas y transportado por la savia descendente: savia elaborada). Se reparte progresivamente por las ramas principales, el tronco y las raíces protegiéndolas de los ataques, cualquiera sea el portainjerto utilizado. De hecho, este producto no es directamente activo contra *Phytophthora*, sin embargo, después de su penetración y circulación en la planta, permite a la variedad sensible comportarse como una variedad resistente y asegura indirectamente una excelente protección (Loussert 1992).

Hay reportes que apoyan un efecto directo del ión fosfonato sobre patógenos y otros que indican que su principal modo de acción es a través de la activación de los mecanismos de defensa de las plantas (Afek and Stzejnberg 1989; Dercks and Buchenauer 1987; Smillie *et al.* 2000).

Alguna evidencia sugiere que el fosfito induce un estrés por inanición del fosfato en el patógeno, provocando la liberación de metabolitos del estrés que elicitán respuestas de defensa más vigorosas en la planta hospedante (Perez *et al.* 1995; Smith *et al.* 1997, McDonald *et al.* 2001). El reconocimiento de *Phytophthora spp.* por la planta hospedante, desencadena una cascada de señalización que coordina las respuestas de defensa, lo que lleva a la activación de la vía fenilpropanoide (Dixon *et al.* 2002). Esta vía sintetiza una variedad de estructuras polifenólicas, como la lignina, así como otros compuestos de defensa de las plantas llamados fitoalexinas. La fenilalanina amonio liasa (PAL) responsable de la deaminación de L-fenilalanina en ácido cinámico, es una enzima clave en esta vía (Cahill y McComb 1992).

Las fitoalexinas se sintetizan en las células sanas adyacentes a las células dañadas y se acumulan tanto en tejidos necróticos resistentes, como susceptibles, es decir, se producen restringidamente en un sitio alrededor del lugar de infección. La resistencia ocurre cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno (Agrios 1996). Se ha descrito que antes de una infección, se encuentran en una concentración casi detectable. Después de una infección son sintetizadas rápidamente, casi en horas después del ataque del patógeno y son tóxicas para un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas (Taiz y Zeiger 1991).

### **2.3.3 Azoxystrobin**

El azoxystrobin (QoI – Inhibidores externos de la Quinona) es un fungicida sistémico que inhibe la respiración celular al unirse a las subunidades de proteínas en el complejo del citocromo bc1 mitocondrial (Jordan *et al.* 1999; Fisher y Meunie, 2008).

Las estrobilurinas tienen un modo de acción común, es decir, todas interfieren con la respiración, es decir, la producción de energía, en la célula fúngica. Lo hacen bloqueando la transferencia de electrones en el sitio de oxidación del quinol (el sitio Qo) en el complejo citocromo bc1, evitando así la formación de ATP. Las estrobilurinas, por lo tanto, son fungicidas específicos del sitio y, como tales, están sujetas a la selección de strains de hongos resistentes a fungicidas y al desarrollo de poblaciones de patógenos resistentes a fungicidas del grupo de las estrobilurinas (Agrios 2005).

Todas las estrobilurinas son absorbidas por las hojas tratadas y otras partes de la planta y al principio se mantienen sobre o dentro de la cutícula cerosa de las superficies de las plantas. Posteriormente, parte del ingrediente activo se mueve hacia las células vegetales subyacentes

y puede llegar y acumularse nuevamente en la cutícula del otro lado de las hojas. Las estrobilurinas, por lo tanto, se mueven translaminarmente dentro de las hojas. Además, algunas estrobilurinas como azoxystrobin, se mueven translaminar y sistémicamente a través del sistema vascular de la planta. Algunos fungicidas de estrobilurina muestran efectos promotores del crecimiento en las plantas tratadas, aparentemente retrasando la senescencia de las hojas y teniendo efectos de conservación hídrica (Agrios 2005).

#### **2.3.4 Extracto de Lauráceas**

Xilotrom es fungicida de origen orgánico enriquecido con metabolitos procedentes de microorganismos benéficos (enzimas y toxinas con capacidad antifúngica) y extractos de plantas (alcaloides) de la familia de los terpenos (áster de monoterpene) que se encuentra en el aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), laurel (*Laurus nobilis*), árbol del té (*Malaleuca* sp.), entre otras especies, con distintos efectos beneficiosos para las plantas y perjudiciales para hongos fitopatógenos foliares y de suelo (Neoagrum 2018).

Xilotrom es fungicida orgánico preventivo, curativo que actúa por contacto contra hongos fitopatógenos, mediante su acción enzimática ocasiona un incremento de la permeabilidad de la pared celular, destrucción y pérdida de citoplasma, inhibe la respiración y el proceso de transporte de iones por lisis celular; los alcaloides del formulado proporcionan defensa frente a patógenos, inhibiendo el acceso a las plantas, dañando la germinación de esporas, interrumpiendo el crecimiento de micelio, mitosis y división celular (Neoagrum 2018).

Xilotrom es un fungicida que reduce el desarrollo de resistencia a los fungicidas químicos con riesgo de pérdida de sensibilidad a patógenos fitoparásitos. La degradación de los metabolitos secundarios (alcaloides) induce un efecto fortificante en el cultivo mediante la activación de los sistemas de defensa propios de la planta, sintetizando y acumulando niveles elevados de proteínas especializadas y otros compuestos fenólicos para inhibir factores bióticos (plagas, enfermedades, etc.) y abióticos (temperatura, agua, sequía, etc.), sin afectar negativamente al metabolismo de la planta (Neoagrum 2018).

#### **2.3.5 Ácido urónico**

Lichthor es un fungicida biológico a base de extracto de caña (*Saccharum officinarum*), cuyo ingrediente activo son los ácidos urónicos, obtenidos a partir de bioprocesos controlados de fermentación microbiana (Biogen 2019).

Los ácidos urónicos desencadenan la muerte celular en los hongos fitopatógenos mediante un proceso llamado autólisis. Esto se debe a que los ácidos urónicos atraviesan la membrana celular y en el citoplasma del patógeno desencadenan, como principal acción fungicida, la inducción de enzimas fúngicas endógenas (poligalacturonasas y pécticas), las cuales participan en la degradación de la pared celular y membranas, ocasionando un proceso autocatalítico, que da inicio a la autólisis o muerte del hongo (Biogen 2019).

### **2.3.6 Nitrato de calcio**

El calcio es un elemento esencial, que influye en el crecimiento y la fructificación de las plantas. Los iones de calcio preservan la integridad estructural y funcionalidad de las membranas y la pared celular, aumentan la resistencia del hospedante a la invasión de ciertos microorganismos patógenos y mejorar la tolerancia a las enfermedades abióticas (Yuen 1993).

El calcio se acumula en la pared celular, dándole estabilidad e integridad y afecta fuertemente las actividades pectinolíticas (Wisniewski *et al.* 1995, Biggs *et al.* 1997) y reproductivas de los patógenos (Conway *et al.* 1992).

Las enmiendas de  $\text{Ca}^{2+}$  interfieren con la biología de las zoosporas de *Phytophthora parasitica* en múltiples etapas, con efectos agravantes en la epidemiología y sugieren que la manipulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el agua de riego o en soluciones fertilizantes podría contribuir al manejo de *Phytophthora* en sistemas de riego por recirculación (von Broembsen y Deacon 1997).

## **2.4 PRODUCTOS BIOLÓGICOS UTILIZADOS PARA EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN RADICULAR**

### **2.4.1 *Trichoderma harzianum***

El género *Trichoderma* es conocido como un agente de control biológico y puede suprimir enfermedades a través de varios mecanismos que incluyen antibiosis, competencia, micoparasitismo, actividad enzimática y defensa inducida de las plantas (Papavizas y Lumsden 1980, Howell 2003).

La antibiosis ocurre durante interacciones que involucran compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por strains de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. La mayoría de strains de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización por microorganismos

antagonizados; entre estos metabolitos, se han descrito la producción de ácido harziánico, alameticinas, tricolina, peptaiboles, antibióticos, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisopreninas, ácido heptelídico y otros (Vey *et al.* 2001).

Se ha propuesto que el micoparasitismo es la maquinaria incompatible más eficaz y muy importante que presentan diferentes *Trichoderma* spp. (Kubicek *et al.* 2001). Después del reconocimiento del hospedante, ocurren diferentes eventos con *Trichoderma* como enrollar alrededor de las hifas y entrar en la pared celular por la acción de las enzimas digestivas de la pared celular (Viterbo *et al.* 2002). Las enzimas digestivas de la pared celular producidas por los micoparásitos les permiten hacer agujeros en su respectivo hospedante y consumir nutrientes para su propio desarrollo. La quitina es un componente estructural importante que tiene material  $\beta$ -1,3 glucano dispuesto regularmente en la pared celular de la mayoría de los hongos fitopatógenos. Dos enzimas, quitinasas y  $\beta$ -1,3 glucanasas, juegan un papel significativo en la interacción competitiva del micoparasitismo entre *Trichoderma* spp. y sus respectivos hospedantes (Kubicek *et al.* 2001).

El micelio y las esporas de resistencia (oosporas, esclerocios) de varios hongos fitopatógenos del suelo como *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* y *Sclerotium*, son invadidos y parasitados (micoparasitismo) o bien lisados (micólisis) por otros hongos, que por regla general no son fitopatógenos. Entre los hongos micoparásitos más comunes destacan *Trichoderma* sp., principalmente *T. harzianum*, que se ha demostrado parasita el micelio de *Rhizoctonia* y *Sclerotium*, inhibe el crecimiento de muchos otros hongos, como *Pythium*, *Fusarium* y *Fomes*, y reduce la magnitud de las enfermedades causadas por la mayoría de esos patógenos (Agrios 2002).

La combinación de enzimas hidrolíticas y antibióticos da como resultado un mayor nivel de antagonismo que el obtenido por cualquiera de los mecanismos por sí solo (Howell 1998, Monte 2001).

Las asociaciones de raíces y hongos también estimulan los mecanismos defensivos de las plantas. Los strains de *Trichoderma* añadidas a la rizósfera protegen a las plantas contra numerosas clases de patógenos, por ejemplo, los que producen infecciones aéreas, incluidos patógenos virales, bacterianos y fúngicos, lo que apuntan a la inducción de mecanismos de resistencia similares a la respuesta de hipersensibilidad (HR), la resistencia sistémica adquirida (SAR), y la resistencia sistémica inducida (SIR) en plantas (Harman *et al.* 2004). A nivel molecular, la resistencia se traduce en un incremento en la concentración de

metabolitos y enzimas relacionados con mecanismos defensivos, tales como las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS), involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas (respuesta de HR), quitinasas y glucanasas. Estos comprenden proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (respuesta SAR) y enzimas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo (Stacey y Keen 1999).

#### **2.4.2 *Bacillus subtilis***

Las bacterias del género *Bacillus* pueden producir sustancias antimicrobianas de distinta naturaleza, que pueden ser divididas en los siguientes tipos: un grupo de péptidos de síntesis ribosomal, policétidos (PK) y pequeñas moléculas peptídicas de síntesis no ribosomal (NRPs) (Fickers 2012).

Dentro de los compuestos antimicrobianos producidos por *Bacillus* spp., destaca la importancia de tres familias de lipopéptidos (del grupo de los NRP): surfactinas, iturinas y fengicinas. Estas moléculas son bioactivas contra un amplio rango de fitopatógenos (virus, bacterias, hongos y oomicetes) (Ongena y Jacques 2008).

La rizobacteria *Bacillus subtilis* formadora de endosporas, el sistema modelo para organismos gram-positivos, es capaz de producir más de dos docenas de antibióticos con una sorprendente variedad de estructuras. Los compuestos activos antimicrobianos producidos, incluyen predominantemente péptidos, que se sintetizan ribosómicamente y se modifican post-traduccionalmente (lantibióticos y péptidos similares a los lantibióticos) o no se generan ribosómicamente, así como un par de compuestos no peptídicos como policétidos, un amino azúcar, y un fosfolípido (Stein 2005).

La lipoheptapéptido surfactina es el biosurfactante más potente conocido, una solución 20  $\mu\text{M}$  reduce la tensión superficial del agua de 72 a 27  $\text{mN m}^{-1}$ ; ejerce una acción de tipo detergente sobre las membranas biológicas (Carrillo *et al.* 2003), y se distingue por sus excepcionales actividades emulsionantes, espumantes, antivirales y antimicoplasmas (Peypoux *et al.* 1999). La surfactina es biosintetizada por los tres NRPSs SrfA-C (Peypoux *et al.* 1999).

La familia de las iturinas abarca los lipoheptapéptidos cíclicos estrechamente relacionados, la micosubtilina, las iturinas y las bacilomicinas con fuertes actividades antifúngicas y hemolíticas, pero solo limitada actividad antibacteriana (Thimon *et al.* 1995). Ellas son

sintetizadas por las NRPSs estrechamente relacionadas con la micosubtilina (Duitman *et al.* 1999), iturina (Tsuge *et al.* 2001) y bacilomicina (Moyné *et al.* 2004) sintetasa.

La fengicina (sinónimo de plipastatina) combina varias propiedades estructurales excepcionales: ciclización, ramificación y componentes inusuales. La fengicina que actúa específicamente contra los hongos filamentosos (Vanittanakom *et al.* 1986) es biosintetizada por la fengicina sintetasa que abarca los cinco NRPSs Fen1-Fen5 codificada por ppsA-E (Steller *et al.* 1999).

El término resistencia inducida se usa de manera genérica para referirse a un estado en el cual las plantas son estimuladas de manera biológica o química para resistir a futuros ataques por parte de herbívoros y patógenos (Jones y Dangl 2006; Burketova *et al.* 2015). Esta inducción se lleva a cabo mediante la activación de mecanismos de defensa, no solo de manera local, sino en sitios de la planta distantes al sitio donde ha sido estimulada, lo que la hace sistémica (Burketova *et al.* 2015).

Las plantas activan una respuesta inmunitaria multifacética que las protege del ataque de microorganismos patógenos (bacterias, hongos, oomicetos y virus). Dicha inmunidad está constituida por barreras físicas (cutícula, pared celular, pelos) y químicas (compuestos antimicrobianos), así como por respuestas inducidas que dependen del reconocimiento del patógeno (Burketova *et al.* 2015).

Existen dos tipos de resistencia inducida: la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (SIR). La SAR es una respuesta de defensa activa, sistémica, de amplio espectro que está asociada a una alta expresión de genes PR (Hammerschmidt 1999). En la mayoría de los casos, la SAR es igualmente efectiva contra patógenos (hongos, bacterias, virus o nemátodos), independientemente del organismo inductor (Ryals *et al.* 1996). La SIR es inducida por microorganismos benéficos a través de diferentes elicitores, dentro de los que se incluye a patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), compuestos orgánicos volátiles (VOCs), compuestos asociados a la degradación de la pared celular (Burketova *et al.* 2015, Pieterse *et al.* 2014), sideróforos y lipopéptidos (NRPs) (Chandler *et al.* 2015).

La resistencia sistémica inducida realizada por cepas de *Bacillus* ha sido reportada en muchas especies de plantas y resulta efectiva contra un amplio rango de patógenos (Shafi *et al.* 2017).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO**

El presente trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio e invernadero de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), ubicado en el distrito de la Molina, provincia y departamento de Lima, situado geográficamente a 12°05'06'' S de latitud, 76°57'07'' W de longitud y 243.7 m. s. n. m.

#### **3.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE CAMPOS DE CULTIVO**

Para la recolección de muestras se seleccionaron árboles enfermos injertados sobre mandarina Cleopatra, procedentes de ocho fundos citrícolas representativos de la provincia de Huaral: Fundo Santa Elvira (Caqui), Fundo bandurria (Caqui), Fundo Tres Arbolitos (Huando), Fundo del Sr. Rafael Morales (Cabuyal Alto), Fundo del Sr. Joaquín Valverde (Cabuyal), Fundo del Sr. Hector Andía (Caqui), Fundo del Sr. Hugo Pretel (Cabuyal) y Fundo del Sr. Guillermo Ghiggo (La Quincha); que mostraban síntomas secundarios aéreos como decaimiento foliar, clorosis, defoliación prematura, muerte de ramas jóvenes y escaso crecimiento de brotes. De cada árbol, se tomaron dos muestras frescas de raíces secundarias y dos muestras de suelo que rodeaban a las raíces muestreadas, en dirección norte y sur del punto cardinal.

Las muestras extraídas se colocaron en bolsas de polipropileno, debidamente rotuladas y transportadas en cajas conservadoras conteniendo gel refrigerante, para evitar la proliferación de microorganismos saprófitos durante el procedimiento y su transporte hacia el laboratorio de Fitopatología.

#### **3.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE COLONIAS**

Las muestras fueron procesadas el mismo día de su recolección, para evitar la contaminación con otros microorganismos saprófitos.

### **3.3.1 Preparación de medio selectivo CMA-PAR (PH)**

Se preparó el medio de cultivo selectivo CMA-PAR (PH) para *Phytophthora* (Jeffers y Martin 1986). Esta preparación utiliza como base el medio Corn Meal Agar (CMA) al cual se le adicionan tres antibióticos (Pimaricina, Ampicilina y Rifampicina) y dos fungicidas (Pentacloronitrobenceno y Hymexazol). El Pentacloronitrobenceno es particularmente útil para inhibir el crecimiento de hongos contaminantes y el Hymexazol es para inhibir el crecimiento de la mayoría de *Pythium* spp. en el medio de cultivo.

Para preparar 1 litro de medio CMA-PAR (PH) se colocó 15 g de CMA formulado en un vaso de precipitación de 1 l de capacidad, conteniendo 700 ml de agua destilada desionizada. Luego, se licuó en un horno microondas, se completó con agua destilada desionizada hasta 1 litro y se esterilizó en autoclave (121° C a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 20 minutos). En el interior estéril de una cámara de flujo laminar y cuando el medio CMA estuvo a punto de plaqueo (37° C aprox.), se adicionó los antibióticos (10 mg de Pimaricina, 250 mg de Ampicilina y 10 mg de Rifampicina) y los fungicidas (66.7 mg de Pentacloronitrobenceno y 50 mg de Hymexazol). Finalmente, se procedió al paqueo hasta la solidificación del medio selectivo.

### **3.3.2 Obtención de aislamientos de muestras de raíces**

Las raicillas se lavaron con abundante agua corriente de caño durante 5 minutos, para eliminar restos de suelo y enseguida se realizó tres lavados con agua destilada desionizada estéril, obteniéndose de esta manera el órgano radicular limpio. Se seleccionaron porciones de raicillas que mostraban síntomas de pudrición con desprendimiento de corteza y se cortaron pequeños trozos de 2 cm de la zona de interface del avance de la enfermedad y se colocaron en un pequeño vaso de precipitación de vidrio estéril.

En el interior aséptico de la cámara de flujo, las porciones de raicillas se dejaron secar sobre papel toalla absorbente estéril. Luego, se procedió a la siembra colocando tres porciones de raicillas por cada placa de Petri conteniendo medio selectivo CMA-PAR (PH) y con cuatro repeticiones por muestra. Las placas sembradas fueron incubadas a 25° C durante 5 días y se repicó a otras placas de Petri conteniendo el mismo medio selectivo, con la finalidad de obtener el aislamiento completamente puro.

### 3.3.3 Obtención de aislamientos de muestras de suelo

A partir de 50 g de muestras de suelo, previamente homogenizada, se procedió a la siembra en placas de Petri conteniendo el medio selectivo CMA-PAR (PH), procedimiento que consistió en colocar pequeñas porciones de suelo distribuidas en tres puntos de siembra y con cuatro repeticiones por muestra, dentro de la cámara de flujo laminar. Las placas sembradas también fueron incubadas a 25° C durante 5 días y se repicó a otras placas de Petri conteniendo el mismo medio selectivo, con la finalidad de obtener el aislamiento completamente puro.

## 3.4 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS

Para la identificación morfológica se consideró la clave de identificación de especies de *Phytophthora* propuesta por Erwin y Ribeiro (1996).

### 3.4.1 Caracterización de las estructuras asexuales

Se consideró:

- **Micelio:** Séptado o cenocítico y presencia o ausencia de hinchamientos hifales.
- **Esporangioforo:** Presencia (largo y forma) o ausencia de ramificación.
- **Esporangio:** Forma y tamaño (largo y diámetro), presencia o ausencia de papila, Relación largo: diámetro, Caduco (deciduo) o persistente, presencia o ausencia de pedicelo y presencia o ausencia de proliferación.
- **Clamidospora:** Presencia o ausencia, diámetro promedio y ubicación.

#### a. Producción de esporangios

Para la producción de esporangios, se sembró cada aislamiento axénico en estudio en medio Agar Jugo V8 y se incubó a 25° C durante 5 días, a partir del cual se extrajo de los márgenes del cultivo 10 discos de 7 mm de diámetro conteniendo el medio con micelio en activo crecimiento y se colocó en placas de Petri (90 x 15 mm), se agregó 15 ml de solución suelo al 10 por ciento (filtrado y tindalizado), la misma que fue renovada cada 2 días y se mantuvo a temperatura ambiente (27 - 32° C) bajo alternancia continua de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, durante 2 - 3 días. Las observaciones de los esporangios a través del microscopio óptico compuesto se hicieron a partir de las 24 horas.

Para preparar 1 litro de medio Agar Jugo V8 se colocó 200 ml de Jugo V8 Campbell's, 3 g de CaCO<sub>3</sub> y 18 g de agar granulado en un vaso de precipitado conteniendo 500 ml de agua

destilada desionizada. Luego, se licuó la mezcla en un horno microondas, se completó hasta 1 litro con agua destilada desionizada y se esterilizó en autoclave.

#### **b. Producción de clamidosporas**

Para cada aislamiento en estudio, se tomó cinco discos de 7 mm de diámetro del borde del cultivo de 10 días desarrollado en medio CMA y se colocó en un matraz Erlenmeyer que contenía 25 ml de medio líquido para formación de clamidosporas (Tsao 1971). Este medio tinalizado consistió en filtrado de Jugo V8 (100 ml), filtrado de CaCO<sub>3</sub> al 2 por ciento (100 ml) y agua destilada desionizada (800 ml). Enseguida, se incubó a 25° C en la oscuridad durante 24 horas, se agitó suavemente varias veces para resuspender los fragmentos de hifas adheridas a la pared del matraz y se volvió a incubar a 25° C durante 6 días más. Posteriormente, se añadió 100 ml de agua destilada desionizada estéril y se incubó a 18° C durante 15 días, para luego realizar las observaciones en el microscopio.

#### **3.4.2 Caracterización de las estructuras sexuales**

Se consideró:

- **Compatibilidad de gametangios:** Homotálicos o heterotálicos.
- **Anteridio:** Tamaño promedio (largo y diámetro) y paragino o anfígeno.
- **Oogonio:** Diámetro promedio y presencia o ausencia de ornamentación.
- **Oospora:** Diámetro promedio y grosor de la pared.

#### **a. Producción de oosporas**

Cada aislamiento en estudio se cultivó en placas de Petri conteniendo el medio Agar Jugo V8 Clarificado Suplementado (AV8CS) solo y apareado con *Phytophthora cinnamomi* (cruzamiento interespecífico). Las placas sembradas se cubrieron con papel de color negro y se incubaron a 25° C durante 20 días en completa oscuridad.

Para preparar 1 litro de medio AV8CS se añadió 3.3 g de CaCO<sub>3</sub> a 235 ml de Jugo V8 Campbell's y se centrifugó la mezcla a 5000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante se diluyó a la proporción de 1:4 con agua destilada desionizada, luego se adicionó 15 g de agar granulado (Zentmyer *et al.* 1973) y se suplementó con 0.03 g de β-sitosterol, 0.02 g de Triptófano, 0.1 g de CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O y 0.001 g de Tiamina (Chee *et al.* 1976). Finalmente, se esterilizó en autoclave.

### **3.5 RELACIONES DE TEMPERATURAS EN EL CRECIMIENTO MICELIAL**

Para cada aislamiento en estudio, se tomó un disco de 5 mm de diámetro del borde de la colonia que está en activo crecimiento y se sembró en placas de Petri conteniendo medio CMA, con cinco repeticiones y se sometió a una serie de diferencial de temperaturas (5, 10, 25, 32, 35 y 37° C). Se consideró los rangos de temperatura mínima, óptima y máxima, según la clave de identificación de especies de *Phytophthora* propuesta por Erwin y Ribeiro (1996).

### **3.6 PRUEBA DE PATOGENICIDAD**

#### **3.6.1 Material vegetal**

La prueba de patogenicidad se realizó en las instalaciones del invernadero de Fitopatología de la UNALM y para este fin se obtuvieron plántulas de mandarina Cleopatra mediante siembra directa de semillas (procedentes de Huaral) cultivadas previamente en bandejas de almácigo que contenía sustrato comercial Pro-mix (turba de musgo esterilizado) y posteriormente trasplantadas a los 2 meses de edad en bolsas de polietileno negro de 0.5 kg de capacidad, conteniendo sustrato esterilizado compuesto de suelo agrícola, arena fina lavada y materia orgánica (compost) en proporción 1:1:1.5. Se seleccionaron plantas sanas, vigorosas y de crecimiento uniforme.

#### **3.6.2 Preparación del inóculo e inoculación**

Cada aislamiento axénico en estudio, se sembró en placas de Petri conteniendo el medio Agar Jugo V8 (para obtener abundante estructura vegetativa) y se incubó a 25° C durante 5 días; a partir de la misma, se tomó porciones de medio con micelio y se sembró en bolsas de polipropileno transparente (7" x 4") conteniendo 100 g de medio granos de trigo esterilizado y se incubó a 25° C durante 15 días. Todo el procedimiento se realizó en una cámara de flujo laminar aséptica.

Se utilizaron 63 plantas de 5 meses de edad, distribuidos en nueve tratamientos (ocho aislamientos en estudio y un testigo sin inocular) y 7 repeticiones. A cada planta de los tratamientos correspondientes se inoculó con granos de trigo con micelio a razón de 5 g/kg de sustrato y después se aplicó un riego pesado para asegurar un adecuado nivel de saturación del sustrato y favorecer la formación de esporangios y zoosporas.

#### **3.6.3 Reaislamiento**

Las plantas que presentaron síntomas secundarios (decaimiento, clorosis y abarquillamiento foliar) y síntomas primarios (pudrición radicular) se procesaron en el laboratorio de

Fitopatología para el reaislamiento, purificación e identificación del inóculo inicial, siguiendo la misma metodología utilizada en el proceso de aislamiento, cumpliéndose con los postulados de Koch para la prueba de patogenicidad.

### **3.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR**

#### **3.7.1 Extracción del ADN**

Se sembraron los aislamientos axénicos en placas de Petri conteniendo medio agar jugo V-8 modificado (Anexo 1), medio de cultivo que estimuló abundante crecimiento micelial de las colonias.

Utilizando una hoja de bisturí N° 20 se procedió a extraer una pequeña cantidad de micelio y se colocó en el interior de microtubos Eppendorf estériles de 1.5 ml de capacidad; enseguida, se añadió una pequeña cantidad de nitrógeno líquido en los microtubos (para congelar la muestra de micelio), luego se maceró con la ayuda de un micropistilo estéril y para la extracción del ADN se siguió el método de cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) al 2 por ciento (Doyle and Doyle 1990) (Anexo 2), procedimiento que fue realizado en las instalaciones del laboratorio del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNALM.

#### **3.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional**

La técnica molecular de PCR se realizó bajo el procedimiento de Spies *et al.* (2011). Para la amplificación y secuenciamiento de las regiones Citocromo Oxidasa II (cox II) del ADNmt y Espaciador Transcrito Interno (ITS) del ADNr, se utilizaron los cebadores que se muestran en la Tabla 1. El cebador ha sido diseñado por el laboratorio Integrated DNA Technologies (California, USA).

**Tabla 1: Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de las regiones cox II e ITS**

Región	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' – 3')	Referencia	Longitud del fragmento
cox II	FM58	CCA CAA ATT TCA CTA CAT TGA	Martin (2000)	563 bp
	FM66	TAG GAT TTC AAG ATC CTG C	Martin (2000)	
ITS	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> (1990)	730 – 882 bp
	ITS6	GAA GGT GAA GTC GTA ACA AGG	Cooke & Duncan (1997)	

Las condiciones de reacción de PCR para las regiones cox II e ITS, están indicadas en la Tabla 2, obteniéndose un volumen total de 25 µl por cada muestra de ADN.

**Tabla 2: Reactivos y cantidades en la preparación del Master Mix**

Reactivos	Cantidad (µl)
Agua Milli-Q (estéril)	10.15
Buffer PCR 1X	2.50
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.25
dNTPs (2 mM)	2.00
Primer: FM58/ITS4 (10 µM)	2.00
Primer: FM66/ITS6 (10µM)	2.00
Taq Platinum (5 U/µl)	0.10
Muestra de ADN	5.00
Total	25.00

Finalmente, las reacciones de amplificación se realizaron en un equipo termociclador peqSAR (PEQLAB Biotechnologies GmbH), con los parámetros de ejecución que se detalla en las Tablas 3 y 4. Las amplificaciones exitosas se confirmaron visualmente por electroforesis (110 voltios durante 55 minutos) en un gel de agarosa al 2 por ciento.

**Tabla 3: Condiciones de termociclado para la PCR de la región cox II**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Denaturación inicial	94° C	5 min.	1
Denaturación	94° C	1 min.	
Anillamiento	52° C	1 min.	32
Extensión	72° C	2 min.	
Extensión final	72° C	7 min.	1
Conservación	4° C	∞	

**Tabla 4: Condiciones de termociclado para la PCR de la región ITS**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Denaturación inicial	94° C	5 min.	1
Denaturación	94° C	30 seg.	
Anillamiento	55° C	30 seg.	32
Extensión	72° C	1.5 min.	
Extensión final	72° C	7 min.	1
Conservación	4° C	∞	

### 3.7.3 Secuenciamiento

Los productos de PCR fueron secuenciados por la compañía Macrogen Inc (Korea del Sur).

### 3.7.4 Análisis bioinformático

El análisis de las secuencias se realizó con la ayuda de herramientas bioinformáticas tales como BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5, BLAST de la National Center for Biotechnology (NCBI), MEGA7 (Molecular Evolutionary Analysis, versión 7) y Mr. Bayes (Bayesian Inference of Phylogeny).

El análisis filogenético se empezó con la construcción de secuencias consenso, utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, donde se analizó y editó la secuencia de las dos hebras del fragmento amplificado en función al electroferograma correspondiente. Las secuencias consenso editados se compararon con las secuencias de ADNs del GenBank en el NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el programa BLAST, donde se obtuvo el porcentaje de identidad para cada una de las muestras en estudio. Seguidamente, se realizó el alineamiento de las secuencias usando el programa MEGA7, con la versatilidad del

programa Mr. Bayes se procesaron las secuencias mediante la inferencia bayesiana obteniendo por resultado la distribución del árbol filogenético.

### 3.8 PRUEBAS DE CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO IN VITRO

Para la prueba de control químico y biológico *in vitro* se trabajó con el aislamiento JC2 (aislado de muestra de raíces) y como medio de cultivo se utilizó al Agar Jugo V8 Clarificado (AV8C).

Para preparar 1 litro de medio AV8C, se añadió 3.3 g de CaCO<sub>3</sub> a 235 ml de Jugo V8 Campbell's y la mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante se diluyó a una proporción de 1:4 con agua destilada desionizada, luego se adicionó 15 g de agar granulado (Zentmyer *et al.* 1973) y la mezcla se licuó en un horno microondas. Finalmente, se esterilizó en autoclave.

Todos los productos químicos utilizados se aplicaron a las dosis comerciales recomendadas por el fabricante (Tabla 5).

**Tabla 5: Tratamientos, productos comerciales y dosis, utilizados en la prueba de control químico de la pudrición radicular *in vitro***

Trat.	Ingrediente activo	Nombre comercial	Dosis	Empresa comercial
T1	Testigo	-	-	-
T2	Metalaxyl	Fitoklin	200 g/200 L	Tecnología Química y Comercio S.A.
T3	Fosfito de potasio	Kalex	600 ml/200 L	Química Suiza S.A.
T4	Fosfito de cobre	Manvert Fosika Cu	600 ml/200 L	Hortus S.A.
T5	Fosfito de calcio	Phospro Calcium	1000 ml/200 L	Conagra S.A.C.
T6	Fosetyl aluminio	Aliette 80 WP	1000 g/200 L	Bayer S.A.
T7	Nitrato de calcio	Yaraliva Calcinit	1200 ppm	Navarro Montes Agro S.L.
T8	Azoxystrobin	Stronsil 50 WG	200 g/200 L	Silvestre Perú S.A.C.
T9	Ácidos urónicos	Licthor	1000 ml/200 L	Biogen Agro S.A.C.
T10	Extracto de lauráceas	Xilotrom	600 ml/200 L	Arvensis Agro S.A.

Los productos biológicos utilizados se aplicaron a las dosis comerciales recomendadas por el fabricante (Tabla 6).

**Tabla 6: Tratamientos, productos comerciales y dosis, utilizados en la prueba de control biológico de la pudrición radicular *in vitro***

Trat.	Ingrediente activo	Nombre comercial	Dosis	Empresa comercial
T1	Testigo <i>Trichoderma</i>	-	-	-
T2	<i>harzianum</i> Cepa T22	T-22	2 L/ha	Silvestre Perú S.A.C.
T3	<i>Bacillus subtilis</i> AP-01	Bio-Splent WG	70 2 kg/ha	Silvestre Perú S.A.C.

Para probar la eficacia de los productos químicos y biológicos, se utilizó la prueba de alimento envenenado y la prueba de enfrentamiento, respectivamente.

### 3.8.1 Prueba de medio envenenado

Esta prueba se utilizó para evaluar la eficacia del control químico. Para cada tratamiento, se preparó 400 ml de medio CV8A, se colocó en un matraz Erlenmeyer y se esterilizó en autoclave. Luego, en el interior de la cámara de flujo de laminar, cuando el medio CV8A estuvo a punto de plaqueo (37° C aprox.), se adicionó el producto químico correspondiente a la dosis indicada, se homogenizó, se distribuyó en 20 placas de Petri (90 mm x 15 mm) y se dejó solidificar durante 3 horas. Enseguida, se sembró un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo del aislamiento JC2 en el centro de las placas y se sellaron con cinta parafilm. Las placas se incubaron a 25° C y se midió diariamente el crecimiento del micelio hasta que las placas testigo (medio CV8A no envenenado) cubrieron toda la superficie del medio.

### 3.8.2 Prueba de enfrentamiento

La metodología de siembra dual o de enfrentamiento se empleó para evaluar la eficacia del control biológico. Para cada tratamiento, se preparó 400 ml de medio CV8A, se colocó en un matraz Erlenmeyer y se esterilizó en autoclave. Enseguida, con el medio estéril a 37° C aprox., se plaqueó y se dejó solidificar durante 3 horas en el interior aséptico de la cámara de flujo laminar. Con la ayuda de un plumón marcador se dividió las placas de Petri en dos partes iguales, en una parte se sembró un disco de micelio de cultivo de *T. harzianum* Cepa

T-22 activado del producto comercial y en la otra parte de la placa se sembró un disco de micelio activo del aislamiento JC2. Para el enfrentamiento con el biocontrolador *B. subtilis* AP-01, en un extremo de las placas de Petri, con la ayuda de un asa de Kolle, se tomó una suspensión del producto comercial y se sembró trazando una línea; en el otro extremo se sembró un disco de micelio activo del aislamiento JC2 y se sellaron con cinta parafilm.

Las placas sembradas fueron incubadas a 25° C y se midió diariamente el crecimiento de micelio hasta que las placas testigo (aislamiento JC2 no enfrentado) cubrieron toda la superficie del medio.

### **3.8.3 Evaluaciones**

La eficacia de control se determinó mediante el porcentaje de inhibición micelial (PI), utilizando la fórmula descrita por Pandey *et al.* (1982), que se muestra a continuación.

$$PI = (C - T) / C \times 100$$

Dónde:

PI = Porcentaje de inhibición micelial (%)

T = Crecimiento radial o diametral de la colonia del tratamiento (mm)

C = Crecimiento radial o diametral de la colonia del testigo (mm)

## **3.9 PRUEBAS DE CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO EN INVERNADERO**

### **3.9.1 Unidad experimental**

El material vegetal se obtuvo bajo el mismo procedimiento realizado para la prueba de patogenicidad, con la diferencia que el trasplante a los 2 meses de edad se realizó en bolsas de polietileno negro de 2.5 kg de capacidad. Para esta prueba de control se seleccionaron un total de 300 plantas sanas de 6 meses de edad, distribuidos en 220 plantas para la prueba de control químico y 80 plantas para la prueba de control biológico. Cada unidad experimental estuvo constituida por una bolsa de polietileno conteniendo una planta.

### **3.9.2 Preparación del inóculo e inoculación**

Para la prueba de control químico y biológico en invernadero, se trabajó con el aislamiento JC2 (aislado de muestras de raíces) y se inoculó con granos de trigo con micelio.

El cultivo de micelio en medio granos de trigo estéril (GTE), se realizó bajo la metodología descrita por Drenth y Sendall (2001). Para preparar 1 kg medio GTE, se remojó 700 g de trigo resbalado seco en 1 L de agua destilada desionizada durante 24 horas; se descartó el exceso de agua de remojo, se distribuyó en bolsas de polipropileno a razón de 100 g y se esterilizó en autoclave a 121 ° C y 21 lb de presión durante 30 minutos por dos días consecutivos. Posteriormente, en cada bolsita conteniendo medio GTE se inoculó 10 discos de medio AV8 con micelio activo y se incubó a 25° C durante 15 días, tiempo en que el aislamiento colonizó completamente el medio. Para toda la prueba de control se utilizó 3.12 kg de trigo con micelio.

A cada unidad experimental de los tratamientos correspondientes, se inoculó al sustrato con 12 g de granos de trigo con micelio (5 g/kg de sustrato) y para favorecer el desarrollo de la pudrición radicular, se inundó con agua durante 3 días consecutivos. A los testigos sin inocular se aplicó únicamente granos de trigo esterilizado.

### 3.9.3 Tratamientos, dosis y momentos de aplicación de productos químicos y biológicos

Los productos químicos y biológicos utilizados en la prueba de control *in vitro* también se utilizaron en la prueba de control en invernadero.

Los productos químicos utilizados se aplicaron a las dosis comerciales recomendadas por el fabricante (Tabla 7). Los productos formulados tanto en polvo como en líquido, fueron disueltos en agua y se aplicaron añadiendo al suelo en un volumen de 300 ml por cada unidad experimental y los testigos (inoculados y sin inocular) recibieron únicamente agua.

**Tabla 7: Tratamientos, productos comerciales y dosis, utilizados en el control químico de la pudrición radicular en invernadero**

Trat.	Ingrediente activo	Nombre comercial	Dosis	Empresa comercial
T1	Testigo sin inóculo	-	-	-
T2	Testigo inoculado	-	5 g/kg de sustrato	-
T3	Metalaxyl	Fitoklin	200 g/200 L	Tecnología Química y Comercio S.A.
T4	Fosfito de potasio	Kalex	600 ml/200 L	Química Suiza S.A.
T5	Fosfito de cobre	Manvert Fosika Cu	600 ml/200 L	Hortus S.A.
T6	Fosfito de calcio	Phospro Calcium	1000 ml/200 L	Conagra S.A.C.
T7	Fosetyl aluminio	Aliette 80 WP	1000 g/200 L	Bayer S.A.
T8	Nitrato de calcio	Yaraliva Calcinit	1200 ppm	Navarro Montes Agro S.L.
T9	Azoxystrobin	Stronsil 50 WG	200 g/200 L	Silvestre Perú S.A.C.
T10	Ácidos urónicos	Lichthor	1000 ml/200 L	Biogen Agro S.A.C.
T11	Extracto de lauráceas	Xilotrom	600 ml/200 L	Arvensis Agro S.A.

Los productos biológicos utilizados se aplicaron a las dosis comerciales recomendadas por el fabricante (Tabla 8). Los productos formulados tanto en polvo como en líquido, fueron disueltos en agua y se aplicaron añadiendo al suelo en un volumen de 300 ml por cada unidad experimental y los testigos (inoculados y sin inocular) recibieron únicamente agua.

**Tabla 8: Tratamientos, productos comerciales y dosis, utilizados para el control biológico de la pudrición radicular en invernadero**

Trat.	Ingrediente activo	Nombre comercial	Dosis	Empresa comercial
T1	Testigo sin inóculo	-	-	-
T2	Testigo inoculado	-	5 g/kg de sustrato	-
	<i>Trichoderma</i>			
T3	<i>harzianum</i> Cepa T22	T-22	2 L/ha	Silvestre Perú S.A.C.
T4	<i>Bacillus subtilis</i> AP-01	Bio-Splent 70 WG	2 kg/ha	Silvestre Perú S.A.C.

Las aplicaciones con los productos químicos se hicieron en forma curativa, es decir la aplicación se inició 2 días después de la inoculación con el aislamiento JC2 (patógeno) y las aplicaciones con productos biológicos se hicieron en forma preventiva, es decir 2 días antes de la inoculación con el patógeno (Tabla 9).

**Tabla 9: Momentos de aplicaciones de los productos químicos y biológicos**

Productos comerciales	Momentos de aplicación		
	1ra.	2da.	3ra.
Químicos	3 días después de la inoculación del patógeno	10 días después de la 1ra. aplicación	10 días después de la 2da. aplicación
Biológicos	3 días antes de la inoculación del patógeno	7 días después de la 1ra. aplicación	7 días después de la 2da. aplicación

### **3.9.4 Evaluaciones**

#### **a. Altura de planta**

Se midió en forma directa la longitud de tallo, desde el cuello de la planta hasta el extremo distal de la yema terminal, con la ayuda de una regla milimetrada.

#### **b. Peso fresco de la planta**

Se pesó en forma directa, mediante una balanza electrónica digital, el peso fresco en gramos de cada unidad experimental (planta) de los tratamientos correspondientes.

#### **c. Peso seco de la planta**

Para la evaluación de esta variable, las plantas correspondientes a cada tratamiento, se colocaron dentro de bolsas de papel Kraft, debidamente identificada. En primera instancia, se dejaron secar al medio ambiente durante 5 días; enseguida, se dejaron secar en la estufa a 70° C durante 3 días consecutivos. Finalmente, se registró el peso de la materia seca mediante una balanza electrónica digital.

#### **d. Peso fresco de raíces**

Para la evaluación, se cortaron las raíces y se pesaron en forma directa en una balanza electrónica digital expresada en gramos, correspondientes a cada tratamiento.

#### **e. Peso seco de raíces**

Las raíces de las plantas correspondientes a cada tratamiento, se colocaron individualmente dentro de bolsas de papel Kraft y se dejaron secar al medio ambiente por 5 días. Luego, se dejaron secar en la estufa a 70° C por 3 días consecutivos y finalmente, se registró el peso de la materia seca mediante una balanza electrónica digital.

#### **f. Severidad de la pudrición radicular**

La evaluación se realizó al final del experimento, por el método de estimación visual directa de la pudrición radicular, mediante una escala de porcentaje y grado de severidad (elaboración propia), descrita en la Tabla 10. El grado 0 representa una raíz sana y el grado 6 una raíz completamente podrida.

**Tabla 10: Escala de evaluación de severidad de pudrición radicular**

<b>Grado</b>	<b>Porcentaje de pudrición radicular</b>
0	0
1	> 0 - 10
2	> 10 - 25
3	> 25 – 50
4	> 50 – 75
5	> 75 – 90
6	> 90 – 100

### **3.10 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para la prueba de control químico y biológico tanto *in vitro* como en invernadero, se utilizó el diseño completamente al azar (DCA). Las variables de respuestas evaluadas se sometieron al análisis de variancia y se realizaron las pruebas de comparación de medias de Tukey, considerando un nivel de confianza del 95 por ciento ( $\alpha=0.05$ ), para el cual se utilizó el software Statistical Analysis System (SAS) versión 9.2. En la prueba *in vitro*, para el control químico se consideró 10 tratamientos y 20 repeticiones; mientras que, para el control biológico se consideró 3 tratamientos y 20 repeticiones. En la prueba en invernadero, para el control químico se consideró 11 tratamientos y 20 repeticiones; mientras que, para el control biológico se consideró 4 tratamientos y 20 repeticiones.

El modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable de respuesta en estudio (Altura de planta, peso fresco de la planta, peso seco de la planta, peso fresco de raíces, peso seco de raíces y severidad de la pudrición radicular) de la unidad experimental del *i*-ésimo tratamiento en la *j*-ésima repetición.

$\mu$  = Efecto de la media general.

$\tau_i$  = Efecto del *i*-ésimo tratamiento.

$\epsilon_{ij}$  = Efecto del error experimental del *i*-ésimo tratamiento en la *j*-ésima repetición.

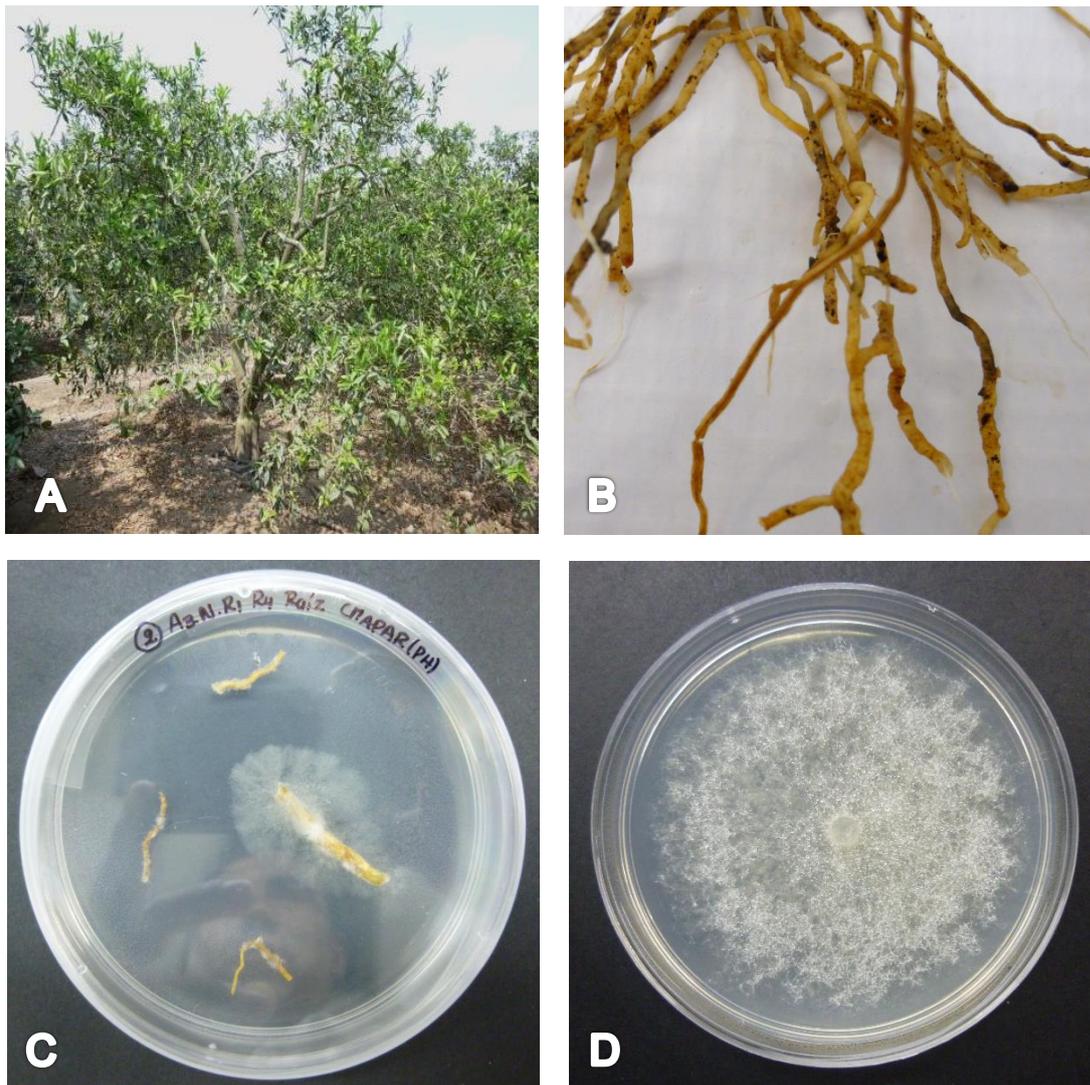
## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 AISLAMIENTO DEL AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD**

En el campo, se presentaron árboles con síntomas secundarios visibles de decaimiento foliar, clorosis y defoliación prematura; asimismo, las raicillas mostraban síntomas primarios de pudrición con desprendimiento de corteza (Figura 1A y 1B).

Se obtuvo ocho aislamientos (JC1, JC2, JC3, JC4, JC5, JC6, JC7 y JC8), con un patrón de crecimiento micelial típicamente aracnoideo en medio CMA-PAR (PH), similar a lo descrito por Erwin y Ribeiro (1996), Javier (1998) y Gallery y Hong (2008) y de colonización superficial e inmerso en el medio de cultivo (Figura 1C y 1D).

Las características morfológicas generales se observaron en el microscopio óptico compuesto y mostraban la presencia de hifas cenocíticas, presencia de esporangios papilados y la formación de zoosporas en el interior del esporangio, lo que indicaba la presencia del patógeno perteneciente al género *Phytophthora*.



**Figura 1:** A) Árbol de mandarina afectado por pudrición radicular. B) Raíces con síntomas de pudrición y descortezamiento. C) Siembra de raíces infectadas en medio CMA-PAR (PH). D) Colonia de crecimiento tipo aracnoide del patógeno

## 4.2 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS

### 4.2.1 Características morfométricas asexuales

Los aislamientos presentaron micelio cenocítico (aseptado), excepto algunas hifas envejecidas que eventualmente presentaron septas. El micelio presentaba una ramificación irregular de aspecto toruloso, con escasos hinchamientos hifales (Figura 2A).

Los esporangios, se formaron a partir de las 24 horas en medio solución suelo al 10 por ciento, se caracterizaban por ser notoriamente papilados con engrosamiento apical bien pronunciado y los anteridios del tipo anfígeno; por consiguiente, pertenecen al grupo

taxonómico II según Waterhouse (1963), Newhook *et al.* (1978) y Stamps *et al.* (1990), citado por Erwin y Ribeiro (1996).

Los esporangios mostraban formas predominantemente ovoide-elipsoide, esférico, ocasionalmente obpiriformes y esféricos bipapilados. Los esporangios eran no caducos y las dimensiones fluctuaron en un rango de 18-71  $\mu\text{m}$  de largo y 14-54  $\mu\text{m}$  de ancho (44 x 35  $\mu\text{m}$  de promedio), la relación largo-ancho (L/A) fue de 1.3 y se formaban en simpodios sueltos (Figura 2B). Las clamidosporas se formaron abundantemente a los 22 días en todos los aislamientos tanto intercalares como terminales y con un diámetro promedio de 33  $\mu\text{m}$  (Figura 2C). Los resultados de la caracterización morfométrica de los aislamientos obtenidos se muestran en la Tabla 11 y son comparativamente muy similares.

Comparando las características morfométricas asexuales de los aislamientos en estudio frente a las doce especies que infectan cítricos en el mundo (Erwin y Ribeiro 1996), que se muestran en la Tabla 12, estos correspondían a la especie *Phytophthora nicotianae*, según la clave descriptiva de Erwin y Ribeiro (1996).

Los esporangios de *P. nicotianae* presentaron formas desde esféricas (95.1 por ciento), ovoides (100 por ciento), elipsoides (69.1 por ciento), obturbinadas (95.1 por ciento) hasta obpiriformes (28.4 por ciento); asimismo, el tamaño fue muy variable en la mayoría de los aislamientos, con una relación L/A de 1.1 a 1.3. Las clamidosporas fluctuaban en un rango de 25 a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro y el neotipo promedió 33  $\mu\text{m}$  de diámetro (Hall 1993).

Thomson y Hine, citado por Erwin y Ribeiro (1996) señalaron que, los esporangios papilados de algunos aislamientos de *Phytophthora nicotianae* son producidos individualmente o en simpodio suelto en extensiones largas de 100 a 595  $\mu\text{m}$  de longitud (375  $\mu\text{m}$  de promedio).

Erwin y Ribeiro (1996) señalaron que, la forma de los esporangios varió desde elipsoides, ovoides, piriformes, obpiriformes a esféricos; prominentemente papilados, ocasionalmente bipapilados y no caducos. Los esporangios son producidos individualmente o en simpodio suelto, con tamaños de 11 a 60  $\mu\text{m}$  de largo y de 20 a 45  $\mu\text{m}$  de ancho (40.18 x 28.53  $\mu\text{m}$  de promedio), con una relación L/A de 1.1 a 1.7 (1.34 de promedio). Las clamidosporas son generalmente abundantes, terminales o intercalares y de 13 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro (28  $\mu\text{m}$  de promedio).

Javier (1998) reportó que, los aislamientos de *Phytophthora parasitica* Dastur (sinónimo actual es *P. nicotianae* Breda de Haan) tuvieron un patrón de crecimiento micelial tipo “tela

de araña”, los esporangios se ramificaron en simpodio suelto, fueron persistentes, predominantemente esféricas y ovoide-elipsoides, ocasionalmente esféricos bipapilados y obpiriformes, de 15-62.5  $\mu\text{m}$  de longitud y 8.75-47.5  $\mu\text{m}$  de ancho (41.68 x 31.23  $\mu\text{m}$  de promedio), de 1.35 de relación L/A y las clamidosporas se produjeron a los 21 días con un diámetro promedio de 30  $\mu\text{m}$ .

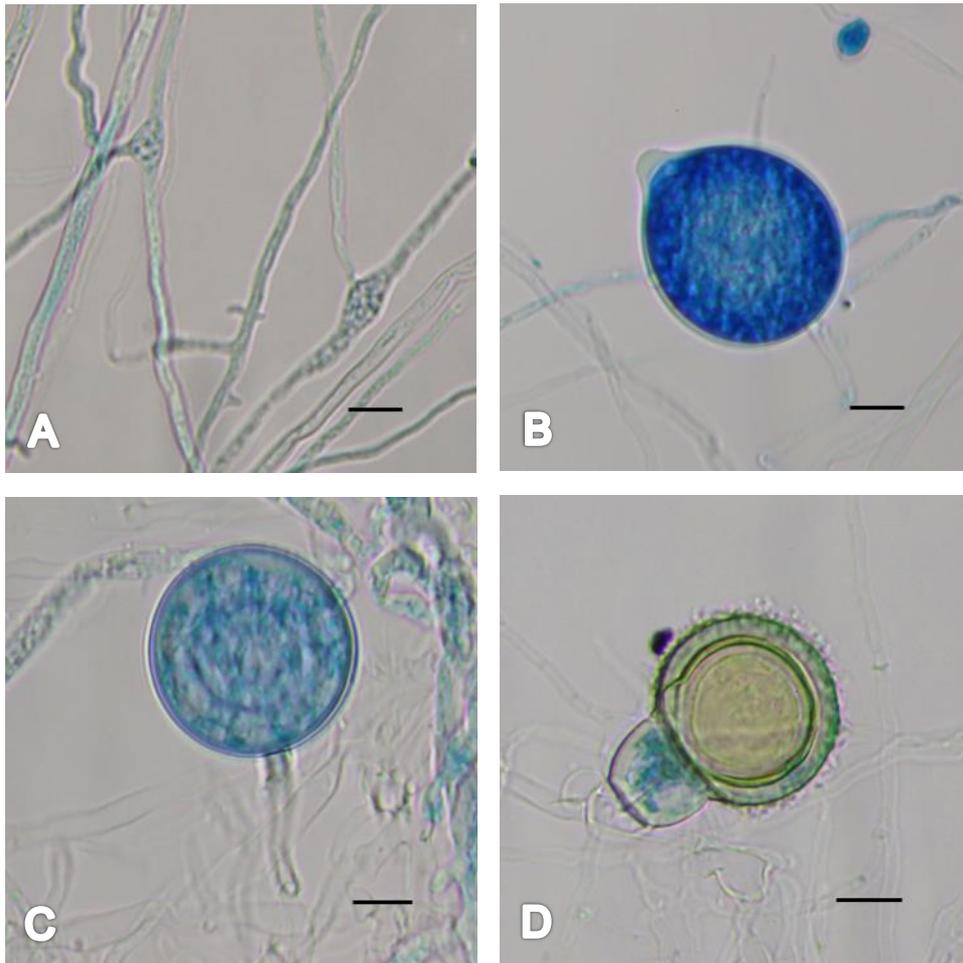
Según Santos *et al.* (2005), los esporangios formados en medio caldo zanahoria fueron papilados, persistentes, generalmente ovoides a esféricos, de 33.3-56  $\mu\text{m}$  de longitud y 24.5-35  $\mu\text{m}$  de ancho (42.5 x 29.6  $\mu\text{m}$  de promedio) y con una relación L/A de 1.4. Las clamidosporas producidas en medio CMA y caldo zanahoria, fueron terminales e intercalares, de 25.4 a 40.3  $\mu\text{m}$  de diámetro (33  $\mu\text{m}$  de promedio).

Según Gallery y Hong (2008), la mayoría de los aislamientos de *Phytophthora nicotianae* presentan micelio aranoideo y forman clamidosporas terminales e intercalares (30  $\mu\text{m}$  en promedio). Los esporangios son marcadamente papilados, no caducos, de forma predominantes ovoide, pero muchos son casi esféricos, unos pocos son elipsoides y ocasionalmente son bipapilados. El tamaño promedio del esporangio es 45 x 37  $\mu\text{m}$  (relación L/A de 1.24).

Los aislamientos de *P. nicotianae* var. *parasitica* presentaron micelio de estructura irregular “toruloso” y cenocítico, esporangios de forma globosa y papilados, clamidosporas intercalares y terminales (Acosta *et al.* 2012).

Mounde *et al.* (2012) indicaron que, *P. nicotianae* exhibía un micelio arrosado denso o suelto, sin patrón, extendido y aracnoideo aéreo. Las hifas eran cenocíticas con un diámetro promedio de 7-10  $\mu\text{m}$ . Los esporangios presentaban formas elipsoides, ovoides, piriformes, obpiriformes hasta esféricas, prominentemente papilados, con tamaño promedio de 36 x 28  $\mu\text{m}$  y la relación L/A de 1.34. Las clamidosporas, de 13 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, se produjeron abundantemente en forma intercalar y terminal.

Das *et al.* (2016) indicaron que, la mayoría de aislamientos de *P. nicotianae* cultivados en medio Agar V8 presentaron micelio algodonoso, sin patrón de crecimiento; produjeron esporangios esferoides, papilados, no caducos, con dimensiones que alcanzaron un rango de 33.9-58.2  $\mu\text{m}$  de largo y 24.2-48.5  $\mu\text{m}$  de ancho (41.9 $\pm$ 5.3 x 32.1 $\pm$ 4.9  $\mu\text{m}$  de promedio) y con una relación L/A de 1.3 $\pm$ 01  $\mu\text{m}$ ; clamidosporas enmarcadas en un rango de 24.2-43.6  $\mu\text{m}$  de diámetro (31.9 $\pm$ 4.6  $\mu\text{m}$  de promedio).



**Figura 2:** A) Micelio cenocítico e hinchamientos hifales. B) Esporangio prominentemente papilado. C) Clamidospora. D) Anteridio anfígeno y oospora aplerótica. Bar = 10  $\mu$ m

**Tabla 11: Características morfométricas asexuales de los aislamientos de *Phytophthora* spp**

Aislamientos	Grupo taxonómico	Clamidosporas				Esporangios										
		Hinchamientos hifales	Producción	Díametro promedio (µm)	Ramificación del esporangioforo	Caducidad	Longitud del pedicelo (µm)	Forma	Longitud (µm)	Ancho (µm)	Promedio (µm)	Relación L/A	Papilado (P) Semipapilado (SP) No papilado (NP)	Proliferación		
JC1	II	+	+	33	Simpodial suelto	-	-	Esférico, ovoide- elipsoide	25-63	15-51	45 x 36	1.3	P	-		
JC2	II	+	+	33	Simpodial suelto	-	-	Esférico, ovoide- elipsoide	25-71	18-51	44 x 35	1.3	P	-		
JC3	II	+	+	33	Simpodial suelto	-	-	Esférico, ovoide- elipsoide	24-59	15-51	45 x 36	1.3	P	-		
JC4	II	+	+	33	Simpodial suelto	-	-	Esférico, ovoide- elipsoide	26-60	19-50	44 x 35	1.3	P	-		
JC5	II	+	+	33	Simpodial suelto	-	-	Esférico, ovoide- elipsoide	24-63	16-51	44 x 35	1.3	P	-		
JC6	II	+	+	33	Simpodial suelto	-	-	Esférico, ovoide- elipsoide	19-63	15-48	41 x 33	1.3	P	-		
JC7	II	+	+	33	Simpodial suelto	-	-	Esférico, ovoide- elipsoide	25-60	18-51	43 x 35	1.3	P	-		
JC8	II	+	+	33	Simpodial suelto	-	-	Esférico, ovoide- elipsoide	18-63	14-54	43 x 34	1.3	P	-		

**Tabla 12: Características morfométricas asexuales del aislamiento JC2 con otras especies de *Phytophthora* que infectan cítricos**

Nombre de la especie	Grupo taxonómico	Hinchamientos hifales	Clamidosporas				Esporangios								
			Producción	Díámetro promedio (µm)	Ramificación del esporangio	Caducidad	de Longitud pedicelo (µm)	Forma	Longitud (µm)	Ancho (µm)	Promedio (µm)	Relación L/A	Papilado (P) Semipapilado (SP) No papilado (NP)	Proliferación	
<i>P. boehmeriae</i>	II	-	+	26-51	Simpodial simple	+	<5	Elipsoide-esférico	20-70	15-51	44 x 32	1.4	P	-	
<i>P. cactorum</i>	I	-	+/-	25-40	Simpodial simple	+	>4	Ovide-obpiriforme	19-55	16-46	38 x 26	1.3	P	-	
<i>P. capsici</i>	II	+	+/-	28-29	Simpodial simple; algunos umbelados	+	10-2000	Elipsoide piriforme <sup>a</sup>	30-100	25-90	variable	1.3-2.1	P	-	
<i>P. citrophthora</i>	II	-	+/-	28	Irregularmente ramificado; simpodial suelto	-	-	Variable	30-90	27-60	41 x 30	1.4	P	-	
<i>P. palmivora</i> var. <i>palmivora</i>	II	-	+	30-45	Simpodial simple	+	<5	Ovoide-elipsoide, obpiriforme	35-60	20-40	55 x 33	1.7-1.9	P	-	
<i>P. citricola</i>	III	-	-		Simple simpodial	-	5	Obpiriforme a irregular	30-75	21-44	47 x 34	1.4	SP	-	
<i>P. syringae</i>	III	+	-		Simpodial	-		Ovoide-obpiriforme	27-75	11-42	47 x 30	1.8	SP	-	
<i>P. hibernalis</i>	IV	-	-		Irregularmente ramificado simpodial <sup>a</sup>	+	23-73	Ovoide-elongado	29-53	14-22	40 x 19	2.1	SP	-	

...continuación

<i>P. megasperma</i>	V	+	-		No ramificado	-		Ovoide-obpiriforme	35-60	25-45	41 x 28	1.5	NP	+
<i>P. cinnamomi</i>	VI	+	+	41	No ramificado a simpodial simple	-		Ovoide-elipsoide	27-114	20-63	75 x 40	>1.5	NP	+
<i>P. drechsleri</i>	VI	+	+	7.9	Simpodial simple	-		Ovoide-obpiriforme	24-38	15-24	31 x 21	1.6	NP	+
<i>P. nicotianae</i>	II	+	+	33	Simpodial suelto o ramificado	no	-	Esférico, ovoide-elipsoide, obturbinado	14-74	12-60	43 x 36	1.3	P	-
JC2	II	+	+	33	Simpodial suelto	-	-	Esférico, ovoide-elipsoide	25-71	18-51	44 x 35	1.3	P	-

**Tabla 13: Características morfométricas sexuales de los aislamientos de *Phytophthora* spp**

Aislamientos	Grupo taxonómico	Anteridio					Oogonio	Oosporas			Temperatura (° C)				
		Homotático	Heterotático	Anfigeno	Paragino	Tamaño (µm) (L x A)	Pared ornamentada	Tamaño (µm)	Tamaño (µm)	Tamaño promedio (µm)	Grosor de la pared (µm)	Formación tejido hospedante	Mínima	Óptima	Máxima
JC1	II	-	+	+	-	12-20 x 14-19	-	21-36	18-33	23	2	NP	10	25-35	37
JC2	II	-	+	+	-	13-19 x 14-19	-	28-36	21-29	25	2	NP	10	25-35	37
JC3	II	-	+	+	-	13-20 x 14-20	-	24-34	19-28	22	2	NP	10	25-35	37
JC4	II	-	+	+	-	10-20 x 13-21	-	23-34	19-26	22	2	NP	10	25-35	37
JC5	II	-	+	+	-	10-20 x 10-18	-	23-29	18-23	21	2	NP	10	25-35	37
JC6	II											NP	10	25-35	37
JC7	II	-	+	+	-	13-19 x 14-20	-	24-33	19-24	22	2	NP	10	25-35	37
JC8	II	-	+	+	-	10-20 x 11-19	-	24-33	19-28	21	2	NP	10	25-35	37

**Tabla 14: Características morfométricas sexuales del aislamiento JC2 con otras especies de *Phytophthora* que infectan cítricos**

Nombre de la especie	Grupo taxonómico	Anteridio				Tamaño (L x A) (µm)	Oogonio		Oosporas			Temperatura (° C)			
		Homotálico	Heterotálico	Anfigeno	Paragino		Pared ornamentada	Tamaño (µm)	Tamaño (µm)	Tamaño promedio (µm)	Grosor de la pared (µm)	Formación en tejido hospedante	Mínima	Óptima	Máxima
<i>P. boehmeriae</i>	II	+	-	+		14-17 x 14-16	-	19-41	16-35	23-30	<2	NP	5-6	25	32.5
<i>P. cactorum</i>	I	+	-	-	+	9-18 x 9-20	-	18-40	15-36	25	2	NP	2	25	31
<i>P. capsici</i>	II	-	+	+		14-19 x 13-15		18-50	15-40	26	2-6	NP	6-9	25-32	>35
<i>P. citrophthora</i>	II					Órganos sexuales no producidos en la naturaleza						<5	24-28	32	
<i>P. palmivora</i>	II	-	+	+		15 x 14 (prom.)	-	21-40	16-30	23	2	NP	11	28-30	<35
<i>P. citricola</i>	III	+	-	+	⊕	9-13 x 7-8	-	18-35	16-30	22	1.5	NP	1-3	25-28	31
<i>P. syringae</i>	III	+	-	+	⊕	12 x 8 (prom.)	-	33-41	30-35	33	2	NP	<5	15-20	23
<i>P. hibernalis</i>	IV	+	-	⊕	+	10 x 15 (prom.)	-	33-35	29-32	31	1-3	NP	<5	15	25-26
<i>P. megasperma</i>	V	⊕	+	+	⊕	10-18 x 14-20	-	42-52	37-47	41	3.6	NP	5	20-25	<33
<i>P. cinnamomi</i>	VI	-	+	+	-	19-21 x 16-17	-	21-58	19-54	33	2	NP	5-15	20-32.5	30-36
<i>P. drechsleri</i>	VI	-	+	+	-	14 x 13 (prom.)	-	22-53	17-45	26	3	NP	10	30-32	37.5
<i>P. nicotianae</i>	II	-	+	+		10-12 x 9-10	-	16-36	12-34	24	2	NP	5-7	27-32	37
JC2	II	-	+	+		13-19 x 14-19	-	28-36	21-29	25	2	NP	10	25-32	37

⊕ Predominantemente de este tipo.

#### 4.2.2 Características morfométricas sexuales

Casi todos los aislamientos obtenidos son heterotálicos, debido a que no produjeron oosporas en un cultivo individual, pero sí en un cultivo dual con *Phytophthora cinnamomi*, como resultado de una hibridación interespecífica; a excepción del aislamiento JC6 que no produjo oosporas.

Los anteridios son anfígenos, esféricos u ovoides de 10-20  $\mu\text{m}$  de largo y de 10-21  $\mu\text{m}$  de ancho. Los oogonios son de pared lisa, esférica y variaban entre 21-36  $\mu\text{m}$ . Las oosporas son apleróticas con un tamaño promedio de 22  $\mu\text{m}$  y un grosor de pared de 2  $\mu\text{m}$  (Figura 2D). Los resultados de la caracterización morfométrica de los ocho aislamientos se detallan en la Tabla 13 y comparativamente son muy similares.

Comparando las características morfométricas sexuales de los aislamientos obtenidos, frente a las doce especies que infectan cítricos en el mundo (Erwin y Ribeiro 1996), como se detalla en la Tabla 14, estos correspondían a la especie *Phytophthora nicotianae*, según la clave descriptiva de Erwin y Ribeiro (1996).

Las estructuras sexuales (oogonio y oosporas) de algunos aislamientos de *Phytophthora parasitica* en cultivo individual, se forman cuando se transfiere el inóculo de cultivos envejecidos (Brasier 1972, Tsao *et al.* 1980).

Oudemans & Coffey (1991) identificaron 10 aislamientos de *P. parasitica* (*P. nicotianae*) que formaron oogonios y oosporas pequeñas (25 y 21  $\mu\text{m}$ , respectivamente) y las que formaron grandes (29 y 22  $\mu\text{m}$ , respectivamente), pero encontraron que no había evidencia de divergencia genética entre ambos grupos con diámetros oogoniales distintos.

Hall (1993) reportó que, los aislamientos asignados a *P. nicotianae* son heterotálicos, con anteridios anfígenos. Los oogonios y las oosporas fluctuaron en un rango de 23-28  $\mu\text{m}$  y de 21-25  $\mu\text{m}$  de diámetro, respectivamente.

Erwin y Ribeiro (1996) indican que, la mayoría de los aislamientos son heterotálicos, de anteridios anfígenos y esféricos u ovoides, los oogonios son lisos y esféricos que varía de 15 a 64  $\mu\text{m}$  de diámetro (26.8  $\mu\text{m}$  de promedio). Las oosporas son apleróticas y miden de 13 a 35  $\mu\text{m}$  de diámetro (22.6  $\mu\text{m}$  de promedio).

Javier (1998) reportó que, los aislamientos de *Phytophthora parasitica* Dastur fueron heterotálicos debido a que no produjeron estructuras sexuales en cultivo simple, pero sí a

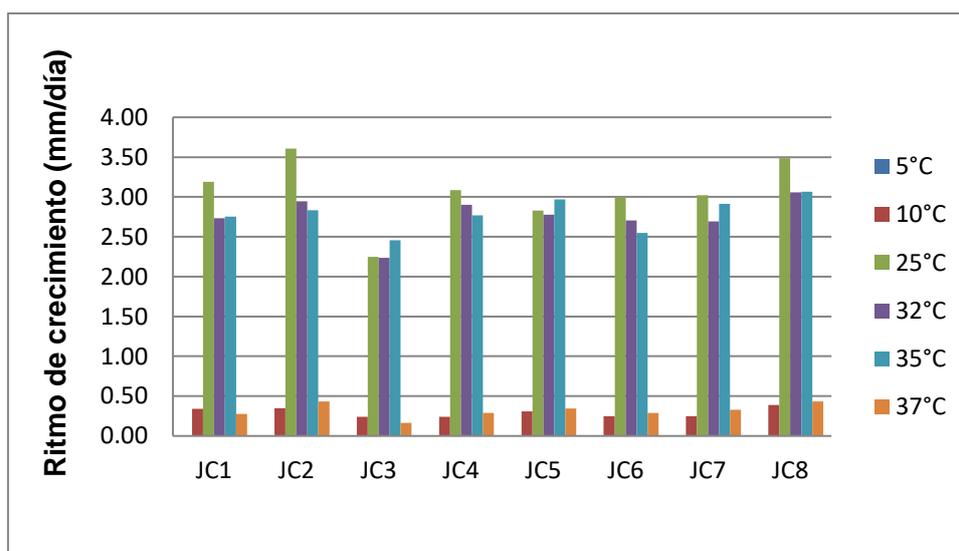
través de una hibridación interespecífica con *Phytophthora cinnamomi*. Los anteridios son anfígenos de 17.5-27.5 x 15-18.75  $\mu\text{m}$ . Los oogonios son de pared no ornamentada de 25-32  $\mu\text{m}$ . Las oosporas son apleróticas de 30.9  $\mu\text{m}$  en promedio y de 2.4  $\mu\text{m}$  de grosor de pared.

*Phytophthora nicotianae* es heterotálico. Los cuerpos sexuales se forman abundantemente en medio agar lima bean cuando los aislamientos A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> son apareados. Los anteridios son anfígenos y esencialmente redondos con diámetros alrededor de 13  $\mu\text{m}$ . Los oogonios son redondos y lisos, con diámetros alrededor de 24  $\mu\text{m}$  (23 a 30  $\mu\text{m}$ ). Las oosporas son apleróticas y con aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de diámetro (Gallery y Hong 2008).

Das *et al.* (2016) reportaron que, los aislamientos de *P. nicotianae* produjeron anteridios con tamaños que alcanzaron un rango de 17.3-7.5  $\mu\text{m}$  de largo y 16.5-9.3  $\mu\text{m}$  de ancho (11.2 $\pm$ 1.8 x 12.3 $\pm$ 1.4  $\mu\text{m}$  de promedio); oogonios enmarcados en un rango de 20.9-32.1  $\mu\text{m}$  de diámetro (26.5 $\pm$ 2.3  $\mu\text{m}$  de promedio) y oosporas en un rango de 18.8-27.9  $\mu\text{m}$  de diámetro (23.6 $\pm$ 2.2  $\mu\text{m}$  de promedio).

#### 4.3 RELACIONES DE TEMPERATURAS EN EL CRECIMIENTO MICELIAL

En todos los aislamientos, la temperatura mínima de crecimiento fue cercanamente inferior a 10 °C, el óptimo estuvo en un rango de 25 a 35 °C y la máxima cercanamente superior a 37 °C; también, se evidenció que el ritmo de crecimiento micelial a 10, 25, 32, 35 y 37 °C varió en un rango de 0.24 a 0.39, 2.25 a 3.61, 2.24 a 3.06, 2.45 a 3.06 y 0.17 a 0.43 mm/día, respectivamente (Figura 3).



**Figura 3:** Relaciones de temperatura en el ritmo de crecimiento de micelio (mm/día) de los aislamientos de *Phytophthora* en estudio, para la identificación a nivel de especie

Matheron y Matejka (1992) indican que, las tasas más altas de crecimiento de *P. citrophthora* y *P. parasitica* en medio CMA ocurrieron a 25 y 30 °C, respectivamente; asimismo, se observó un crecimiento apreciable de *P. parasitica* a 35 °C, mientras que no hubo crecimiento de *P. citrophthora* a la misma temperatura.

Hall (1993) reportó que la mayoría de los aislamientos de *P. nicotianae* detuvieron su crecimiento a 5 y 35 °C, pero aproximadamente la mitad de los cultivos murieron y unos pocos crecieron a 40 °C.

En diferentes aislamientos de *P. nicotianae*, la temperatura mínima de crecimiento micelial varía de 5 a 7 °C, el óptimo de 27 a 32 °C y el máximo de 37 °C (Erwin y Ribeiro 1996).

Javier (1998) indica que, la velocidad de crecimiento óptimo de *P. parasitica*, en medio CMA, está entre 8.42 y 8.37 mm, a una temperatura de 25 y 29 °C, respectivamente.

La temperatura óptima para el crecimiento de *P. nicotianae* está entre 24 y 32 °C; sin embargo, deja de crecer a los 36 °C (Santos *et al.* 2005).

#### **4.4 PRUEBA DE PATOGENICIDAD**

La prueba se realizó con los ocho aislamientos obtenidos (JC1, JC2, JC3, JC4, JC5, JC6, JC7 y JC8) y se evaluó la incidencia de la enfermedad (mortalidad de plantas).

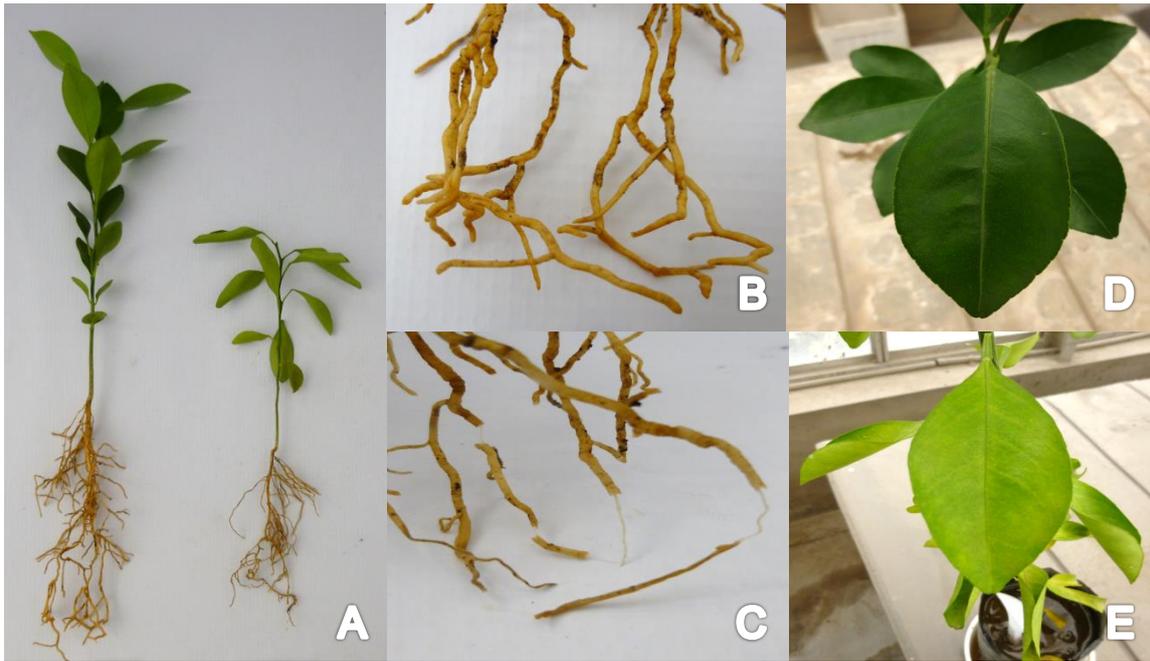
Las inoculaciones experimentales de las plantas de patrón mandarino Cleopatra, con los aislamientos JC2 y JC7, dieron resultados positivos de síntomas secundarios de la enfermedad a los 15 días. Del mismo modo, los aislamientos JC3, JC6 y JC8 también dieron positivos a la prueba de patogenicidad a los 17 días de la inoculación (Tabla 13), las plantas mostraron decaimiento gradual del vigor vegetativo, abarquillamiento foliar, clorosis de la nervadura central en hojas maduras y defoliación de hojas basales. Los síntomas primarios fueron pudrición radicular y desprendimiento de corteza con exposición del cilindro central en distintos tramos de la longitud radicular. Luego, de realizado el reaislamiento las características finales coincidieron con los aislamientos iniciales, cumpliéndose con los postulados de Koch; en consecuencia, se considera que estos aislamientos morfométricamente similares son causantes de la pudrición radicular en plantas de patrón mandarino Cleopatra (Figura 4).

Los aislamientos JC1, JC4 y JC5 no dieron síntomas secundarios de la enfermedad, pero se observó síntomas muy leves de pudrición radicular; por lo que se consideró negativo a la prueba de patogenicidad (Tabla 15).

Colburn y Graham (2007) reportaron la existencia de un aislamiento hipovirulento de *Phytophthora nicotianae* (Pn117), evidenciándose una gravedad de la enfermedad (pudrición radicular) significativamente menor en comparación con lo que produjeron los aislamientos virulentos de *P. nicotianae* (Pn198) y *P. palmivora* (Pp99), inoculados en plántulas de portainjerto mandarino Cleopatra y citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*).

**Tabla 15: Resultados de la prueba de patogenicidad de los aislamientos en estudio**

Aislamientos	Fundo de procedencia	Prueba de patogenicidad			
		Días después de la inoculación (DDI)			
		0	15	17	30
JC1	Joaquín Valverde	-	-	-	-
JC2	Rafael Morales	-	+	+	+
JC3	Rafael Morales	-	-	+	+
JC4	Rafael Morales	-	-	-	-
JC5	Tres Arbolitos	-	-	-	-
JC6	Tres Arbolitos	-	-	+	+
JC7	Hugo Pretel	-	+	+	+
JC8	Bandurria	-	-	+	+



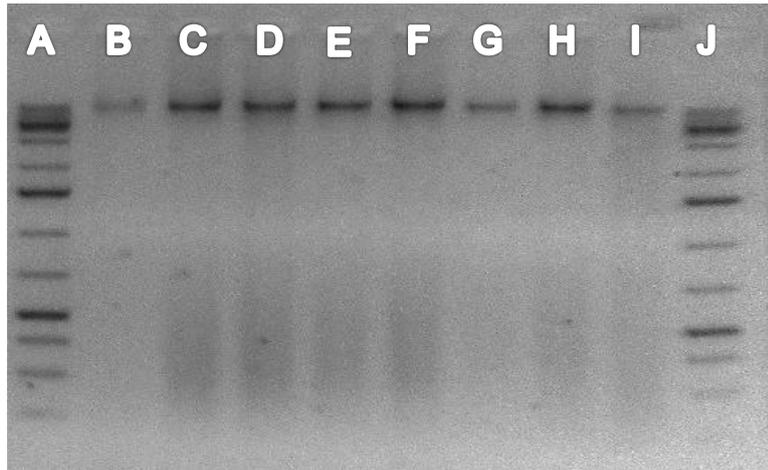
**Figura 4:** Prueba de patogenicidad. Síntomas: A) Planta sana-testigo (izquierdo) y planta enferma-inoculada (derecha), B) Raíces sanas, C) Raíces con pudrición radicular, D) Hojas sanas y E) Hojas maduras cloróticas con aclareo de nervadura central

#### 4.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Los ocho aislamientos se identificaron a través de la técnica molecular de PCR para las regiones *cox II* e *ITS*, a nivel de género y especie.

##### 4.5.1 Extracción y electroforesis de muestras de ADN

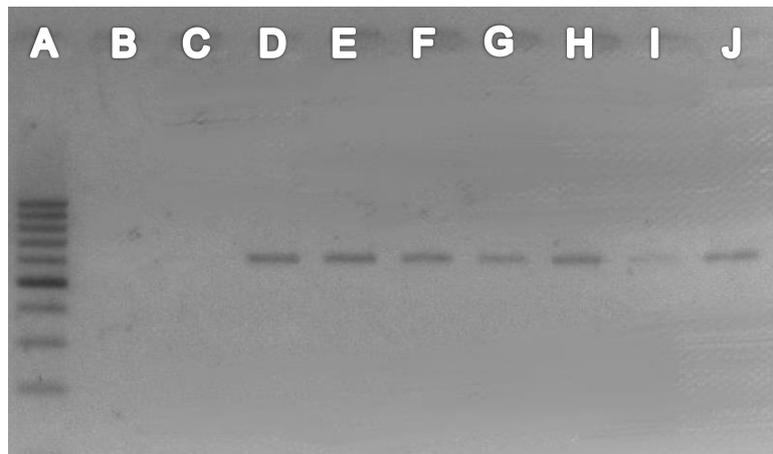
Se extrajo ADN de buena calidad de los aislamientos, observándose bandas de más de 20000 pares de bases, revelados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento (Figura 5).



**Figura 5:** Bandas integras de ADN de los aislamientos revelados por electroforesis. Leyenda: A) Marcador de peso molecular de 1 kb, B) Muestra de ADN del aislamiento JC1, C) Muestra de ADN del aislamiento JC2, D) Muestra de ADN del aislamiento JC3, E) Muestra de ADN del aislamiento JC4, F) Muestra de ADN del aislamiento JC5, G) Muestra de ADN del aislamiento JC6, H) Muestra de ADN del aislamiento JC7, I) Muestra de ADN del aislamiento JC8 y J) Marcador de peso molecular de 1 kb

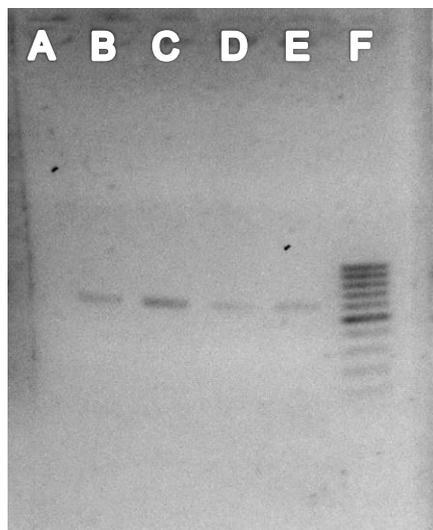
#### 4.5.2 PCR convencional

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región citocromo oxidasa II (cox II) del ADNmt, utilizando los cebadores FM58 y FM66, produjo fragmentos de ADN esperado de 600 pb aproximadamente en todos los aislamientos, excepto para el aislamiento JC1 y JC7 (amplificación débil), como se observa en la Figura 6.



**Figura 6:** Productos de amplificación por PCR de la región cox II con los cebadores FM58/FM66. Leyenda: A) Marcador de peso molecular de 100 pb, B) Control negativo, C) Muestra no amplificada del aislamiento JC1, D) Muestra del amplicón del aislamiento JC2, E) Muestra del amplicón del aislamiento JC3, F) Muestra del amplicón del aislamiento JC4, G) Muestra del amplicón del aislamiento JC5, H) Muestra del amplicón del aislamiento JC6, I) Muestra del amplicón del aislamiento JC7 y J) Muestra del amplicón del aislamiento JC8

En un segundo intento, incrementando la concentración de la muestra de ADN, se logró evidenciar claramente los productos de amplificación para los aislamientos JC1 y JC7 (Figura 7).



**Figura 7:** Evaluación complementaria de los productos de amplificación por PCR de la región *cox II*. Leyenda: A) Control negativo, B y C) Muestra del amplicón del aislamiento JC1, D y E) Muestra del amplicón del aislamiento JC7 y F) Marcador de peso molecular de 100 pb

La amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS) utilizando cebadores universales ITS6 e ITS4, produjo fragmentos de ADN de 800-900 pb de tamaño esperado (Figura 8), similar a lo descrito por Latifah *et al.* (2018).

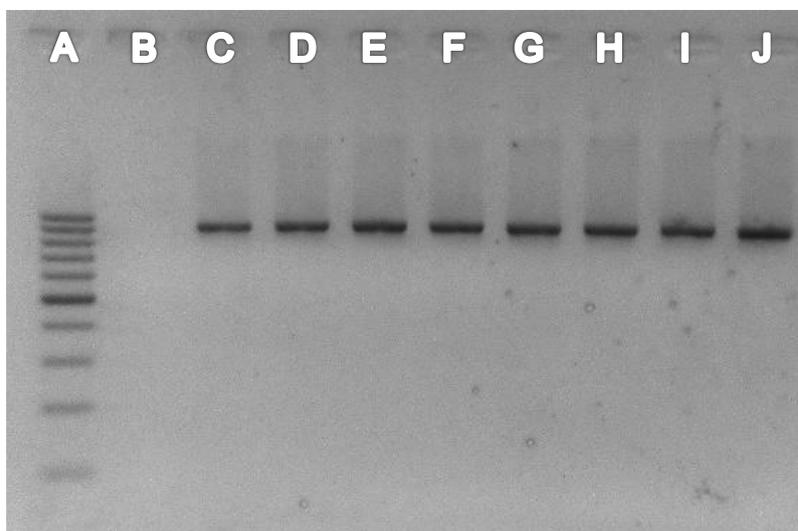
Según Cooke *et al.* (2000), indicaron que los productos de PCR con estos mismos cebadores (ITS6 / ITS4), produjeron bandas de ADN de aproximadamente 900 pb para *Phytophthora* y oomicetos relacionados.

La amplificación con los cebadores universales ITS4 e ITS6 originó productos de PCR de aproximadamente 900 pb, que se encuentra en el rango de tamaños de banda típicamente observado para *Phytophthora* (Bowman *et al.* 2007, Das *et al.* 2011).

Los amplicones de PCR de la región ITS del ADNr nuclear obtenidos de 18 aislamientos representativos de *Phytophthora* spp. (10 *P. nicotianae*, 7 *P. palmivora* y 1 *P. citrophthora*), tenían aproximadamente 900 pb, valores que estaban en el rango de tamaños de banda típicamente observados para *Phytophthora* (Das *et al.* 2016).

La identificación molecular de aislamientos patogénicos de *Phytophthora*, *Pythium* y *Phytophytium*, se realizaron por amplificación de 730-820 pb de la región del espaciador

transcrito interno (ITS) y de 563 pb de la región *cox II* del ADNmt, usando cebadores ITS6/ITS4 y FM66/FM58, respectivamente (Oviedo y Mattos 2018).



**Figura 8:** Productos de amplificación por PCR de la región ITS con los cebadores ITS6/ITS4. Leyenda: A) Marcador de peso molecular de 100 pb, B) Control negativo, C) Muestra del amplicón JC1, D) Muestra del amplicón del aislamiento JC2, E) Muestra del amplicón del aislamiento JC3, F) Muestra del amplicón del aislamiento JC4, G) Muestra del amplicón del aislamiento JC5, H) Muestra del amplicón del aislamiento JC6, I) Muestra del amplicón del aislamiento JC7 y J) Muestra del amplicón del aislamiento JC8

#### 4.5.3 Secuenciamiento y análisis filogenético

Se secuenciaron los productos de PCR de los aislamientos para las regiones *cox II* e ITS con los cebadores FM58 / FM66 e ITS6 / ITS4, respectivamente; para lo cual los valores de cuantificación superaron los 20 ng/ $\mu$ l y los valores de calidad (Qv) para la cobertura de las secuencias fueron superiores a 20 (Tabla 16).

**Tabla 16: Cuantificación de los productos de PCR y cobertura de las secuencias de los aislamientos en estudio**

Muestra	Cuantificación de PCR (ng/μl)	Tamaño en pb (Qv≥20)
JC1-cox II	42	559
JC2-cox II	35	568
JC3-cox II	38	574
JC4-cox II	50	567
JC5-cox II	59	571
JC6-cox II	69	560
JC7-cox II	48	553
JC8-cox II	71	573
JC1-ITS	101	713
JC2-ITS	120	817
JC3-ITS	110	713
JC4-ITS	113	829
JC5-ITS	105	705
JC6-ITS	106	847
JC7-ITS	119	723
JC8-ITS	115	855

Las secuencias de la región cox II del ADNmt de los ocho aislamientos se analizaron utilizando la herramienta de búsqueda BLAST del GenBank en el NCBI, confirmando la identificación para la especie *Phytophthora nicotianae* con un porcentaje de identidad del 99-100 por ciento (Tabla 17).

El análisis BLAST de las secuencias completas de la región ITS del ADNr (ITS1-5.8S-ITS2), junto con los genes de las subunidades grandes y pequeñas, de los ocho aislamientos, confirmaron la identificación para la especie *Phytophthora nicotianae* con un porcentaje de identidad del 97-100 por ciento con las secuencias de los aislamientos de *P. nicotianae* existentes en la base de datos del GenBank (Tabla 17).

Las secuencias de los aislamientos en estudio y las secuencias complementarias descargadas de la base de datos del GenBank, para la conformación de los árboles filogenéticos de la región cox II y de la región ITS, están detalladas en el anexo 21 y 22, respectivamente.

De acuerdo con Das *et al.* (2011), Das *et al.* (2016), Oviedo y Mattos (2018), la identificación morfológica y/o molecular ha evidenciado que, en la mayoría de los aislamientos obtenidos de campo, *P. nicotianae* es el principal agente causal de la pudrición radicular en cítricos.

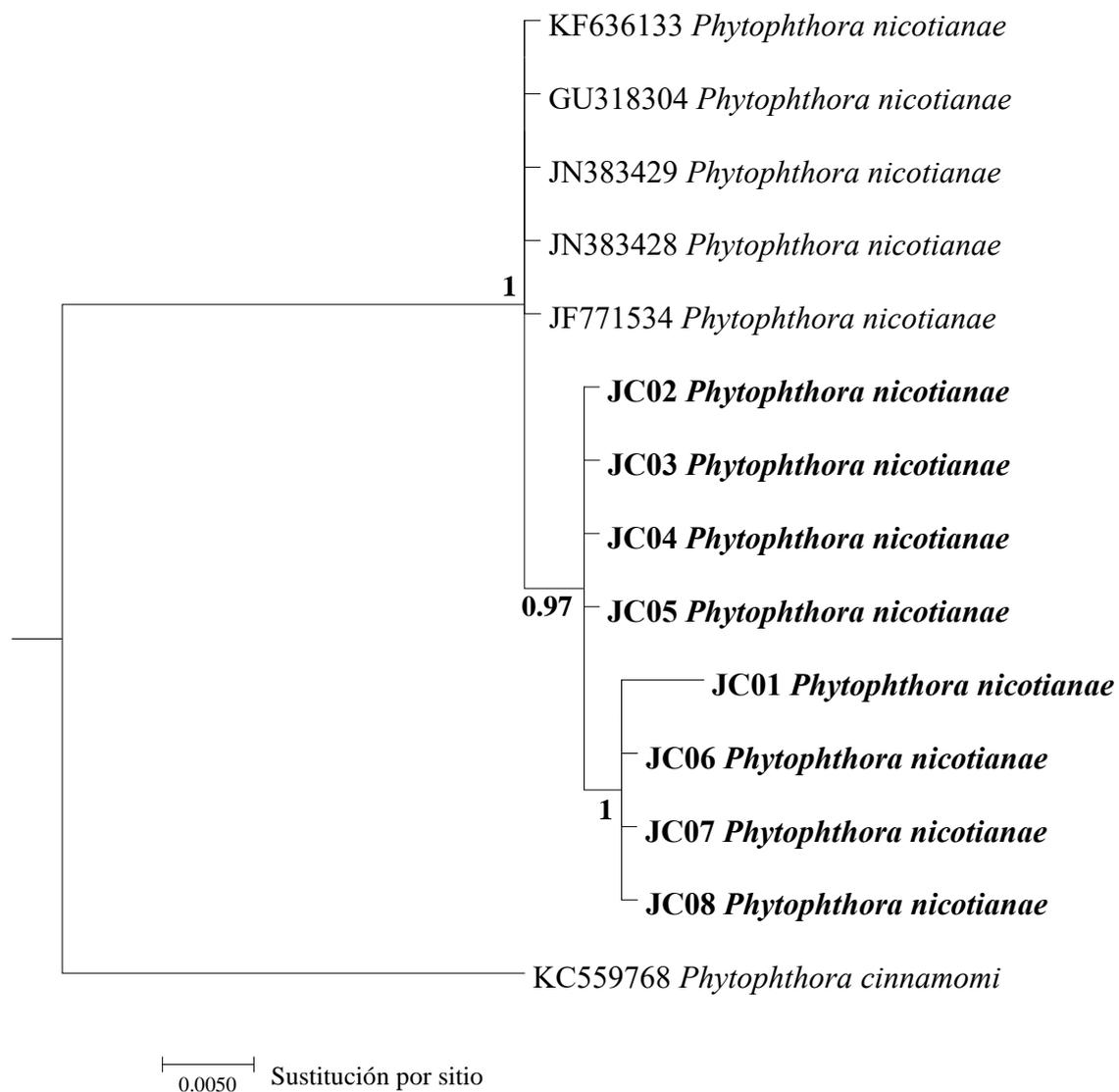
**Tabla 17: Identificación molecular de los aislamientos en estudio**

Aislamiento	Cobertura (%)	E-valor	Porcentaje de identidad (%)	Identificación
JC1-cox II	100	0.0	99.45	<i>Phytophthora nicotianae</i>
JC2-cox II	99	0.0	99.82	<i>Phytophthora nicotianae</i>
JC3-cox II	100	0.0	99.65	<i>Phytophthora nicotianae</i>
JC4-cox II	99	0.0	99.66	<i>Phytophthora nicotianae</i>
JC5-cox II	99	0.0	99.82	<i>Phytophthora nicotianae</i>
JC6-cox II	99	0.0	99.83	<i>Phytophthora nicotianae</i>
JC7-cox II	99	0.0	99.83	<i>Phytophthora nicotianae</i>
<b>JC8-cox II</b>	<b>99</b>	<b>0.0</b>	<b>100.00</b>	<b><i>Phytophthora nicotianae</i></b>
JC1-ITS	100	0.0	97.07	<i>Phytophthora nicotianae</i>
JC2-ITS	99	0.0	97.21	<i>Phytophthora nicotianae</i>
JC3-ITS	100	0.0	95.57	<i>Phytophthora nicotianae</i>
JC4-ITS	99	0.0	98.72	<i>Phytophthora nicotianae</i>
JC5-ITS	100	0.0	98.01	<i>Phytophthora nicotianae</i>
JC6-ITS	100	0.0	96.95	<i>Phytophthora nicotianae</i>
<b>JC7-ITS</b>	<b>100</b>	<b>0.0</b>	<b>100.00</b>	<b><i>Phytophthora nicotianae</i></b>
<b>JC8-ITS</b>	<b>100</b>	<b>0.0</b>	<b>100.00</b>	<b><i>Phytophthora nicotianae</i></b>

Para la construcción de los árboles filogenéticos, se utilizaron secuencias de los ocho aislamientos identificados en base a la región cox II e ITS, junto con otras secuencias complementarias tomadas del GenBank, correspondiente a especies similares a las identificadas en este estudio y la secuencia de la especie *Phytophthora cinnamomi* como grupo externo que representa la raíz en ambos árboles (Figura 9 y 10).

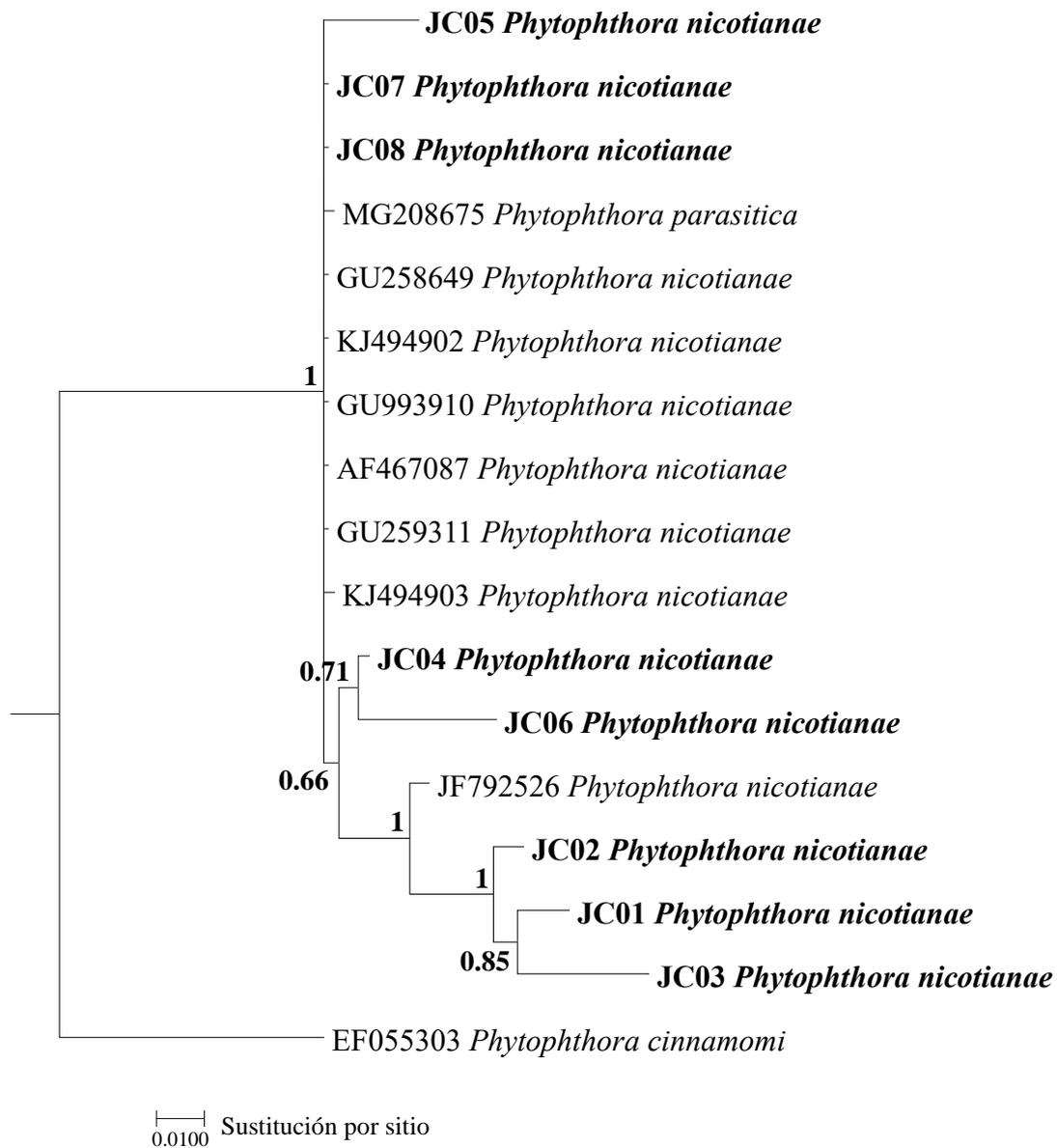
El árbol filogenético basado en la región que contiene la subunidad 2 del citocromo c oxidasa mitocondrial (cox II), mostró una cercana relación evolutiva entre los aislamientos en estudio y también con otros aislamientos complementarios tomados del GenBank. Asimismo, no se observó presencia de politomías entre las agrupaciones de *P. nicotianae*, lo que nos asegura una buena distribución de las ramas del árbol. Los valores de soporte estadístico fueron superiores a 0.95, lo que robusteció aún más el árbol y consolidó esta evidencia (Figura 9).

Martin y Tooley (2003), analizando múltiples aislamientos de nueve especies de *Phytophthora*, observaron variaciones intraespecíficas en la secuencia del gen cox II. En seis de las especies (*P. cactorum*, *P. drechsleri*, *P. erythroseptica*, *P. ilicis*, *P. infestans* y *P. nicotianae*), la variación fue baja entre los aislamientos (< 0.5 por ciento), pero se observaron tasas más altas entre los aislamientos de *P. palmivora* (0 a 1.1 por ciento), *P. megakarya* (3.4 por ciento) y *P. megasperma* (0 a 4.9 por ciento).



**Figura 9:** Árbol filogenético de los aislamientos en estudio de *P. nicotianae* en base a la región cox II del ADNmt y su relación con otros, utilizando la inferencia bayesiana (Los aislamientos en estudio están resaltados en negrita)

La topología del árbol filogenético basado en la región ITS (Figura 10) permitió visualizar una cercana relación evolutiva entre los aislamientos JC5, JC7, JC8 y los aislamientos complementarios (MG208675, GU258649, KJ494902, GU993910, AF467087, GU259311 y KJ494903) de *P. nicotianae*. Curiosamente, los aislamientos en estudio JC1, JC2, JC3, JC4 y JC6 muestran variaciones genotípicas intraespecíficas. De igual manera, no hubo politomías entre las agrupaciones y los valores de soporte estadístico robustecieron el árbol.



**Figura 10:** Árbol filogenético de los aislamientos en estudio de *P. nicotianae* (Sin. *P. parasitica*) en base a la región ITS del ADNr y su relación con otros, utilizando la inferencia bayesiana (Los aislamientos en estudio están resaltados en negrita)

## 4.6 PRUEBAS DE CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO IN VITRO

Para la prueba de control químico y biológico *in vitro*, se utilizó el aislamiento JC2 de *P. nicotianae*, por mostrarse más virulento en la prueba de patogenicidad.

### 4.6.1 Prueba de control químico *in vitro*

De acuerdo al análisis de variancia para la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* en la prueba de alimento envenenado con fungicidas, indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de  $P = <0.0001$ ) y con un coeficiente de variabilidad de 2.63 por ciento (Tabla 18). Como se observa en la Tabla 19 y en la Figura 11, la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) muestra que los tratamientos T2 (Metalaxyl), T6 (Fosetyl aluminio) y T10 (Extracto de lauráceas) son estadísticamente similares, presentando un control absoluto de inhibición del 100 por ciento, seguido por el tratamiento T9 (Ácidos urónicos) con un control de inhibición del 93.07 por ciento y los tratamientos estadísticamente similares T5 (Fosfito de calcio) y T3 (Fosfito de potasio), con un control de inhibición del 88.58 y 87.15 por ciento, respectivamente. Los tratamientos T4 (Fosfito de cobre) y T8 (Azoxystrobin) mostraron un efecto moderado de inhibición de crecimiento micelial con valores de 64.76 y 60.66 por ciento, respectivamente; mientras que, el tratamiento T7 (Nitrato de calcio) mostró el más bajo efecto de control químico *in vitro* (14.49 por ciento) en comparación con el testigo.

El tratamiento T2 (Metalaxyl) ha sido altamente tóxico para el crecimiento de micelio de *P. nicotianae in vitro*. Esto se relaciona con Farih *et al.* (1981a), quienes indican que los valores de dosis efectiva media ( $ED_{50}$ ) de metalaxyl para la inhibición del crecimiento micelial resultaron en 0.15 y 0.18 mg/l después de 3 días y en 0.04 y 0.56 mg/l después de 7 días para *P. parasitica* y *P. citrophthora*, respectivamente.

*In vitro*, la mayor inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae var. parasitica*, se registró a 10 ppm, en los tratamientos asignados a Ridomil Gold 68 WP (metalaxil 4 por ciento + mancozeb 64 por ciento) y Ridomil MZ 72 WP (metalaxil 8 por ciento + mancozeb 64 por ciento) con valores de 78.14 y 77.98 por ciento, respectivamente; mientras que, Aliette 80 WP (fosetyl-Al) mostró 11.42 por ciento de inhibición; sin embargo, los tratamientos con Ridomil Gold 68 WP y Ridomil MZ 72 WP a 25 ppm, alcanzaron el 100 por ciento de inhibición del crecimiento micelial, mientras que Aliette 80 WP mostró solo 14.9 por ciento de inhibición (Thind 2020).

Farih *et al.* (1981b) indican que fosetyl-Al no tuvo actividad altamente inhibidora del crecimiento micelial de *P. parasitica in vitro* y que los valores de ED<sub>50</sub> fueron de 1146 y 929 mg/l después de 3 y 7 días, respectivamente. Sin embargo, en este estudio, el tratamiento T6 (Fosetyl-Al) tuvo una eficacia de control del 100 por ciento frente a *P. nicotianae*, esto probablemente al efecto sinérgico de la naturaleza química intrínseca de la molécula y la reacción ácida (pH 3.64) del medio de cultivo resultante, producto de la mezcla con la formulación comercial Aliette 80 WP (Fosetyl-Al) con el medio AV8C.

En otros estudios relacionados, Lobato *et al.* (2010) señalaron que el ión fosfito disminuyó el pH en el medio de cultivo a niveles de acidez que se relacionaron con menor crecimiento de *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *Streptomyces scabies*; asimismo, la actividad microbiana del fosfito no puede atribuirse a un único motivo, sino que es el resultado de la combinación de la naturaleza del catión, la concentración del anión fosfito y la acidificación del medio. Además, el efecto de los fosfitos agregados al medio de cultivo fue explicado por King *et al.* (2010) quienes evidenciaron la modificación inducida por fosfito de potasio en la expresión de genes que codifican la síntesis de proteínas que constituyen la pared y el citoesqueleto de las células de *P. cinnamomi*, lo que originó distorsión de hifas y lisis de la pared celular.

El tratamiento T10 (mezcla de aster de monoterpenos de diferentes especies vegetales) alcanzó una eficacia de control *in vitro* del 100 por ciento en la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae*. Esto se relaciona con Quintana *et al.* (2017) quienes evidenciaron y consideraron como una alternativa viable la mezcla de terpenos de naranja, la cual mostró actividad inhibitoria del crecimiento micelial de *Alternaria tenuissima in vitro* a partir de 500 ppm, encontrando valores de concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) y concentración mínima inhibitoria (CMI) en 538 y 80946 ppm, respectivamente.

Los terpenoides extraídos del girasol (lactonas sesquiterpenos y ácidos diterpénicos) inhibieron el crecimiento del micelio *in vitro* de *Verticillium dahliae* y *Sclerotinia sclerotiorum*, a una concentración mínima inhibitoria (CMI) que oscilaron entre 10-100 ppm para *V. dahliae* y de 10-1000 ppm para *S. sclerotiorum*; pero la inhibición más efectiva del crecimiento micelial de ambos patógenos se logró mezclando los ácidos kaurenoico y angeloilgrandiflorico a la CMI de 10 ppm (Picman *et al.* 1990). Al respecto, Cotoras *et al.* (2001) indican que el diterpenoide (ácido 3β-hidroxi-kaurenoico) a una concentración de 40

mg/l, ha sido el compuesto más activo en comparación a los flavonoides, obteniendo el 38.3 por ciento de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea in vitro*.

El tratamiento T9 (Ácido urónico) alcanzó el 93.07 por ciento de inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae*. Este efecto de control probablemente se relacione con lo señalado por Biogen (2019) que los ácidos urónicos desencadenan la muerte celular de los hongos fitopatógenos por un proceso autocatalítico de acción enzimática endógenas (poligalacturonasas y pécticas) que degrada la pared celular y membranas del patógeno.

Los tratamientos T5 (Fosfito de calcio), T3 (Fosfito de potasio) y T4 (Fosfito de cobre) inhibieron significativamente el crecimiento micelial de *P. nicotianae*. Esto coincide con lo reportado por Carvalho (2014), el cual indica que el fosfito de potasio (Fitogard) inhibe el crecimiento micelial y la producción de zoosporas de *P. nicotianae* y *P. plurivora in vitro*; además, modifica la morfología de las hifas, actúa sobre la permeabilidad de la membrana y la síntesis de la pared celular del micelio de los patógenos.

En otros estudios relacionados, los aislamientos de *P. cinnamomi* obtenidos de huertos de palto, tratados con fosetyl-Al y fosfito, mostraron menor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* por el fosfito, que los aislamientos de control (Duvenhage 1994). Además, se ha observado insensibilidad *in vitro* al fosfito en aislamientos de *P. citrophthora* y *P. cinnamomi*, pero esto estaba dentro del rango observado en poblaciones naturales de los aislamientos y aún era posible el control *in vitro* con fosfito. Además, la sensibilidad *in vitro* puede no estar correlacionada con la sensibilidad in vivo del patógeno en hospedantes tratados con fosfito (Guest y Grant 1991).

El grado de disminución en el crecimiento de los microorganismos como consecuencia del ion fosfito, está determinado por el organismo ensayado, la cantidad de fosfito agregado al medio de cultivo, el tipo de ion unido al fosfito y el pH que se origine en el medio de cultivo (Lobato *et al.* 2010).

El tratamiento T8 (Azoxystrobin) tuvo un efecto significativamente menor en la inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* en comparación con el tratamiento T6 (Fosetyl-Al). Esto coincide con lo reportado por Matheron y Porchas (2000), lo cual indican que la inhibición del crecimiento micelial de *P. capsici*, *P. citrophthora* y *P. parasitica*, en medio CMA envenenado con dimetomorf, fosetyl-Al y metalaxyl, a una concentración de 1000 µg de ingrediente activo/ml, ha sido significativamente mayor en comparación con azoxystrobin y fluazinam.

Azoxystrobin tiene actividad *in vitro* en *P. parasitica*, *P. citrophthora* y *P. capsici*, esencialmente en la inhibición de la formación de esporangios y reducir la motilidad de las zoosporas (Matheron y Porchas 2000).

El tratamiento T7 (Nitrato de calcio) tuvo el efecto más bajo de inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae*. Esto se relaciona con lo reportado por Campanella *et al.* (2002) quienes indican que las sales de óxido de calcio y carbonato de calcio a la concentración de 1200 ppm, redujeron significativamente el crecimiento radial de *P. nicotianae* en comparación con las otras sales (sulfato de calcio, propionato de calcio, lactato de calcio, nitrato de calcio, acetato de calcio, pantotenato de calcio, gluconato de calcio y cloruro de calcio) y el control, *in vitro*.

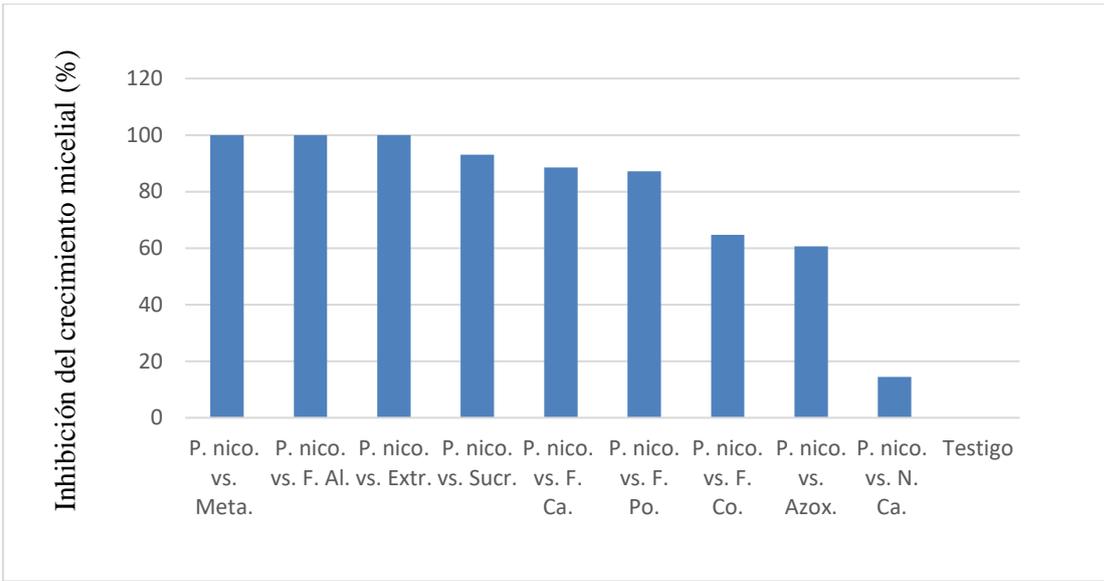
**Tabla 18: Análisis de variancia para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* en la prueba de control químico *in vitro***

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	9	23.920270	2.657808	7641.67	< 0.0001
Error	190	0.066083	0.000348		
Total	199	23.986353			

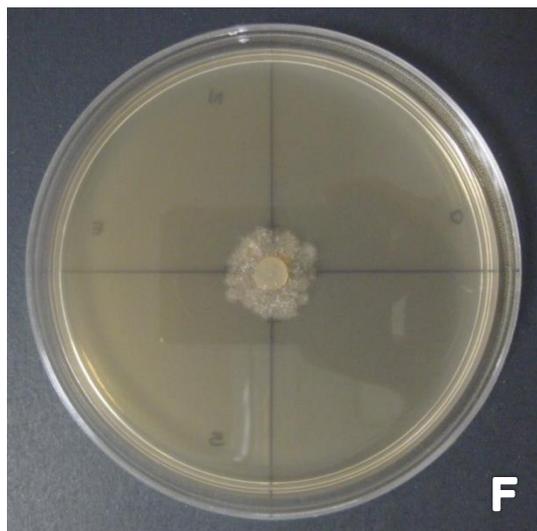
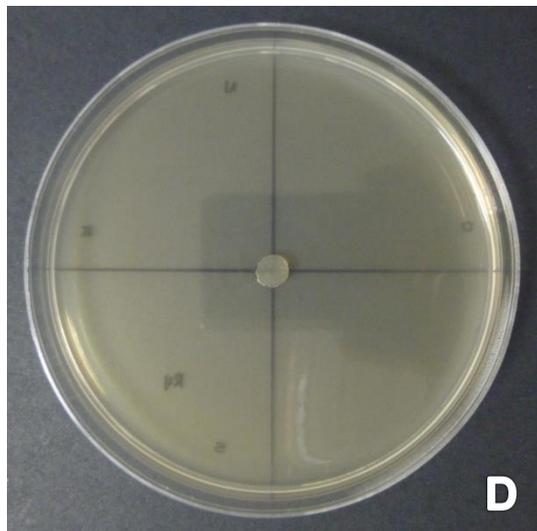
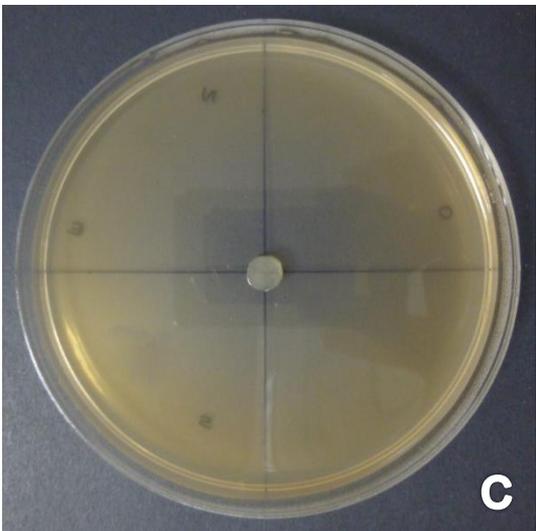
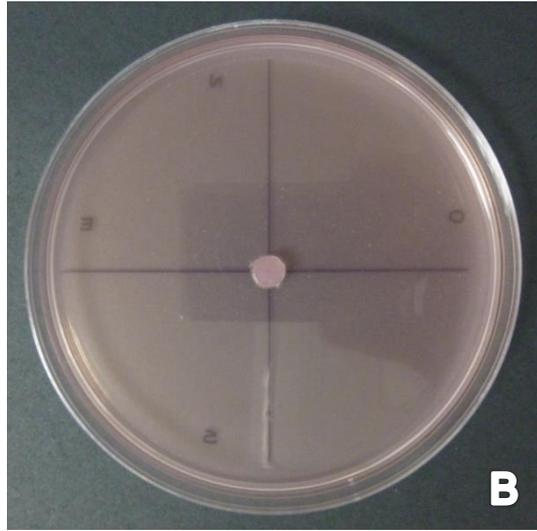
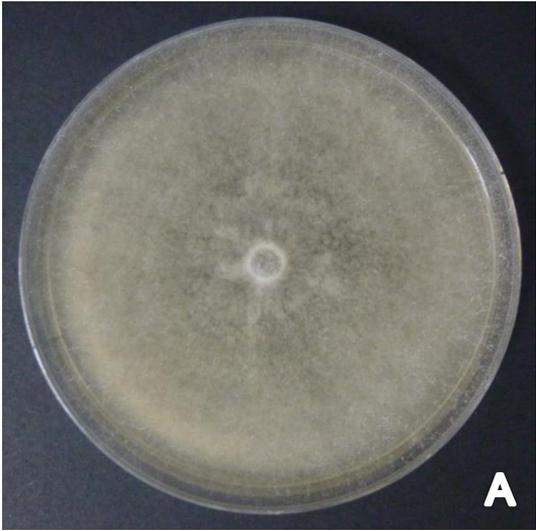
C.V. (%) = 2.63

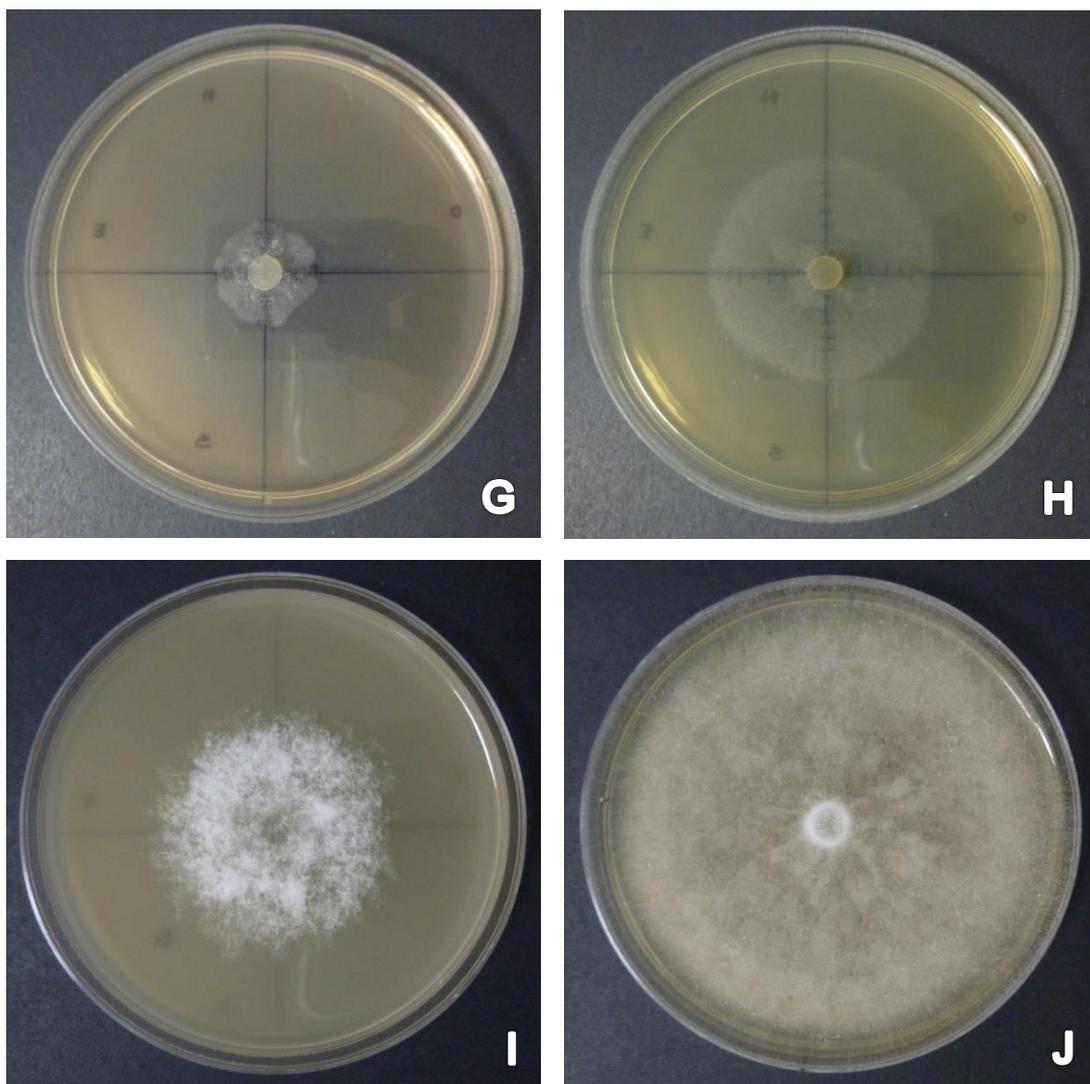
**Tabla 19: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) en la prueba de control químico de *P. nicotianae* *in vitro***

Tratamientos	Media	Agrupamiento
T2 Metalaxyl	1.0000	A
T6 Fosetyl aluminio	1.0000	A
T10 Extracto de lauráceas	1.0000	A
T9 Ácidos urónicos	0.9307	B
T5 Fosfito de calcio	0.8858	C
T3 Fosfito de potasio	0.8715	C
T4 Fosfito de cobre	0.6476	D
T8 Azoxystrobin	0.6066	E
T7 Nitrato de calcio	0.1449	F
T1 Testigo	0.0000	G



**Figura 11:** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* en la prueba de control químico *in vitro*





**Figura 12:** Prueba de alimento envenenado en el control químico de *P. nicotianae* en medio AV8C *in vitro*. Leyenda: A) T1 (Testigo – *P. nicotianae*), B) T2 (Metalaxyl), C) T6 (Fosetyl aluminio), D) T10 (Extracto de lauráceas), E) T9 (Ácidos urónicos), F) T5 (Fosfito de calcio), G) T3 (Fosfito de potasio), H) T4 (Fosfito de cobre), I) T8 (Azoxystrobin) y J) T7 (Nitrato de calcio)

#### 4.6.2 Prueba de control biológico *in vitro*

En la prueba de enfrentamiento, el análisis de variancia evidenció que los biocontroladores *T. harzianum* T22 y *B. subtilis* AP-01 inhibieron significativamente el crecimiento de micelio de *P. nicotianae* (Valor de  $P = <0.0001$ ), con un coeficiente de variabilidad del 3.51 por ciento (Tabla 20). La prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) indica que el tratamiento T2 (*T. harzianum* T22) obtuvo un valor de inhibición micelial del 61.90 por ciento, siendo esta superior y estadísticamente diferente al tratamiento T3 (*B. subtilis* AP-01) que presentó 59.37 por ciento de biocontrol, como se observa en la Tabla 21 y en la Figura 12.

En la prueba de biocontrol, el mayor porcentaje de inhibición de micelio correspondió al tratamiento con *T. harzianum* T22 (61.90 por ciento). Esto coincide con lo reportado por Benfradj *et al.* (2016) donde indican que, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* mostraron porcentajes más alto (90 por ciento) de inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* en cultivo dual *in vitro*; asimismo, los compuestos volátiles de *T. harzianum* y *T. viride* también inhibieron el crecimiento micelial con valores porcentuales de 75 y 85 por ciento, respectivamente (Benfradj *et al.* 2016). El antagonismo de *Trichoderma harzianum* T78 frente a *P. parasitica* en medio agar centeno *in vitro*, mostró un valor porcentual del 77.7 por ciento de inhibición del crecimiento micelial (Raut *et al.* 2017).

El antagonismo *in vitro* en medio jugo V-8 evidenció que *P. parasitica* ha sido inhibido significativamente por *T. virens*, *T. harzianum*, *T. viride* y *T. hamatum* con valores de 81.44, 80.78, 80.78 y 80.00 por ciento, respectivamente; asimismo, la magnitud del antagonismo de los agentes de control biológico ha sido diferente según el medio de cultivo (Gade 2012).

El tratamiento T3 (*Bacillus subtilis* AP-01) obtuvo control *in vitro* frente a *P. nicotianae* con un porcentaje de inhibición de 59.38 por ciento. Esto se relaciona con lo reportado por Shinde y Sadgir (2016) quienes indican que los aislamientos de *Bacillus subtilis* Bs-K<sub>1</sub> y Bs-K<sub>6</sub> resultaron eficaces en la inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora parasitica in vitro*, registrando valores porcentuales de 32.57 y 28.33 por ciento, respectivamente. Javier (1998) reportó que los antagonistas bacterianos *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* en condiciones *in vitro*, inhiben fuertemente el crecimiento micelial de *Phytophthora parasitica*, *Fusarium solani* y *Lasiodiplodia theobromae*.

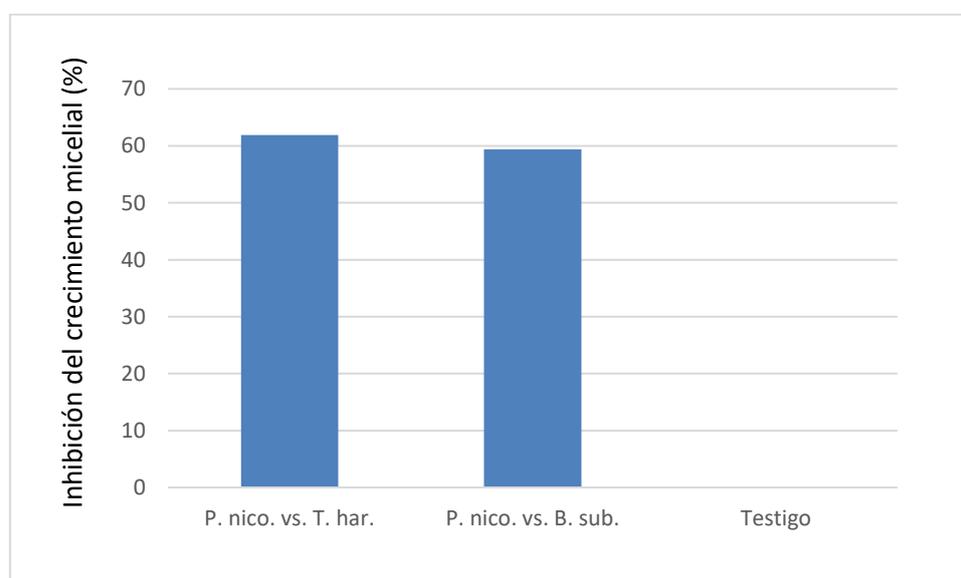
**Tabla 20: Análisis de variancia para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae* en la prueba de control biológico *in vitro***

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	2	4.908993	2.454497	12206.8	< 0.0001
Error	57	0.011461	0.000201		
Total	59	4.920455			

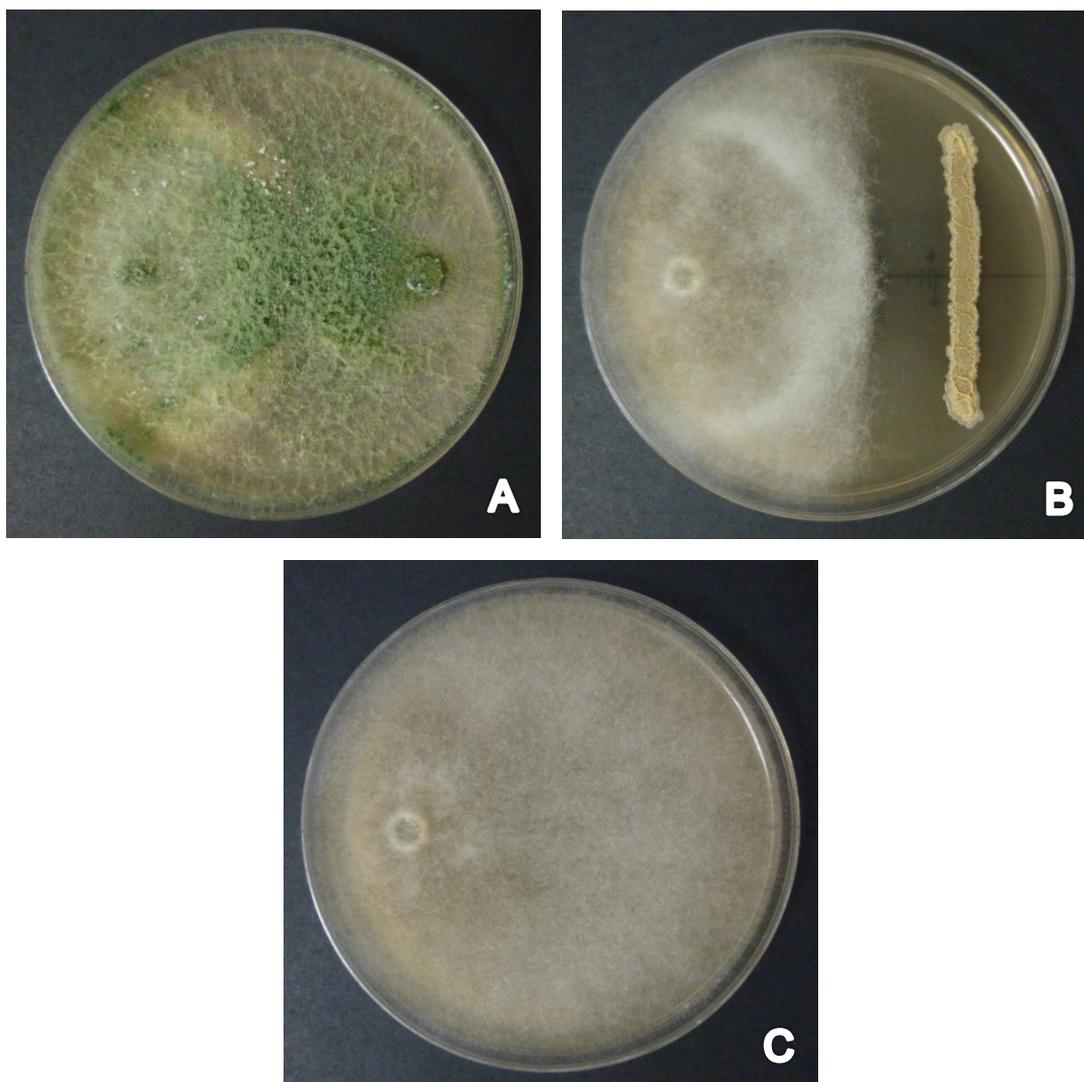
C.V. (%) = 3.51

**Tabla 21: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para la prueba de control biológico de *P. nicotianae* *in vitro***

Tratamientos	Media	Agrupamiento
T2 <i>T. harzianum</i> Cepa T22	0.6190	A
T3 <i>B. subtilis</i> AP-01	0.5938	B
T1 Testigo	0.0000	C



**Figura 13: Porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio de *P. nicotianae* en la prueba de control biológico *in vitro***



**Figura 14:** Prueba de enfrentamiento en el control biológico de *P. nicotianae* en medio AV8C *in vitro*. Leyenda: A) T2 (*T. harzianum* T22), B) T3 (*B. subtilis* AP-01) y C) T1 (Testigo – *P. nicotianae*)

#### 4.7 PRUEBA DE CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO EN INVERNADERO

Para la prueba de control químico y biológico *in vivo*, se utilizó el aislamiento JC2 de *P. nicotianae*.

##### 4.7.1 Altura de planta

El análisis de variancia (Tabla 22) para la variable altura de planta en la prueba de control químico de la pudrición radicular (datos transformados a  $\sqrt{x+1}$ ), indica que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de P = <0.0001), obteniéndose un coeficiente de variabilidad del 6.13 por ciento. En la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) se observa que los tratamientos estadísticamente similares T6 (Fosfito de calcio), T4 (Fosfito de potasio) y T10 (Ácidos urónicos), con valores biométricos 1.11, 1.03

y 0.94 cm, respectivamente, presentaron mayor crecimiento de altura de planta; mientras que los tratamientos T7 (Fosetyl aluminio), T5 (Fosfito de cobre), T11 (Extracto de lauráceas) y T2 (Testigo inoculado) que son estadísticamente similares, presentaron valores biométricos de altura de planta más bajos, como se muestra en el Tabla 23 y Figura 13.

Los tratamientos T3 (Metalaxyl) y T7 (Fosetyl-Al) no presentaron diferencias estadísticas significativa. Esto se relaciona con lo reportado por Sandler *et al.* (1998) quienes indican que, al principio los árboles de naranjo dulce, asignados al tratamiento con metalaxyl eran significativamente más altos; sin embargo, al final del experimento no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con fosetyl-Al y metalaxyl en comparación al tratamiento control en huertos naturalmente infestados con *P. parasitica*.

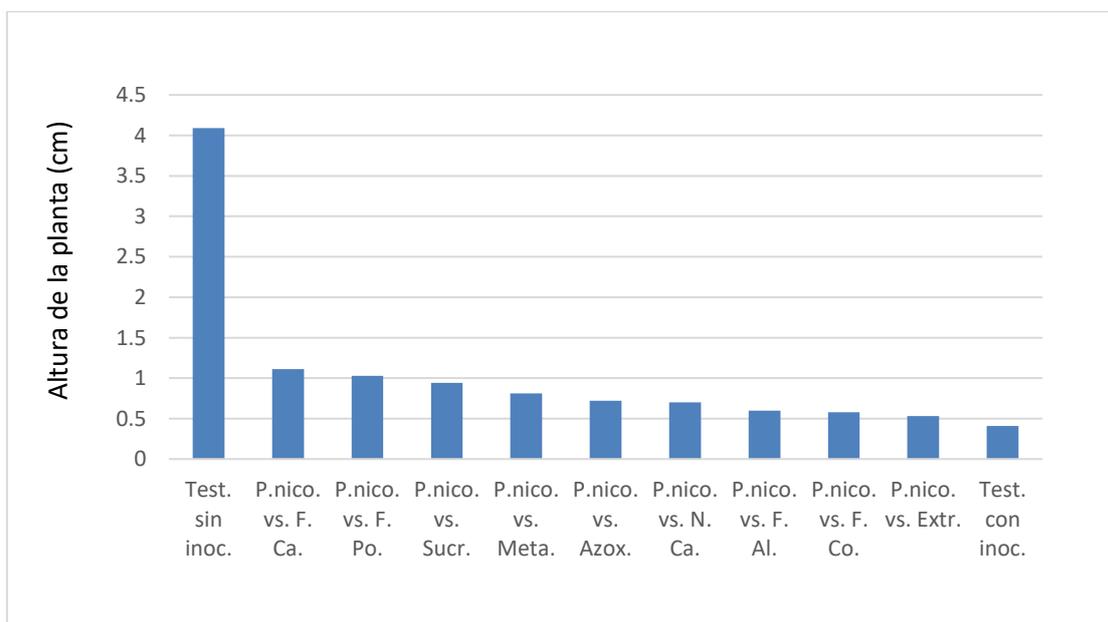
*In vivo*, las plántulas de naranjo agrio tratados con óxido de calcio y propionato de calcio mostraron valores más altos de altura de canopia, peso fresco de canopia y peso seco de raíz en comparación con otras sales (pantotenato de calcio, cloruro de calcio, nitrato de calcio, lactato de calcio, gluconato de calcio, acetato de calcio, carbonato de calcio y sulfato de calcio) y el control, inoculados con *P. nicotianae* (Campanella *et al.* 2002).

**Tabla 22: Análisis de variancia para altura de planta (cm) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

<b>Fuente de variación</b>	<b>G.L.</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Valor-F</b>	<b>Valor-P</b>
Tratamientos	10	16.962585	1.696259	229.98	< 0.0001
Error	209	1.541490	0.007376		
Total	219	18.504075			
C.V. (%) = 6.13					

**Tabla 23: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para altura de planta (cm) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

	Tratamientos	Media	Media transformada	Agrupamiento
T1	Testigo sin inóculo	4.09	2.24	A
T6	Fosfito de calcio	1.11	1.45	B
T4	Fosfito de potasio	1.03	1.42	B C
T10	Ácidos urónicos	0.94	1.39	B C D
T3	Metalaxyl	0.81	1.34	C D E
T9	Azoxystrobin	0.72	1.31	D E F
T8	Nitrato de calcio	0.70	1.30	D E F
T7	Fosetyl aluminio	0.60	1.26	E F G
T5	Fosfito de cobre	0.58	1.26	E F G
T11	Extracto de lauráceas	0.53	1.24	F G
T2	Testigo inoculado	0.41	1.19	G



**Figura 15: Comparativo de promedios de altura de plantas (cm) en los tratamientos de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

De acuerdo al análisis de variancia (Tabla 24) para la variable altura de planta en la prueba de control biológico de la pudrición radicular (datos transformados a  $\sqrt{x+1}$ ), existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de P = <0.0001), con un coeficiente de variabilidad del 8.19 por ciento. Al realizarse la prueba de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) se observó que los tratamientos T4 (*B. subtilis* AP-01) y T3 (*T. harzianum* T22) son estadísticamente similares, con valores superiores de altura de planta con respecto al tratamiento T2 (Testigo inoculado) y con valores inferiores al tratamiento T1 (Testigo no inoculado), como se observa en la Tabla 25 y Figura 14.

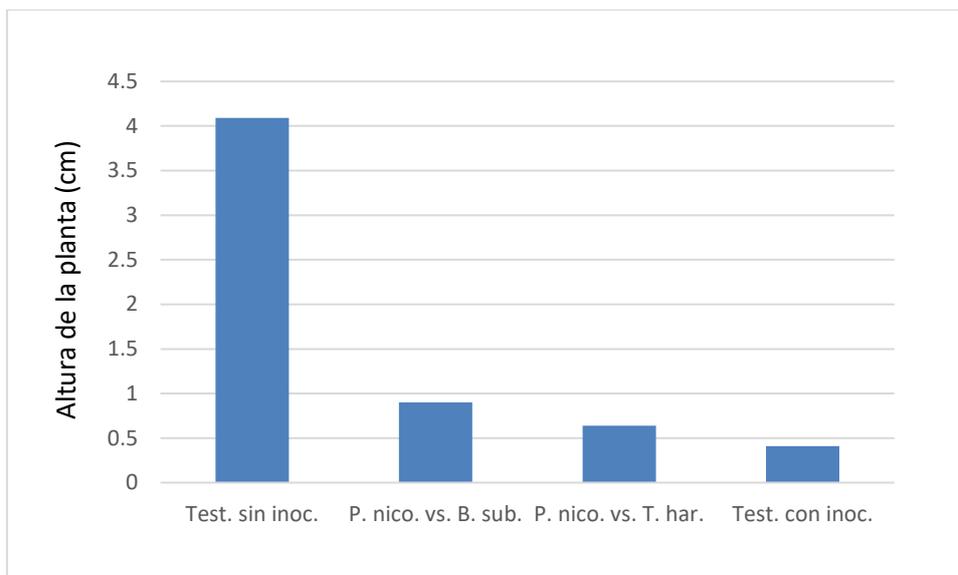
**Tabla 24: Análisis de variancia para altura de planta (cm) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero**

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	3	14.291368	4.763789	306.86	< 0.0001
Error	76	1.179866	0.015525		
Total	79	15.471234			

C.V. (%) = 8.19

**Tabla 25: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para altura de planta (cm) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero**

Tratamientos	Media	Media transformada	Agrupamiento
T1 Test. sin inóculo	4.09	2.24	A
T4 <i>B. subtilis</i> AP-01	0.90	1.38	B
T3 <i>T. harzianum</i> Cepa T22	0.64	1.28	B C
T2 Test. inoculado	0.41	1.19	C



**Figura 16:** Comparativo de promedios de altura de plantas (cm) en los tratamientos de control biológico de la pudrición radicular en invernadero

#### 4.7.2 Peso fresco de la planta

En concordancia con el análisis de variancia (Tabla 26) para la variable peso fresco de la planta en la prueba de control químico de la pudrición radicular, existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de  $P = <0.0001$ ), exhibiendo un coeficiente de variabilidad de 9.62 por ciento. En la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), se puede observar que los tratamientos estadísticamente similares T6 (Fosfito de calcio), T4 (Fosfito de potasio) y T10 (Ácidos urónicos), con valores biométricos de 13.95, 13.58 y 13.29 g, respectivamente, presentaron mayor peso fresco de la planta; mientras que, los tratamientos T7 (Fosetyl aluminio), T8 (Nitrato de calcio), T5 (Fosfito de cobre), T11 (Extracto de lauráceas) y T2 (Testigo inoculado) que son estadísticamente similares, presentaron valores más bajos, como se muestra en la Tabla 27 y Figura 15.

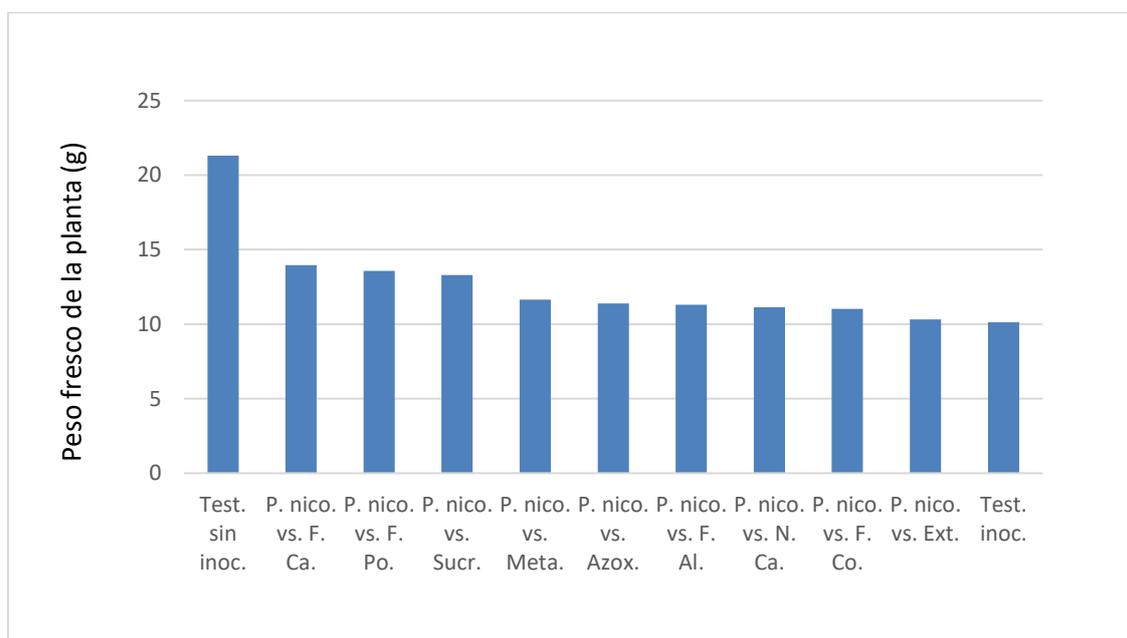
**Tabla 26: Análisis de variancia para peso fresco de la planta (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	10	1980.6610	198.0661	134.08	< 0.0001
Error	209	308.7395	1.477222		
Total	219	2289.4005			

C.V. (%) = 9.62

**Tabla 27: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso fresco de la planta (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

Tratamientos	Media	Agrupamiento
T1 Testigo sin inóculo	21.30	A
T6 Fosfito de calcio	13.95	B
T4 Fosfito de potasio	13.58	B
T10 Ácidos urónicos	13.29	B
T3 Metalaxyl	11.64	C
T9 Azoxystrobin	11.38	C D
T7 Fosetyl aluminio	11.31	C D E
T8 Nitrato de calcio	11.13	C D E
T5 Fosfito de cobre	11.02	C D E
T11 Extracto de lauráceas	10.31	D E
T2 Testigo inoculado	10.12	E



**Figura 17: Comparativo de promedios de peso fresco de plantas (g) en los tratamientos de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

El análisis de variancia para el peso fresco de la planta en la prueba de control biológico de la pudrición radicular (Tabla 28), demostró que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de P = <0.0001), obteniéndose un coeficiente de variabilidad de 8.31 por ciento. En la tabla comparativo de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), la media del tratamiento T4 (*B. subtilis* AP-01) alcanzó un valor biométrico de 14.25 g, siendo esta superior y estadísticamente diferente a los tratamientos T3 (*T. harzianum* T22) y T2 (Testigo inoculado), como se visualiza en la Tabla 29 y Figura 16.

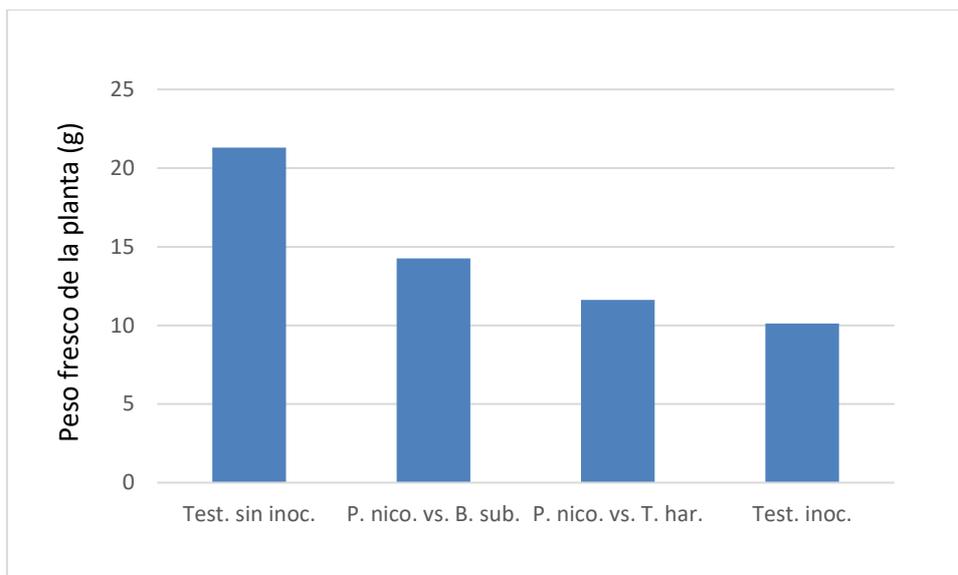
**Tabla 28: Análisis de variancia para peso fresco de la planta (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero**

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	3	1472.011375	490.670458	346.69	< 0.0001
Error	76	107.562500	1.415296		
Total	79	1579.573875			

C.V. (%) = 8.31

**Tabla 29: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso fresco de la planta (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero**

Tratamientos	Media	Agrupamiento
T1 Test. sin inóculo	21.30	A
T4 <i>B. subtilis</i> AP-01	14.25	B
T3 <i>T. harzianum</i> Cepa T22	11.63	C
T2 Test. inoculado	10.12	D



**Figura 18:** Comparativo de promedios de peso fresco de plantas (g) en los tratamientos de control biológico de la pudrición radicular en invernadero

#### 4.7.3 Peso seco de la planta

El análisis de variancia para el peso seco de la planta en la prueba de control químico de la pudrición radicular, indica que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de  $P = <0.0001$ ), con un coeficiente de variabilidad de 8.41 por ciento (Tabla 30). En la prueba de comparación de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), se observa que la media de los tratamientos estadísticamente similares T6 (Fosfito de calcio), T4 (Fosfito de potasio) y T10 (Ácidos urónicos), con valores biométricos de 6.94, 6.78 y 6.66 g, respectivamente, mostraron mayor peso seco de la planta; seguido por los tratamientos estadísticamente similares T3 (Metalaxyl), T9 (Azoxystrobin), T7 (Fosetyl aluminio), T8 (Nitrato de calcio) y T5 (Fosfito de cobre) con valores de 5.33, 5.26, 5.16, 5.09 y 5.01 g, respectivamente. Por contrario, los tratamientos T11(Extracto de lauráceas) y T2 (Testigo inoculado), estadísticamente similares, presentaron valores más bajos, como se muestra en la Tabla 31 y Figura 17.

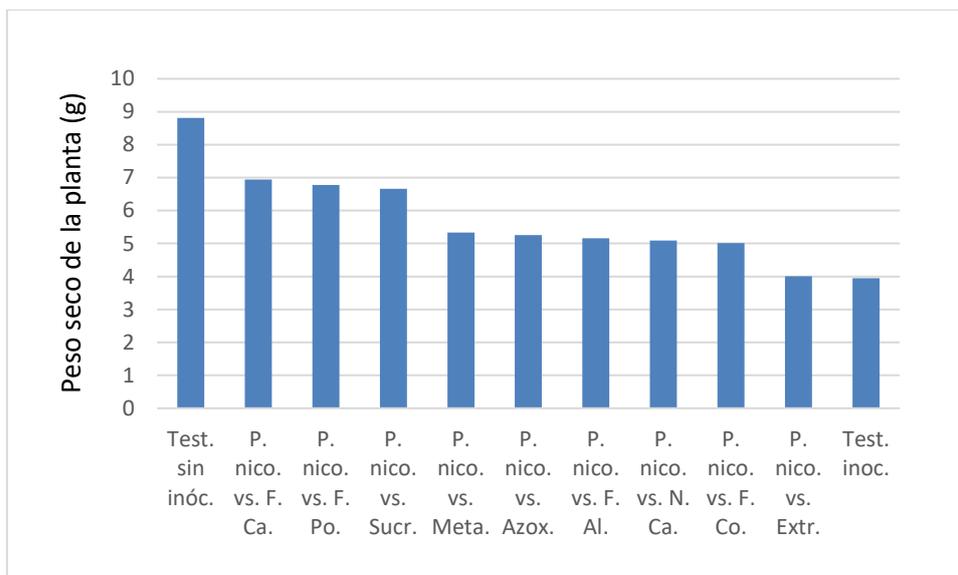
**Tabla 30: Análisis de variancia para peso seco de la planta (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	10	414.887525	41.488753	178.85	< 0.0001
Error	209	48.482710	0.231975		
Total	219	463.370235			

C.V. (%) = 8.41

**Tabla 31: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso seco de la planta (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

Tratamientos	Media	Agrupamiento
T1 Testigo sin inóculo	8.81	A
T6 Fosfito de calcio	6.94	B
T4 Fosfito de potasio	6.78	B
T10 Ácidos urónicos	6.66	B
T3 Metalaxyl	5.33	C
T9 Azoxystrobin	5.26	C
T7 Fosetyl aluminio	5.16	C
T8 Nitrato de calcio	5.09	C
T5 Fosfito de cobre	5.01	C
T11 Extracto de lauráceas	4.01	D
T2 Testigo inoculado	3.95	D



**Figura 19:** Comparativo de promedios de peso seco de plantas (g) en los tratamientos de control químico de la pudrición radicular en invernadero

El análisis de variancia para el peso seco de la planta en la prueba de control biológico de la pudrición radicular (Tabla 32), demostró que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de  $P = <0.0001$ ), exponiendo un coeficiente de variabilidad de 8.61 por ciento. En la tabla comparativo de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), la media del tratamiento T4 (*B. subtilis* AP-01) alcanzó un valor biométrico de 5.12 g, siendo esta superior y estadísticamente diferente a los tratamientos T3 (*T. harzianum* T22) y T2 (Testigo inoculado), como se visualiza en la Tabla 33 y Figura 18.

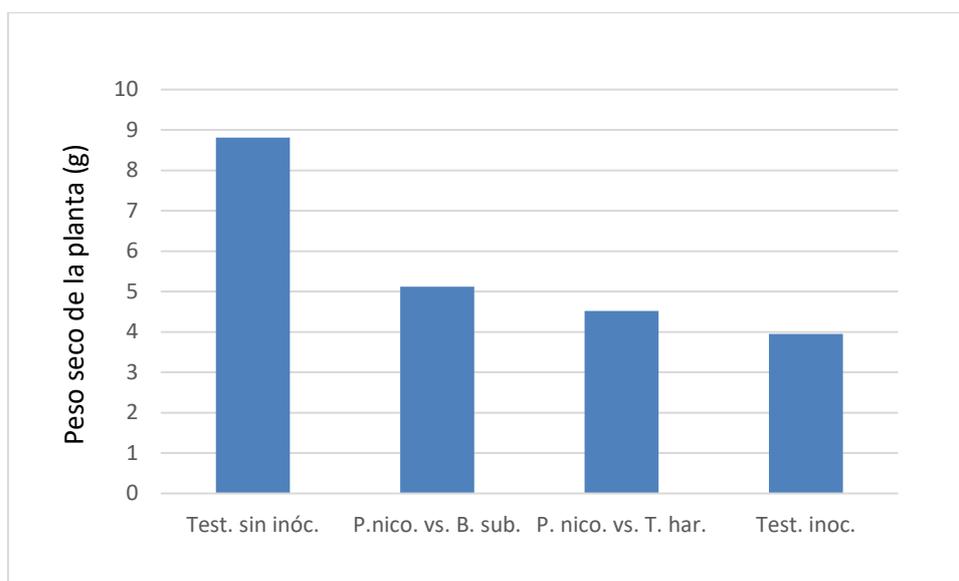
**Tabla 32:** Análisis de variancia para peso seco de la planta (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	3	289.383614	96.461205	414.67	< 0.0001
Error	76	17.679275	0.232622		
Total	79	307.062889			

C.V. (%) = 8.61

**Tabla 33: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso seco de la planta (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero**

	Tratamientos	Media	Agrupamiento
T1	Test. sin inóculo	8.81	A
T4	<i>B. subtilis</i> AP-01	5.12	B
T3	<i>T. harzianum</i> Cepa T22	4.52	C
T2	Test. inoculado	3.95	D



**Figura 20:** Comparativo de promedios de peso seco de plantas (g) en los tratamientos de control biológico de la pudrición radicular en invernadero

#### 4.7.4 Peso fresco de raíces

De acuerdo con el análisis de variancia (Tabla 34), existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de  $P = <0.0001$ ), exhibiendo un coeficiente de variabilidad de 9.08 por ciento. En la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), se puede observar que los tratamientos estadísticamente similares T6 (Fosfito de calcio), T4 (Fosfito de potasio), T10 (Ácidos urónicos) y T3 (Metalaxyl), con valores biométricos de 4.17, 4.05, 3.85 y 3.83 g, respectivamente, presentaron mayor peso fresco de la planta; mientras que los tratamientos T11 (Extracto de lauráceas) y T2 (Testigo inoculado) que son estadísticamente similares, presentaron valores más bajos, como se muestra en la Tabla 35 y Figura 19.

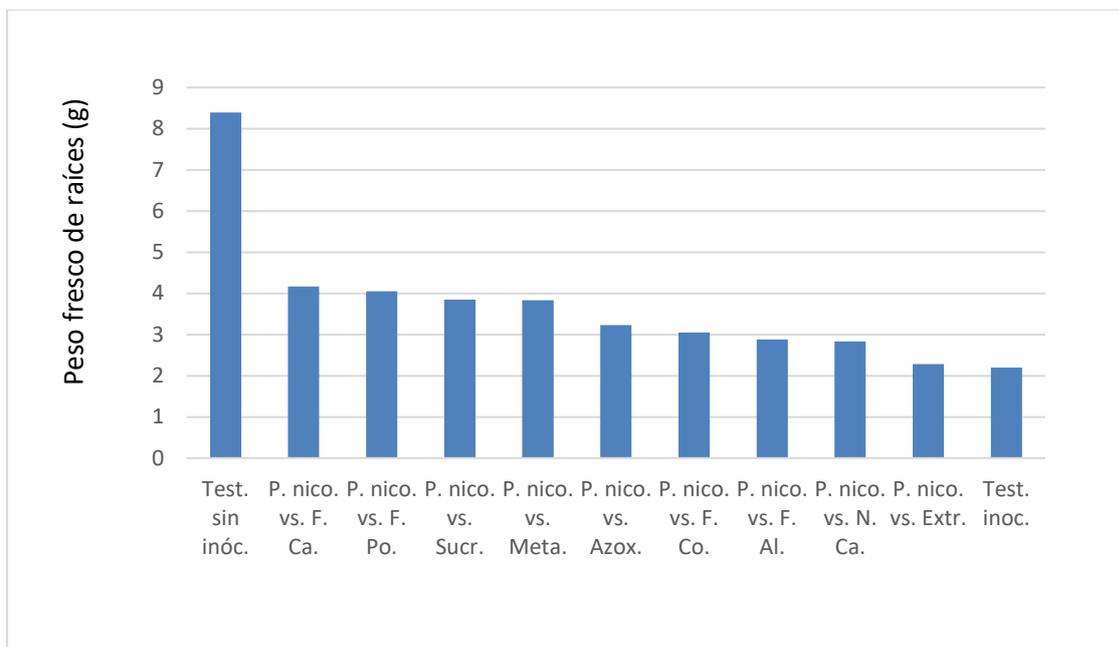
**Tabla 34: Análisis de variancia para peso fresco de raíces (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	10	575.038251	57.503825	508.10	< 0.0001
Error	209	23.653220	0.113173		
Total	219	598.691471			

C.V. (%) = 9.08

**Tabla 35: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso fresco de raíces (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

	Tratamientos	Media	Agrupamiento
T1	Testigo sin inóculo	8.39	A
T6	Fosfito de calcio	4.17	B
T4	Fosfito de potasio	4.05	B
T10	Ácidos urónicos	3.85	B
T3	Metalaxyl	3.83	B
T9	Azoxystrobin	3.23	C
T5	Fosfito de cobre	3.05	C D
T7	Fosetyl aluminio	2.88	D
T8	Nitrato de calcio	2.83	D
T11	Extracto de lauráceas	2.28	E
T2	Testigo inoculado	2.20	E



**Figura 21:** Comparativo de promedios de peso fresco de raíces (g) en los tratamientos de control químico de la pudrición radicular en invernadero

Según el análisis de variancia para el peso fresco de raíces en la prueba de control biológico de la pudrición radicular (Tabla 36), indica que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de  $P = <0.0001$ ), con un coeficiente de variabilidad de 8.34 por ciento. En la tabla comparativo de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), la media del tratamiento T4 (*B. subtilis* AP-01) tuvo un valor biométrico de 4.66 g, siendo esta superior y estadísticamente diferente a los tratamientos T3 (*T. harzianum* T22) y T2 (Testigo inoculado), como se puede observar en la Tabla 37 y Figura 20.

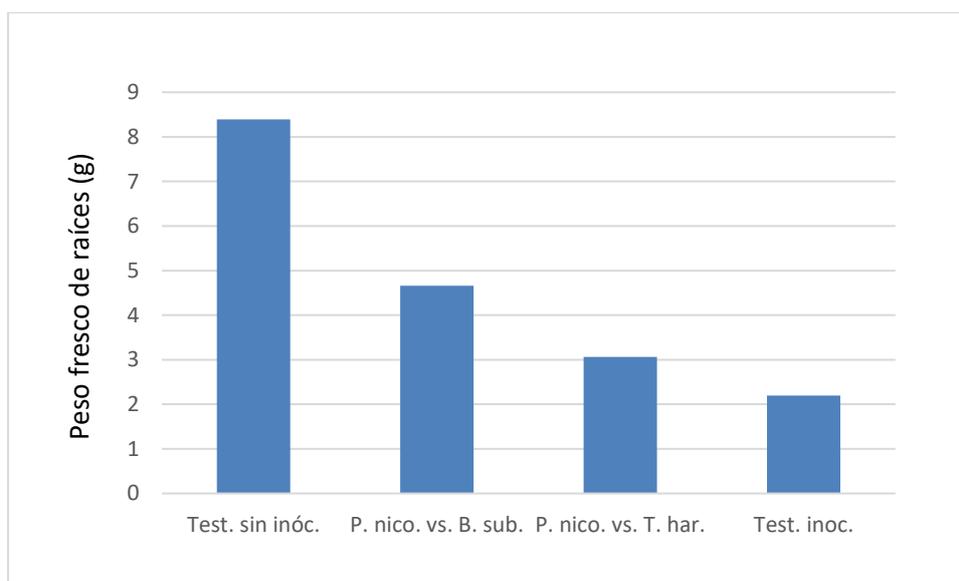
**Tabla 36: Análisis de variancia para peso fresco de raíces (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero**

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	3	450.354085	150.118028	1028.91	< 0.0001
Error	76	11.088390	0.145900		
Total	79	461.442475			

C.V. (%) = 8.34

**Tabla 37: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso fresco de raíces (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero**

	Tratamientos	Media	Agrupamiento
T1	Test. sin inóculo	8.39	A
T4	<i>B. subtilis</i> AP-01	4.66	B
T3	<i>T. harzianum</i> Cepa T22	3.06	C
T2	Test. inoculado	2.20	D



**Figura 22:** Comparativo de promedios de peso fresco de raíces (g) en los tratamientos de control biológico de la pudrición radicular en invernadero

#### 4.7.5 Peso seco de raíces

El análisis de variancia para el peso seco de raíces, en la prueba de control químico, indica que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de  $P = <0.0001$ ), con un coeficiente de variabilidad de 8.20 por ciento (Tabla 38). En la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), se observa que los tratamientos estadísticamente similares T6 (Fosfito de calcio), T4 (Fosfito de potasio) y T10 (Ácidos urónicos), con valores biométricos de 1.33, 1.29 y 1.25 g, respectivamente, mostraron mayor peso seco de raíces; seguido por los tratamientos estadísticamente similares T3 (Metalaxyl), T9 (Azoxystrobin), T5 (Fosfito de cobre) y T7 (Fosetyl aluminio) con valores de 1.09, 1.08, 1.03 y 1.02 g, respectivamente. Por contrario, los tratamientos T11(Extracto de lauráceas)

y T2 (Testigo inoculado), estadísticamente similares, presentaron valores más bajos, como se muestra en la Tabla 39 y Figura 21.

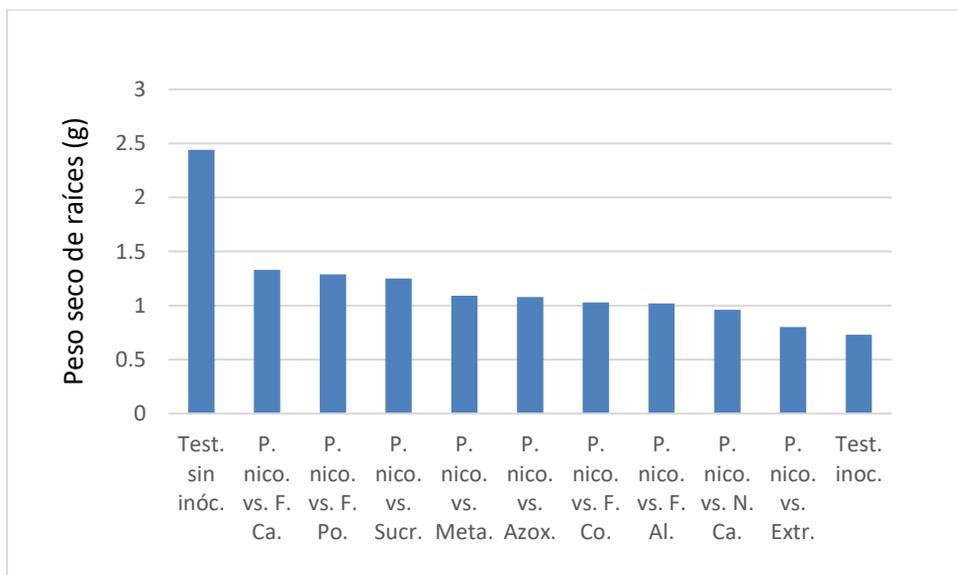
**Tabla 38: Análisis de variancia para peso seco de raíces (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

<b>Fuente de variación</b>	<b>G.L.</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Valor-F</b>	<b>Valor-P</b>
Tratamientos	10	41.763315	4.176331	444.91	< 0.0001
Error	209	1.961865	0.009387		
Total	219	43.725180			

C.V. (%) = 8.20

**Tabla 39: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso seco de raíces (g) en la prueba de control químico de la pudrición radicular en invernadero**

	<b>Tratamientos</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupamiento</b>
T1	Testigo sin inóculo	2.44	A
T6	Fosfito de calcio	1.33	B
T4	Fosfito de potasio	1.29	B
T10	Ácidos urónicos	1.25	B
T3	Metalaxyl	1.09	C
T9	Azoxystrobin	1.08	C
T5	Fosfito de cobre	1.03	C D
T7	Fosetyl aluminio	1.02	C D
T8	Nitrato de calcio	0.96	D
T11	Extracto de lauráceas	0.80	E
T2	Testigo inoculado	0.73	E



**Figura 23:** Comparativo de promedios de peso seco de raíces (g) en los tratamientos de control químico de la pudrición radicular en invernadero

El análisis de variancia para el peso seco de la planta en la prueba de control biológico de la pudrición radicular (Tabla 40), demostró que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de  $P = <0.0001$ ), exponiendo un coeficiente de variabilidad de 7.92 por ciento. En la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), el tratamiento T4 (*B. subtilis* AP-01) presentó un valor biométrico de 1.32 g, siendo esta superior y estadísticamente diferente a los tratamientos T3 (*T. harzianum* T22) y T2 (Testigo inoculado), como se muestra en la Tabla 41 y Figura 22.

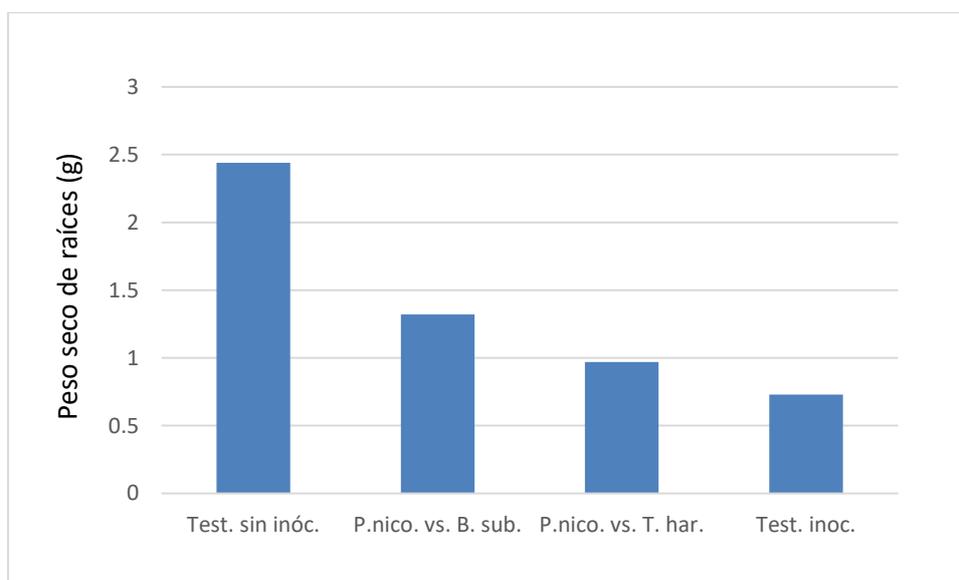
**Tabla 40:** Análisis de variancia para peso seco de raíces (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	3	34.390744	11.463581	988.23	< 0.0001
Error	76	0.881605	0.011600		
Total	79	35.272349			

C.V. (%) = 7.91

**Tabla 41: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para peso seco de raíces (g) en la prueba de control biológico de la pudrición radicular en invernadero**

	Tratamientos	Media	Agrupamiento
T1	Test. sin inóculo	2.44	A
T4	<i>B. subtilis</i> AP-01	1.32	B
T3	<i>T. harzianum</i> Cepa T22	0.97	C
T2	Test. inoculado	0.73	D



**Figura 24:** Comparativo de promedios de peso seco de raíces (g) en los tratamientos de control biológico de la pudrición radicular en invernadero

#### 4.7.6 Severidad de la pudrición radicular

El análisis de variancia (Tabla 42) para la severidad de la pudrición radicular en la prueba de control químico (datos transformados a  $\sqrt{x+1}$ ), indica que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de  $P = <0.0001$ ), obteniéndose un coeficiente de variabilidad de 5.59 por ciento. En la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) se evidenció que los tratamientos estadísticamente similares T2 (Testigo inoculado), T11 (Extracto de lauráceas) T7 (Fosetyl aluminio) y T5 (Fosfito de cobre), mostraron altos porcentajes de severidad de pudrición radicular, tales como 97.30, 82.15, 78.65 y 78.35 por ciento, respectivamente; mientras que, los tratamientos estadísticamente similares T3 (Metalaxyl), T10 (Ácidos urónicos), T4 (Fosfito de potasio) y T6 (Fosfito de calcio),

mostraron bajos valores porcentuales de severidad de la enfermedad, tales como 68.85, 60.55, 55.60 y 52.10 por ciento, respectivamente; en consecuencia, mayor eficacia de control de la pudrición radicular causada por *P. nicotianae* (Tabla 43 y Figura 23).

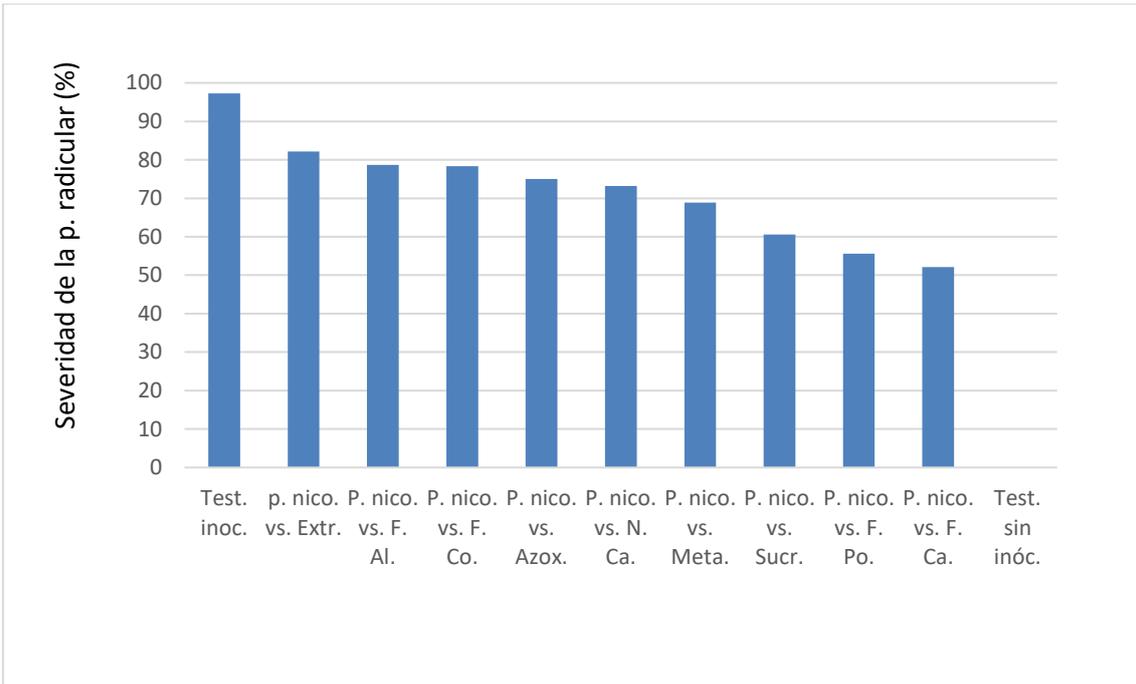
**Tabla 42: Análisis de variancia para el porcentaje de severidad de la pudrición radicular en la prueba de control químico en invernadero**

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	10	2.227212	0.222721	43.54	< 0.0001
Error	209	1.069219	0.005116		
Total	219	3.296431			

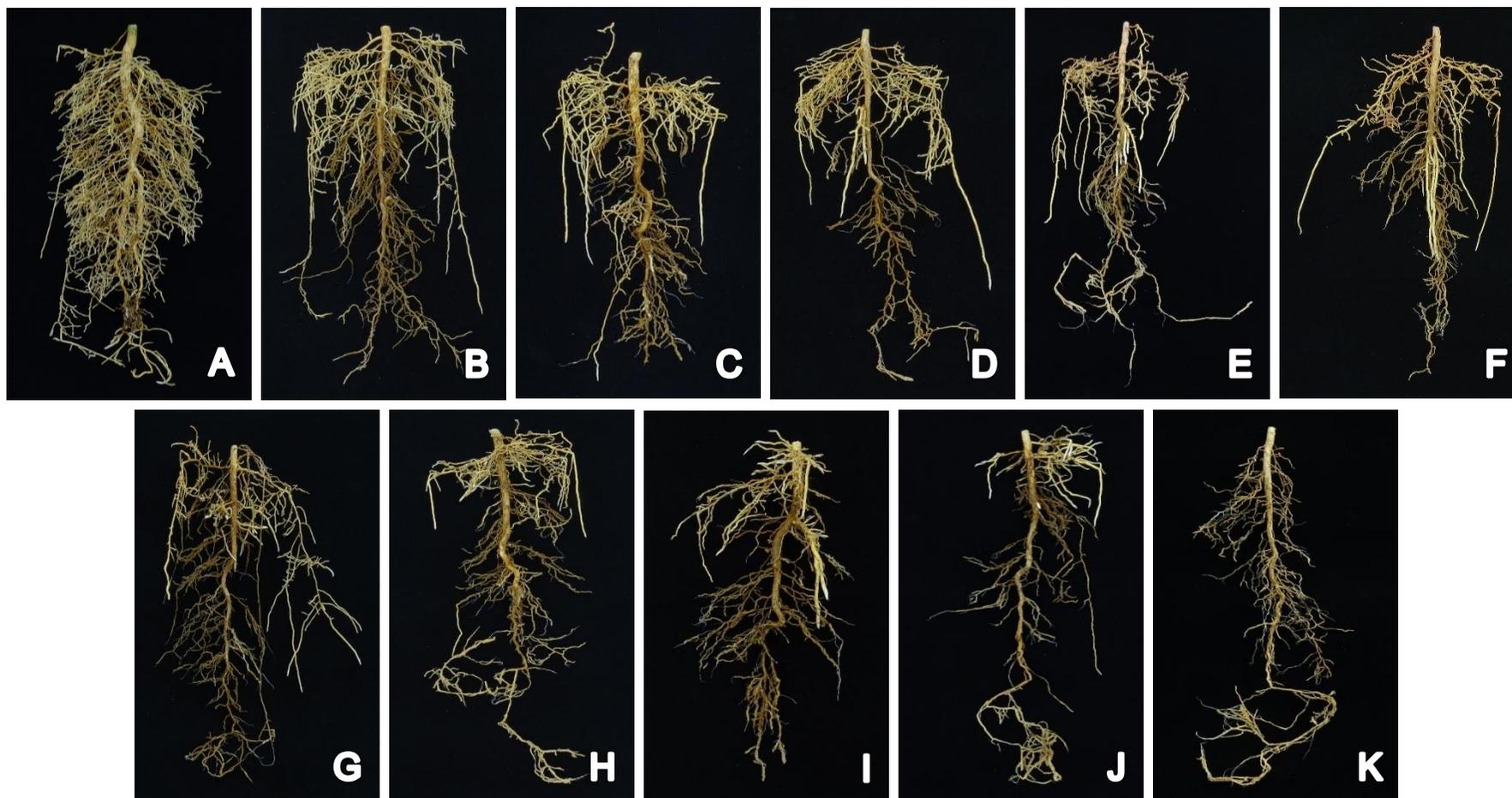
C.V. (%) = 5.59

**Tabla 43: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para el porcentaje de severidad de la pudrición radicular en la prueba de control químico en invernadero**

Tratamientos	Media	Media transformada	Agrupamiento
T2 Testigo inoculado	0.9730	1.4046	A
T11 Extracto de lauráceas	0.8215	1.3474	A B
T7 Fosetyl aluminio	0.7865	1.3351	A B C
T5 Fosfito de cobre	0.7835	1.3337	A B C
T9 Azoxystrobin	0.7500	1.3202	B C
T8 Nitrato de calcio	0.7320	1.3144	B C D
T3 Metalaxyl	0.6885	1.2970	B C D E
T10 Ácidos urónicos	0.6055	1.2641	C D E
T4 Fosfito de potasio	0.5560	1.2442	D E
T6 Fosfito de calcio	0.5210	1.2313	E
T1 Testigo sin inóculo	0.0000	1.0000	F



**Figura 25:** Comparativo de promedios de porcentajes de severidad de la pudrición radicular en los tratamientos de control químico en invernadero



**Figura 26:** Evaluación de severidad de pudrición radicular a los 52 días después de la inoculación con *P. nicotianae* en la prueba de control químico en invernadero. Leyenda: A) T1 (Testigo no inoculado), B) T6 (Fosfito de calcio), C) T4 (Fosfito de potasio), D) T10 (Ácidos urónicos), E) T3 (Metalaxyl), F) T8 (Nitrato de calcio), G) T9 (Azoxystrobin), H) T5 (Fosfito de cobre), I) T7 (Fosetyl aluminio), J) T11 (Extracto de lauráceas) y K) T2 (Testigo inoculado)

Los niveles de eficacia de los fosfitos en el control de los organismos fitoparásitos varía dependiendo del ion unido al fosfito (fosfito de potasio, fosfito de calcio, fosfito de cobre, entre otros), método de aplicación (vía foliar o radicular), organismo patógeno y planta hospedante (Yáñez *et al.* 2017).

Según Carvalho (2014), el fosfito de potasio (Fitogard) a la dosis de 0.5, 2 y 5 ml/l controló preventivamente las enfermedades causadas por *P. nicotianae* en cítricos. Asimismo, la masa fresca de la parte aérea y de las raíces, mostraron valores estadísticamente iguales y superiores con respecto al testigo inoculado.

En otro estudio relacionado, Oren y Yogev (2002) reportan que la aplicación preventiva de fosfito de potasio a plántulas de cítricos Volkamer (portainjerto), vía Drench a dosis de 5 ml/contenedor, mostró claramente una alta eficacia de control de pudrición radicular frente a *Phytophthora citrophthora*.

Las plantas de naranjo dulce “Ridge Pineapple” previamente tratadas vía Drench con solamente fosfito o en combinación con fosfato, incluidos los tratamientos que recibieron aplicación foliar de fosfito, presentaron significativamente menor pudrición radicular por *Phytophthora* frente a aquellos que recibieron altos niveles de fosfato o nada de fósforo (Orbovic *et al.* 2008).

Los productos a base de fosfitos tienen acción directa e indirecta sobre los oomicetos; asimismo, aunque los fosfitos se han clasificado de bajo riesgo en inducir resistencia, se ha reportado que *P. sparsa* y otros oomicetos pueden desarrollar resistencia a los fosfitos (Dobrowolski *et al.* 2008).

En aplicaciones vía Drench bajo invernadero, la incidencia de la pudrición radicular por *P. parasitica*, se redujo en plántulas de naranjo dulce tratados con metalaxyl a 50 mg/l, pero no con fosetyl-Al a 3000 mg/l, asimismo; los valores de porcentaje de raíces sanas y el peso de raíces secas, han sido mayores en los tratamientos con metalaxyl que con fosetyl-Al y los controles no tratados (Farih *et al.* 1981c).

Aplicaciones vía Drench de metalaxyl a 100 mg i.a./l y pulverizaciones foliares de fosetyl-Al a 2000 mg i.a./l, redujeron significativamente la pudrición radicular en plántulas de naranjo agrio cultivadas en macetas e inoculadas con *Phytophthora parasitica*; asimismo, los pesos secos totales de las plántulas inoculadas y tratadas con metalaxyl y fosetyl-Al fueron significativamente mayores con respecto a las plántulas sin tratar (Davis 1982).

En un estudio relacionado, Feichtenberger (1990) evidenció que los tratamientos preventivos de plantas de 2 años de edad de limón cv. Siciliana, con metalaxyl o fosetyl-Al, aplicados al suelo a 7 días antes de la inoculación con *P. citrophthora*, redujo significativamente el tamaño de las lesiones del tallo frente a fosetyl-Al; mientras que, en el tratamiento curativo (14 días después de la inoculación), aplicados al suelo, las plantas tratadas con metalaxyl mostraron valores más bajos en el tamaño de la lesión del tallo en comparación con fosetyl-Al.

Las aspersiones foliares con Aliette 80 WP (fosetyl-Al 80 por ciento) y rociado al suelo con Ridomild Gold 68 WP (metalaxyl 4 por ciento + mancozeb 64 por ciento), las aspersiones foliares y rociado al suelo con Aliette y únicamente aspersiones foliares con Aliette 80 WP, cada uno a dosis de 2.5 g/l de agua, produjeron una reducción significativamente mayor en el tamaño de las lesiones del tronco, un aumento en la densidad de las raíces alimentadoras y el rendimiento de los frutos en plantas de mandarina Kinnow infectadas con *P. nicotianae* var. *parasitica*; asimismo, las aspersiones foliares con Aliette 80 WP mostraron significativamente mejores resultados de control que las aplicaciones al suelo con el mencionado producto (Thind 2020).

Campanella *et al.* (2002) indicaron que las sales de calcio (acetato de calcio, el óxido de calcio, el sulfato de calcio, el lactato de calcio, el propionato de calcio, el carbonato de calcio y el cloruro de calcio) redujeron significativamente las infecciones de la raíz de plántulas de naranjo agrio causado por *P. nicotianae* en comparación con el control, excepto el nitrato de calcio, el pantotenato de calcio y el gluconato de calcio.

Las sales de  $\text{CaCl}_2$  o  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  en el rango de 10 a 40 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , mostraron un efecto significativo y dependiente de la concentración en la reducción de la liberación de zoosporas de los zoosporangios; asimismo, el ion  $\text{Ca}^{2+}$  mayores a 10 meq redujeron significativamente la motilidad de las zoosporas, provocando el enquistamiento (von Broembsen y Deacon 1997).

En un estudio relacionado, Benigni y Bompeix (2004) indicaron que azoxystrobin aplicado vía aspersión a las raíces a dosis de 0.20, 0.25 y 0.50 g/m<sup>2</sup> redujo consistente y significativamente la infección radicular de plantas de achicoria causado por *Phytophthora cryptogea*; asimismo, bajo estas condiciones, el control proporcionado por azoxystrobin a dosis de 0.25 g/m<sup>2</sup> ha sido equivalente o mejor que lo obtenido con fosetyl-Al a dosis de 12 g/m<sup>2</sup>.

De acuerdo con el análisis de variancia (Tabla 44) para la severidad de la pudrición radicular en la prueba de control biológico (datos transformados a  $\sqrt{x+1}$ ), existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Valor de P = <0.0001), con un coeficiente de variabilidad del 6.45 por ciento. La prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) indica que el tratamiento T4 (*B. subtilis* AP-01), siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos, obtuvo mayor efecto de biocontrol de la pudrición radicular, obteniéndose solo el 24.15 por ciento de severidad de la enfermedad; mientras que, el tratamiento T3 (*T. harzianum* T22) mostró menos efecto de biocontrol, alcanzando el 53.80 por ciento de severidad de la enfermedad (Tabla 45 y Figura 24).

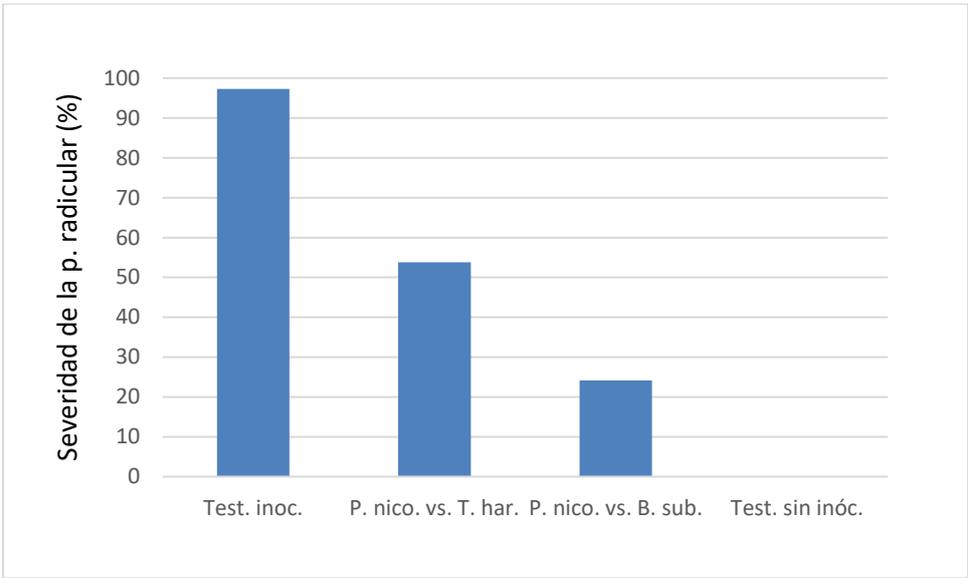
**Tabla 44: Análisis de variancia para el porcentaje de severidad de la pudrición radicular en la prueba de control biológico en invernadero**

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
Tratamientos	3	1.798695	0.599565	102.28	< 0.0001
Error	76	0.445507	0.005862		
Total	79	2.244203			

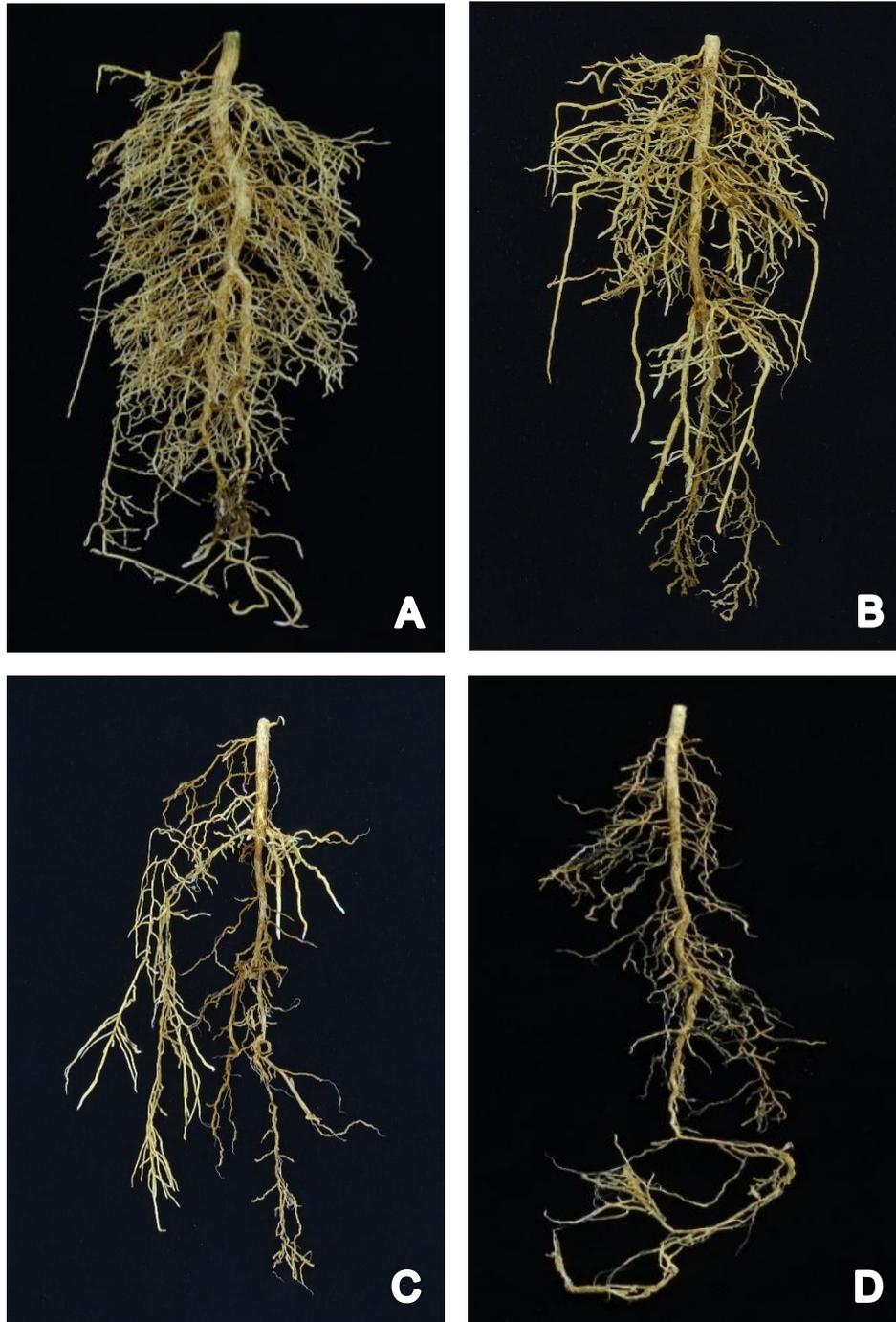
C.V. (%) = 6.45

**Tabla 45: Comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para el porcentaje de severidad de la pudrición radicular en la prueba de control biológico en invernadero**

Tratamientos	Media	Media transformada	Agrupamiento
T2 Test. inoculado	0.9730	1.4046	A
T3 <i>T. harzianum</i> Cepa T22	0.5380	1.2327	B
T4 <i>B. subtilis</i> AP-01	0.2415	1.1126	C
T1 Test. sin inóculo	0.0000	1.0000	D



**Figura 27:** Comparativo de promedios de porcentajes de severidad de la pudrición radicular en los tratamientos de control biológico en invernadero



**Figura 28:** Evaluación de severidad de pudrición radicular en la prueba de control biológico a los 52 días después de la inoculación con *P. nicotianae* en invernadero. Leyenda: A) T1 (Testigo no inoculado), B) T4 (*Bacillus subtilis* AP-01, C) T3 (*Trichoderma harzianum* T22) y D) T2 (Testigo inoculado)

Shinde y Sadgir (2016) reportaron que el aislamiento de *Bacillus subtilis* Bs-K<sub>1</sub> ha sido altamente eficiente en el control de la pudrición radicular en plántulas de limón rugoso, causado por *Phytophthora parasitica*, registrando el máximo valor porcentual del control de la enfermedad (81.34 por ciento), mientras que otros aislamientos de *B. subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* no resultaron muy eficaces.

En general, *Bacillus subtilis* ejerció antagonismo por antibiosis mediante la producción de lipopeptídicos cíclicos, entre las cuales destaca la surfactina y la iturina A (Joshi y McSpadden 2006); sustancias que han demostrado amplio espectro de acción sobre patógenos de plantas en las que se encuentran especies de *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria* y *Verticillium* (Layton *et al.* 2011).

Los biocontroladores *P. fluorescens* XXVI, *T. virens*, *T. viride*, *T. harzianum* y *T. hamatum* redujeron significativamente la severidad de la pudrición radicular causado por *P. parasitica*, registrando valores de 16.8, 17.5, 19.6, 26.4 y 32.7 por ciento, respectivamente, en comparación con el control (44.2 por ciento); además, estimularon el crecimiento de las plántulas de limón rugoso (*Citrus jambhiri*) en condiciones de invernadero (Gade 2012).

## V. CONCLUSIONES

1. Se ha identificado morfológica y biomolecularmente al pseudohongo *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (= *Phytophthora parasitica* Dastur), como el agente causal de la pudrición radicular del portainjerto mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.).
2. *In vitro*, los tratamientos de control químico con Metalaxyl, Fosetyl aluminio y Extracto de lauráceas alcanzaron el 100 por ciento de inhibición del crecimiento micelial de *P. nicotianae*; mientras que, *Trichoderma harzianum* T22 obtuvo el mejor efecto de control biológico. En invernadero, los mejores tratamientos de control químico que redujeron la severidad de la pudrición radicular fueron el Fosfito de calcio, Fosfito de potasio, Ácidos urónicos y Metalaxyl, este efecto también se reflejó para la variable peso fresco de raíces; mientras que, para las variables altura de planta, peso fresco de la planta, peso seco de la planta y peso seco de raíces, los mejores tratamientos fueron el Fosfito de calcio, Fosfito de potasio y Ácidos urónicos. Por otro lado, *Bacillus subtilis* AP-01 obtuvo el mejor efecto de biocontrol de la pudrición radicular en invernadero, esto también se reflejó para las variables peso fresco de la planta, peso seco de la planta, peso fresco de raíces y peso seco de raíces; mientras que, para la variable altura de planta los biocontroladores *B. subtilis* AP-01 y *T. harzianum* T22 tuvieron efectos similares.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos de control químico con los productos que tuvieron mejores resultados, basado en los momentos (preventivo y curativo) y métodos (aspersión foliar e inyección al tronco) de aplicación en invernadero y campo.
2. Considerar trabajos orientados a determinar posibles interacciones de sinérgismo o antagonismo entre *Phytophthora nicotianae* y *Tylenchulus semipenetrans*, ambos patógenos radiculares de cítricos.
3. Realizar ensayos relacionados al comportamiento de los antagonistas biológicos comerciales o nativos a la aplicación de diferentes fuentes de materia orgánica en el biocontrol de *P. nicotianae*.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Pérez, JA; Ortiz-García, CF; Zaldívar-Cruz, JM; Rodríguez-Cuevas, M; Bautista-Muñoz, CC; Castillo-Aguilar, CC. 2012. Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y ciencia* 28(3):245-258. <https://doi.org/10.19136/ERA.A28N3.13>
- Afek, U; Stzejnberg, A. 1989. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology* 79:736-739.
- Agrios, GN. 1996. *Fitopatología*. 2 ed. México. Ed. Limusa. 838 p.
- Agrios, GN. 2002. *Fitopatología*. Trad. M Guzmán. 2 ed. México. Ed. Limusa. 838 p.
- Agrios, GN. 2005. *Plant Pathology*. 5 ed. Amsterdam, Elsevier Academic Press. 922 p.
- Agusti, M. 2003. *Citricultura*. 2 ed. Madrid. Ed. Mundi-Prensa. 422 p.
- Alsultan, W; Vadamalai, G; Ahmad, K; Rashed, O. 2017. *Phytophthora parasitica* isolate R-4A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (Database NCBI). Unpublished.
- Amorós, M. 2003. *Producción de agrios*. 3 ed. Madrid, España. Ed. Mundi-Prensa. 352 p.
- Appiah, AA; Bridge, PD; Flood, J; Archer, SA. 2002. Molecular identification and phylogenetic relationships of *Phytophthora* species on cocoa. Unpublished.
- APS (American Phytopathological Society, US). 2002. *Plagas y enfermedades de los cítricos*. Eds. LW Timmer; SM Garnsey; JH Graham. 2 ed. Madrid. Ed. Mundi-Prensa. 95 p.
- Benfradj, N; Tounsi, S; Boughalleb-M'Hamdi, N. 2016. *In-vitro* evaluation of antagonists and fungicides in controlling citrus gummosis caused by *Phytophthora*, *Phytophthium*

and *Pythium* species in Tunisia. British Microbiology Research Journal 16(1):1-14.  
<https://doi.org/10.9734/BMRJ/2016/27247>

Benigni, M; Bompeix, G. 2004. Control of *Phytophthora cryptogea* (Pethyb. and Laff.) of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) with azoxystrobin applied before the forcing period. Crop Protection 23:1011-1014. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.03.006>

Biggs, AR; El-Kholi, MM; El-Neshawy, S; Nickerson, R. 1997. Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. Plant Dis. 81:339-403. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.4.399>

Biogen (Biogen Agro S. A. C.). 2019. Licthor, ficha técnica (en línea). Lima, PE. Consultado 22 nov. 2021. Disponible en <https://www.tqc.com.pe/wp-content/uploads/2020/09/FICHA-TECNICA-LICTHOR-Dic2019.pdf>

Bowman, KD; Albrecht, U; Graham, JH. 2007. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora* in citrus roots using PCR-RFLP in comparison with other methods. Eur. J. Plant Pathol. 119:143-158.

Brasier, CM. 1972. Observations on the sexual mechanism in *Phytophthora palmivora* and related species. Trans. Br. Mycol. Soc. 58(2):237-251.

Burketova, L; Trda, L; Ott, P; Valentova, O. 2015. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogen. Biotechnol. adv. 33(6 Pt2):994-1004.

Cahill, DM; McComb, JA. 1992. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when affected with *Phytophthora cinnamomi*. Physiological and Molecular Plant Pathology 40:315-332.

Campanella, V; Ippolito, A; Nigro, F. 2002. Activity of calcium salts in controlling *Phytophthora* root rot of citrus. Crop Protection 21:751-756.  
[https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00032-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00032-7)

Carrillo, C; Teruel, JA; Aranda, FJ; Ortiz, A. 2003. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. Biochim. Biophys Acta 1611: 91-97.

- Carvalho, D. 2014. Fosfito de potássio no controle de *Phytophthora* spp. em citros e faia e seu modo de ação. Doutorado. Piracicaba, Brasil, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 108 p.
- Chandler, S; Van Hese, N; Coutte, F; Jacques, P; Hofte, M; De Veesschauwer, D. 2015. Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 91:20-30. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.05.010>
- Chavarrriaga, D; Bodles, WJ; Leifert, C; Belbahri, L; Woodward, S. 2007. *Phytophthora cinnamomi* and other fine root pathogen in north temperate pine forests. *FEMS Microbiol. Lett.* 276(1):67-74.
- Chee, KH; Zentmyer, GA; Foong, KM; Klure, LJ. 1976. Mating types of *Phytophthora palmivora* in Malaysia. *Plant Dis. Rep.* 60:866-867.
- Coffey, MD; Brar, AK; Xu, E; Sarhan, EA; Cunningham, IM. 2009. ITS Sequences from the World *Phytophthora* Collection (WPC) for the *Phytophthora* Database (PD). Unpublished.
- Colburn, GC; Graham, JH. 2007. Protection of citrus rootstocks against *Phytophthora* spp. with a hypovirulent isolate of *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathology* 97:958-963.
- Conway, WS; Sams, CE; MacGuire, RG; Kelman, A. 1992. Calcium treatment of apples and potatoes to reduce postharvest decay. *Plant Dis.* 76(4):329-334.
- Cooke, DEL; Drenth, A; Duncan, JM; Wagels, G; Brasier, CM. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30:17-32.
- Cotoras, M; García, C; Lagos, C; Folch, C; Mendoza, L. 2001. Antifungal activity on *Botrytis cinerea* of flavonoids and diterpenoids isolated from the surface of *Pseudognaphalium* spp. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 46(4):433-440. <https://dx.doi.org/10.4067/S0366-16442001000400007>
- Das, AK; Kumar, A; Ingle, A; Nerkar, S. 2011. Molecular identification of *Phytophthora* spp. causing citrus decline in Vidarbha region of Maharashtra. *Indian Phytopathology* 64(4):342-345.

- Das, AK; Nerkar, S; Kumar, A; Bawage, S. 2016. Detection, identification and characterization of *Phytophthora* spp. infecting citrus in India. *Journal of Plant Pathology* 98(1):55-69.
- Davidse, LC. 1987. Biochemical aspects of phenylamide fungicides-action and resistance. In: Modern selective fungicides-properties, applications, mechanisms of action. H. Lyr. ed. Longman Sci. and Tech. Co. and John Wiley & Sons, New York. 383 pp.
- Davidse, LC; Hofman, AE; Velthuis, GCM. 1983. Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Exp. Mycol.* 7:344-361.
- Davies, F. S. y Albrigo, L. G. 1999. Cítricos. Trad. JM Candela. Zaragoza, ES. Ed. Acribia. 283 p.
- Davis, RM. 1982. Control of *Phytophthora* root and foot rot of citrus with systemic fungicides metalaxyl and phosethyl aluminum. *Plant Disease* 66:218-220. <https://doi.org/10.1094/PD-66-218>
- Deliopoulos, T; Kettlewell, PS; Hare, MC. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. *Crop Protection* 29:1059-1075.
- Dercks, W; Buchenauer, H. 1987. Comparative studies on the mode of action of aluminum ethyl phosphite in four *Phytophthora* species. *Crop Prot.* 6:82-89.
- Dixon, RA; Achnine, L; Kota, P; Liu, CJ; Reddy, MSS; Wang, L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defense a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3:371-390.
- Dobrowolski, MP; Shearer, BL; Colquhoun, IJ; O'Brien, PA; Hardy, GE. 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant Pathology* 57:928-936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01883.x>
- Doyle, JJ; Doyle, JL. 1990. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Drenth, A; Sendall, B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection. Brisbane, AU. 42 p.

- Duitman, EH; Hamoen, LW; Rembold, M; Venema, G; Seitz, H; Saenger, W; Bernhard, F; Reinhardt, R; Schmidt, M; Ullrich, C; Stein, T; Leenders, F; Vater, J. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. Proc Natl Acad Sci USA 96:13294-13299. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13294>
- Duvenhage, JA. 1994. Monitoring the resistance of *Phytophthora cinnamomi* to fosetyl-Al and H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>. South African Avocado Growers' Association Yearbook 17:35-37.
- El peruano. 2021. Senasa: Productores peruanos se alistan para exportar cítricos y arándanos a la India. Consultado 11 nov. 2021. Disponible en <https://elperuano.pe/noticia/124601-senasa-productores-peruanos-se-alistan-para-exportar-citricos-y-arandanos-a-la-india#:~:text=Exportaci%C3%B3n%20de%20c%C3%ADtricos,y%20toronja%20con%20%2C000%20t>
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O, K. 1996. *Phytophthora* Disease Worldwide. APS Press, American Phytopathological Society. Minnesota, US. 561 p.
- Farih, A; Menge, JA; Tsao, PH; Ohr, HD. 1981c. Metalaxyl and efosite aluminum for control of *Phytophthora* gummosis and rot root on citrus. Plant Disease 65:654-657.
- Farih, A; Tsao, PH; Menge, JA. 1981a. *In vitro* effects of metalaxyl on growth, sporulation, and germination of *Phytophthora parasitica* and *P. citrophthora*. Plant Disease 65:651-654.
- Farih, A; Tsao, PH; Menge, JA. 1981b. Fungitoxic activity of efosite aluminum on growth, sporulation, and germination of *Phytophthora parasitica* and *P. citrophthora*. Phytopathology 71:934-936.
- Feichtenberger, E. 1990. Control of *Phytophthora* gummosis of citrus with systemic fungicides in Brazil. Bulletin 20:139-148.
- Fickers, P. 2012. Antibiotic compounds from *Bacillus*: Why are they so Amazing? Am J Biochem Biotechnol. 8(1):38-43.
- Fisher, N; Meunier, B. 2008. Molecular basis of resistance to cytochrome bc1 inhibitors. FEMS Yeast Res. 8:183-192.

- Gade, RM. 2012. Biological and chemical management of *Phytophthora* root rot/collar rot in citrus nursery. *The Bioscan* 7(4):631-635.
- Gallery, ME; Hong, C. 2008. *Phytophthora*: Identifying species by morphology and DNA fingerprints. Minnesota, USA, The American Phytopathology Society. 158 p.
- Guest, D; Grant, B. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Review of the Cambridge Philosophical Society* 66:159-187. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1991.tb01139.x>
- Hall, G. 1993. An integrated approach to the analysis of variation in *Phytophthora nicotianae* and a redescription of the species. *Mycol. Res.* 97(5):559-574. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81179-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81179-9)
- Hammerschmidt, R. 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens?. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:77-84. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0215>
- Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2:43-56.
- Howell, CR. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman, GE; Kubicek, CP. (eds) *Trichoderma & Gliocladium*, vol. 2. Taylor & Francis, Padstow, pp 173-184.
- Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:4-10.
- Javier, J. 1998. Fungicidas y enmiendas orgánicas en el control de *Phytophthora* spp. en limonero *Citrus aurantifolia* (L.) Swingle injertado sobre *Citrus jambhiri* Lush. bajo riego tecnificado. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 115 p.
- Jeffers, S. N. and Martin, S. B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70:1038-1043.
- Jones, JD; Dangl, JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-239.

- Jordan, DB; Livingston, RS; Bisaha, JJ; Duncan, KE; Pember, SO; Picollelli, MA; Schwartz, RS; Sternberger, JA; Tang, XS. 1999. Mode of action famoxadone. *Pestic. Sci.* 55:105-108.
- Joshi, R; McSpadden Gardener, BB. 2006. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 96:145-154. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0145>
- King, M; Reeve, W; Van der Hoek, MB; Williams, N; McComb, J; O'Brien, PA; Hardy, GE. 2010. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Mol Genet Genomics* 284:425-435. <https://doi.org/10.1007/s00438-010-0579-7>
- Klotz, L. J. 1978. Fungal, bacterial and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, and nursery orchard. In: W. Reuther, E. C. Calavan, G. F. Carman (Eds.). *The Citrus Industry Vol. 4*. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Richmond, Crop Protection. USA. 66 pp.
- Kubicek, CP; Mach, RL, Peterbauer, CK, Lorito, M. 2001. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.* 83:11-23.
- Latifah, M; Kamaruzaman, S; Zainal Abidin, MA; Nusaibah, SA. 2018. Identification of *Phytophthora* spp. from perennial crops in Malaysia, its pathogenicity and cross-pathogenicity. *Sains Malaysiana* 47(5):909-921.
- Layton, C; Maldonado, E; Monroy, L; Corrales, LC; Sánchez, LC. 2011. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *NOVA Publicación científica en ciencias biomédicas* 9(15):177-187. <https://doi.org/10.22490/24629448.501>
- Lobato, MC; Olivieri, FP; Daleo, GR; Andreu, AB. 2010. Antimicrobial activity of phosphites against different potato pathogens. *Journal of Plant Diseases and Protection* 117(3):102-109. <https://doi.org/10.1007/BF03356343>
- Loussert, R. 1992. *Los agrios*. Madrid. Ed. Mundi-Prensa. 319 p.

- Martin, F; Radmer, L. 2009. *Phytophthora nicotianae* isolate P6303 oxidase subunit 2 (cox2) and cytochrome oxidase subunit 1 (cox1) genes, partial cds; mitochondrial (Database NCBI). Unpublished.
- Martin, F; Radmer, L. 2011. *Phytophthora nicotianae* isolate P1452 cytochrome oxidase subunit II (cox2) and cytochrome oxidase subunit I (cox1) genes, partial cds; and unknown gene; mitochondrial (Database NCBI). Unpublished.
- Martin, FN; Tooley, PW. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia* 95:269-284.
- Matheron, ME; Matejka, JC. 1992. Effects of temperature on sporulation and growth of *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* and development of foot and root rot on citrus. *Plant Dis.* 76:1103-1109.
- Matheron, ME; Porchas, M. 2000. Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl-Al, and metalaxyl on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp. *Plant Dis.* 84:454-458.
- McDonald, AE; Grant, BR; Plaxton, WC. 2001. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture, and influence on the plant phosphate starvation response. *Journal of Plant Nutrition*, 24:1505-1519.
- Mont, R. 1998. Los cítricos y sus enfermedades. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Lima, Pe. 44 p.
- Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbial* 4:1-4.
- Mounde, LG; Ateka, EM; Kihurani, AW; Wasilwa, L. 2012. Morphological characterization and identification of *Phytophthora* species causing citrus gummosis in Kenya. *African Scholarly Science Communications Trust* 12(7):7072-7087. <https://doi.org/10.18697/ajfand.55.11605>
- Moyne, AL; Cleveland, TE; Tuzun, S. 2004. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol Lett* 234:43-49.

- Neoagrum (Neoagrum S. A. C.). 2018. Xilotrom, ficha técnica (en línea). Lima, PE. Consultado 22 nov. 2021. Disponible en <https://neoagrum.com.pe/assets/sources/files/fichas-tecnicas/FTXILOTR0M.pdf>
- Olivera, C. 1991. El cultivo de los cítricos en el valle de Huaral-Chancay. Fundación para el Desarrollo del Agro. 98 p.
- Ongena, M; Jackes, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16(3):115-125.
- Orbovic, V; Syvertsen, JP; Bright, D; Van Clief, DL; Graham, JH. 2008. Citrus seedlings growth and susceptibility to root rot as affected by phosphite and phosphate. Journal of Plant Nutrition 31:774-787. <https://doi.org/10.1080/01904160801928448>
- Oren, Y; Yogev, E. 2002. Acquired resistance to *Phytophthora* root rot and brown rot in citrus seedlings induced by potassium phosphite. Journal of Plant Diseases and Protection 109(3):279-285.
- Oudemans, P; Coffey, MD. 1991. A revised systematic of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. Mycol. Res. 95(9):1025-1046.
- Oviedo, JJ; Mattos, LL. 2018. Identificación biomolecular y patogenicidad de *Phytophthora*, *Pythium* y *Phytophythium* aislados de raíz y suelo en cítricos (*Citrus* spp.). Anales científicos UNALM 79(2):393-400.
- Palacios, J. 2005. Citricultura. Tucuman, Argentina. 518 p.
- Pandey, D; Tripathi, N; Tripathi, R; Dixit, S. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. Journal of Plants Diseases and Protection, 89(6):344-349.
- Papavizas, GC; Lumsden, RD. 1980. Biological control of soilborne fungal propagules. Annual Review of Phytopathology 389-413.
- Perez, V; Mamdouh, AM; Huet, JC; Pernollet, JC; Bompeix, G. 1995. Enhanced secretion of elicitor by *Phytophthora* fungi exposed to phosphonate. Cryptogamie Mycologie, 16:191-194.

- Peypoux, F; Bonmatin, JM; Wallach, J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:553-563.
- Picman, AK; Schneider, EF; Gershenzon, J. 1990. Antifungal activities of sunflower terpenoids. *Biochemical Systematics and Ecology* 18(5):325-328. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(90\)90005-Z](https://doi.org/10.1016/0305-1978(90)90005-Z)
- Pieterse, CMJ; Zamioudis, C; Berendsen, RL; Weller, DM; Van Wees, SCM; Bakker, PAH. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52:16.1-16.29. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Quintana, EA; Sánchez, RI; Cortez, MO; Gonzáles, GA. 2017. Actividad antifúngica *in vitro* de mezcla de terpenos de naranja contra *Alternaria tenuissima*. *Revista Mexicana de Micología* 45:7-12.
- Raut, I; Oancea, F; Santísima-Trinidad, ABL; Calin, M; Constantinescu-Aruxandei, D; Badea-Doni, M; Arsene, M-L; Vasilescu, G; Sesan, TE; Jecu, L. 2017. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against *Phytophthora parasitica*. *Scientific Bulletin (Series F. Biotechnologies)* 21:179-182.
- Ristaino, J; Hu, C. 2010. A key to the common *Phytophthora* species (Lucid v3. 4). Unpublished.
- Ryals, JA; Neuenschwander, UH; Willits, MG; Molina, A; Steiner, H-Y; Hunt, MD. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1009-1819. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1809>
- Sandler, HA; Timmer, LW; Graham, JH; Pelosi, RR. 1988. Effect of fosetyl-Al and metalaxyl applications on foot rot incidence and growth of young citrus trees under field conditions. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 101:10-12.
- Santos, AF dos; Luz, EDMN; Souza, JT de. 2005. *Phytophthora nicotianae*: Agente etiológico da gomose da acacia-negra no Brasil. *Fitopatología brasileira* 30(1):81-84.
- Scanu, B; Hunter, GC; Linaldeddu, BT; Franceschini, A; Maddau, L; Jung, T; Denman, S. 2014. A taxonomic re-evaluation reveals that *Phytophthora cinnamomi* and *P. cinnamomi* var. *parvispora* are separate species. *Forest Pathology* 44(1):1-20.

- SEF (Sociedad Española de Fitopatología, ES). 2000. Enfermedades de los cítricos. Eds. Duran-Vila, N. y Moreno, P. Madrid, Ed. Mundi-Prensa. 165 p.
- Shafi, J; Tian, H; Ji, M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogen: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31(3):446-459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Shinde, SB; Sadgir, MD. 2016. Efficiency of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* against *Phytophthora* spp. in citrus. *International Journal of Plant Protection* 9(1):15-20. <https://doi.org/10.15740/HAS/IJPP/9.1/15-20>
- Smillie, RH; Dunstan, RH; Grant, BR; Griffith, JM; Iser, J; Niere, JO. 2000. The mode of action of the antifungal agent phosphite. *EPPO Bulletin* 20:185-192.
- Smith, B; Shearer, B; Sivasithamparam, K. 1997. Compartmentalization of *Phytophthora cinnamomi* in stems of highly susceptible *Banksia brownie* treated with phosphonate. *Mycological Research* 101:1101-1107.
- Soler, J. y Soler, G. 2006. Cítricos. Variedades y técnicas de cultivo. Madrid. Ed. Mundi-Prensa. 242 p.
- Spies, CFJ; Mazzola, M; Botha, WJ; Van Der Rijst, M; Mostert, L; McLeod, A. 2011. Oogonial biometry and phylogenetic analyses of the *Pythium vexans* species groups from woody agricultural hosts in South Africa reveal distinct groups within this taxon. *Fungal Biology* 115:157-168. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.11.005>
- Stacey, G; Keen, NT. 1999. *Plant-Microbe Interactions*. vol. 4. APS Press, St. Paul.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56(4):845-857.
- Steller, S; Vollenbroich, D; Leenders, F; Stein, T; Conrad, B; Hofemeister, J; Jacques, P; Thonart, P; Vater, J. 1999. Structural and functional organization of the fengycin synthase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chemistry & Biology* 6(1):31-41. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(99\)80018-0](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(99)80018-0)
- Sun, DW; Cao, JF; Pei, WH; Yang, MY; Zhao, ZJ. 2013. First report of blight disease caused by *Phytophthora nicotianae* on *Amorophallus konjac* in China. Unpublished.

- Taiz, L; Zeiger, E. 1991. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings. Redwood City, California. U.S.A. 316 p.
- Talon, M. 1997. Regulación del cuajado del fruto en cítricos: Evidencias y conceptos, IVIA. Valencia, España. Rev. Levante Agrícola 36(338):37-37.
- Thimon, L; Peypoux, F; Wallach, J; Michel, G. 1995. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. FEMS Microbiol Lett 128:101-106.
- Thind, SK. 2020. Bio-efficacy of Aliette 80 wp against citrus *Phytophthora* in Kinnow mandarin. Journal of Krishi Vigyan 9(1):26-30. <https://doi.org/10.5958/2349-4433.2020.00127.0>
- Timmer, LW; Castle, WS. 1985. Effectiveness of metalaxyl and fosetyl Al against *Phytophthora parasitica* on sweet orange. Plant Disease 69:741-743.
- Tsao, PH. 1971. Chlamydospore Formation in Sporangium-free Liquid Cultures of *Phytophthora parasitica*. 61:1412-1413. <https://doi.org/10.1094/Phyto-61-1412>
- Tsao, PH; Ugale, R; Hobbs, S; Farih, A. 1980. Control of homothallic oospore formation in *Phytophthora parasitica* by culture manipulations. Trans. Br. Mycol. Soc. 75(1):153-156.
- Tsuge, K; Akiyama, T; Shoda, M. 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. J Bacterial 183:6265-6273.
- Vanittanakom, N; Loeffler, W; Koch, U; Jung, G. 1986. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. J Antibiot (Tokyo) 39:888-901.
- Vey, A; Hoagland, RE; Butt, TM. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. CAB International, Bristol, pp 311-346.
- Viterbo, A; Ramot, O; Chemin, L; Chet, I. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie Van Leeuwenhoek 81:549-56.

- von Broembsen, SL; Deacon, JW. 1997. Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solutions. *Phytopathology* 87:522-528. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.5.522>
- Wisniewski, M; Droby, S; Chalutz, E; Eilam, Y. 1995. Effects of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* *in vitro* and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. *Plant Pathol.* 44:1016-1024. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02660.x>
- Yáñez-Juárez, MG; López-Orona, CA; Ayala-Tafoya, F; Partida-Ruvalcaba, L; Velázquez-Alcaraz, TJ; Medina-López, R. 2017. Phosphites as alternative for the management of phytopathological problems. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1):79-94. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1710-7>
- Young, RH; Albrigo, LG; Cohen, M; Castle, WS. 1982. Rates of blight incidence in trees on Carrizo citrange and other rootstocks. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 95:76-78.
- Yuen, MC. 1993. Postharvest handling of tropical fruits. In: *Proceeding of the International Conference on Postharvest Handling of Tropical Fruit*, July 19-21, Chaing Mai, Thailand. 492 p.
- Zaragoza, S., Pina, J., Angeles, M., Navarro, L., Medina, A., Soler, G. y Chomé, P. 2011. *Las variedades de cítricos*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid, ES. 50 p.
- Zentmyer, GA; Mitchell, DJ; Laura Jefferson; Roheim, J; Carnes, D. 1973. Distribution of Mating Types of *Phytophthora palmivora*. *Phytopathology* 63:663-667. <https://doi.org/10.1094/Phyto-63-663>.
- Zheng, W; Feng, S. 2014. Analysis on genetic diversity of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in Henan. Unpublished.

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1: Medio de cultivo agar jugo V-8 modificado

#### Materiales para la preparación:

- Jugo V-8 Campbell's 100 ml
- Extracto de avena 100 ml
- Carbonato de calcio 3 g
- Agar granulado 18 g
- Agua destilada desionizada 800 ml

#### Procedimiento:

- En una licuadora limpia y enjuagada con agua destilada desionizada, agregar 10 g de hojuelas de avena en polvo (marca comercial tres ositos) y 110 ml de agua destilada desionizada.
- Licuar la mezcla de avena en polvo y agua destilada desionizada durante 5 minutos.
- Filtrar el licuado en un embudo de vidrio con la ayuda de varias capas de gasa superpuestas entre sí, obteniéndose 100 ml de extracto de avena.
- En un vaso de precipitado de un litro, colocar 100 ml de jugo V-8 Campbell's, 3 g de Carbonato de calcio y 500 ml de agua destilada desionizada; enseguida, calentar ligeramente en el horno microondas y homogenizar completamente la mezcla con una vagueta de vidrio.
- Agregar a la mezcla anterior, 100 ml de extracto de avena y 18 g de agar granulado; enseguida, calentar en el horno microondas hasta disolver completamente.
- Distribuir en botellas y esterilizar en autoclave (121° C a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 20 minutos).

## Anexo 2: Protocolo CTAB 2 por ciento para la extracción del ADN total

- **Preparación de 1 litro de buffer CTAB 2X:** En una botella con tapa, conteniendo 200 ml de agua destilada, adicionar 40 ml de EDTA 0.5 M (Ácido etilendiaminotetraacético), 100 ml de Tris-HCl pH 8 y 81.81 g de NaCl (Cloruro de sodio). Mezclar bien y calentar en horno microondas. Enseguida, adicionar 20 g de CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), 10 g de PVP (Polivinilpirrolidona), aforar hasta 1 litro con agua destilada y esterilizar en autoclave (121° C a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 20 minutos).
- Rotular tres microtubos de 1.5 ml esterilizados y colocarlos en una gradilla.
- Extraer una porción de micelio con un bisturí estéril, raspando suavemente la superficie del medio de cultivo e introducir en el fondo de un microtubo esterilizado de 1.5 ml.
- Agregar unas gotas de nitrógeno líquido para solidificar el micelio.
- Macerar el micelio con un micropistilo estéril, previamente enfriado con nitrógeno líquido, hasta pulverizarlo.
- Adicionar 750 µl de CTAB 2X, 3 µl de β-Mercaptoethanol (4 µl de β-Mercaptoethanol/ml de CTAB 2X) y homogenizar bien la mezcla en el agitador vortex.
- Colocar el microtubo en baño maría a 65 °C, durante 40 minutos y homogenizar 2 veces en ese transcurso de tiempo.
- Retirar del baño maría y añadir 700 µl de Cloroformo-isoamílico (24:1) y homogenizar bien por inversión manualmente (10 veces).
- Centrifugar a 14000 rpm durante 8 minutos.
- Rescatar el sobrenadante de la fase superior y colocar en un nuevo microtubo esterilizado de 1.5 ml.
- Adicionar 60 µl de CTAB 10X (previamente se mantuvo a 65 °C en baño maría) y homogenizar bien por inversión manualmente.
- Añadir 700 µl de Cloroformo-isoamílico (24:1) y homogenizar bien por inversión manualmente.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 8 minutos.
- Rescatar el sobrenadante de la fase superior y colocar en un nuevo microtubo esterilizado de 1.5 ml.
- Agregar 500 µl de Isopropanol al 100 por ciento y homogenizar bien.
- Incubar en ultracongelador a -20 °C, durante 30 minutos.
- Homogenizar bien y centrifugar a 14000 rpm, durante 8 minutos (para inducir la formación del pellet de ADN).
- Descartar el sobrenadante y conservar el pellet de ADN.
- Agregar 500 µl de etanol al 70 por ciento y resuspender suavemente el pellet con la micropipeta en uso.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 8 minutos.
- Descartar el sobrenadante y conservar el pellet de ADN.

- Agregar 500  $\mu$ l de etanol al 90 por ciento y resuspender suavemente el pellet con la micropipeta en uso.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 8 minutos.
- Descartar el sobrenadante y conservar el pellet de ADN.
- Colocar los microtubos en posición vertical con la tapa abierta (conteniendo el pellet) en una gradilla y dejar secar durante 24 horas (obteniéndose un pellet de ADN completamente seco).
- Resuspender completamente el pellet de ADN en 50  $\mu$ l de agua Mili-Q.
- Adicionar 1  $\mu$ l de ARNasa/muestra e incubar a 37 °C durante 2 horas.
- Cuantificar la muestra extraída de ADN.

**Anexo 3:** Evaluaciones morfométricas de las características asexuales del aislamiento JC2 de *Phytophthora*, para la identificación a nivel de especie

N° de observ. (Aislam. JC2)	Esporangio			Clamidospora
	Largo (µm)	Ancho (µm)	Relación L/A	Diámetro (µm)
1	38.75	32.50	1.19	33.75
2	47.50	40.00	1.19	26.25
3	47.50	38.75	1.23	30.00
4	47.50	37.50	1.27	25.00
5	53.75	46.25	1.16	42.50
6	47.50	40.00	1.19	38.75
7	48.75	38.75	1.26	28.75
8	56.25	46.25	1.22	23.75
9	31.25	25.00	1.25	26.25
10	43.75	37.50	1.17	36.25
11	53.75	42.50	1.26	23.75
12	48.75	38.75	1.26	36.25
13	48.75	43.75	1.11	26.25
14	46.25	38.75	1.19	35.00
15	47.50	37.50	1.27	28.75
16	48.75	35.00	1.39	28.75
17	42.50	32.50	1.31	36.25
18	53.75	46.25	1.16	23.75
19	42.50	32.50	1.31	33.75
20	48.75	37.50	1.30	36.25
21	42.50	33.75	1.26	31.25
22	52.50	42.50	1.24	27.50
23	55.00	42.50	1.29	37.50
24	42.50	28.75	1.48	30.00
25	58.75	47.50	1.24	28.75
26	36.25	28.75	1.26	31.25
27	43.75	35.00	1.25	35.00
28	41.25	32.50	1.27	31.25
29	55.00	51.25	1.07	35.00
30	48.75	42.50	1.15	43.75
31	71.25	50.00	1.43	21.25
32	31.25	17.50	1.79	32.50
33	27.50	21.25	1.29	26.25
34	36.25	28.75	1.26	22.50
35	41.25	32.50	1.27	28.75
36	43.75	36.25	1.21	38.75
37	35.00	26.25	1.33	20.00
38	51.25	45.00	1.14	25.00
39	47.50	33.75	1.41	31.25
40	48.75	38.75	1.26	22.50
41	37.50	27.50	1.36	33.75
42	47.50	38.75	1.23	33.75
43	40.00	31.25	1.28	28.75
44	32.50	27.50	1.18	30.00
45	46.25	38.75	1.19	40.00
46	43.75	27.50	1.59	33.75
47	33.75	28.75	1.17	30.00
48	48.75	40.00	1.22	30.00

49	45.00	32.50	1.38	26.25
50	25.00	20.00	1.25	25.00
51	43.75	35.00	1.25	40.00
52	42.50	36.25	1.17	30.00
53	42.50	32.50	1.31	41.25
54	41.25	33.75	1.22	35.00
55	32.50	26.25	1.24	40.00
56	53.75	48.75	1.10	51.25
57	47.50	42.50	1.12	32.50
58	32.50	23.75	1.37	48.75
59	47.50	37.50	1.27	28.75
60	40.00	30.00	1.33	32.50
61	32.50	27.50	1.18	26.25
62	55.00	35.00	1.57	31.25
63	32.50	17.50	1.86	32.50
64	37.50	33.75	1.11	32.50
65	47.50	36.25	1.31	38.75
66	43.75	35.00	1.25	31.25
67	47.50	36.25	1.31	51.25
68	41.25	35.00	1.18	21.25
69	30.00	21.25	1.41	27.50
70	33.75	23.75	1.42	36.25
71	38.75	27.50	1.41	38.75
72	38.75	21.25	1.82	42.50
73	42.50	30.00	1.42	35.00
74	58.75	50.00	1.18	42.50
75	51.25	43.75	1.17	36.25
76	46.25	31.25	1.48	45.00
77	45.00	36.25	1.24	38.75
78	46.25	37.50	1.23	35.00
79	41.25	33.75	1.22	31.25
80	48.75	40.00	1.22	33.75
81	42.50	31.25	1.36	32.50
82	48.75	36.25	1.34	33.75
83	46.25	37.50	1.23	33.75
84	37.50	25.00	1.50	36.25
85	48.75	41.25	1.18	38.75
86	48.75	37.50	1.30	65.00
87	55.00	43.75	1.26	31.25
88	53.75	47.50	1.13	32.50
89	48.75	40.00	1.22	36.25
90	43.75	37.50	1.17	30.00
91	50.00	38.75	1.29	35.00
92	46.25	38.75	1.19	31.25
93	38.75	28.75	1.35	33.75
94	40.00	25.00	1.60	36.25
95	35.00	22.50	1.56	33.75
96	25.00	18.75	1.33	27.50
97	47.50	40.00	1.19	33.75
98	43.75	31.25	1.40	18.75
99	50.00	42.50	1.18	27.50
100	60.00	50.00	1.20	32.50
Promedio	44.46	35.08	1.29	32.99

**Anexo 4:** Evaluaciones de las características morfométricas sexuales del aislamiento JC2 de *Phytophthora*, para la identificación a nivel de especie

N° de obs. (Aislam. JC2)	Anteridio		Oogonio	Oospora	
	Largo (µm)	Ancho (µm)	Diámetro (µm)	Diámetro (µm)	Grosor de la pared (µm)
1	14.38	17.50	30.00	27.50	2.50
2	13.75	16.25	28.13	24.38	1.25
3	15.00	15.00	30.00	25.00	2.50
4	17.50	16.25	28.75	26.25	2.50
5	17.50	17.50	28.75	26.25	2.50
6	17.50	16.25	31.25	27.50	2.50
7	13.75	15.00	27.50	22.50	1.88
8	13.13	14.38	27.50	23.75	2.50
9	18.13	18.13	30.00	26.25	1.88
10	15.00	15.63	27.50	22.50	1.88
11	12.50	14.38	27.50	23.75	1.88
12	14.38	16.25	29.38	26.25	1.88
13	15.00	17.50	35.63	25.00	2.50
14	12.50	15.00	28.75	25.00	1.88
15	15.00	16.25	27.50	21.25	2.50
16	15.00	15.00	27.50	22.50	2.50
17	15.00	16.25	28.75	25.00	1.88
18	12.50	16.25	28.75	23.75	2.50
19	13.75	16.25	27.50	23.75	1.88
20	18.75	16.88	27.50	23.75	1.88
21	17.50	16.25	27.50	22.50	2.50
22	13.75	18.13	33.75	24.38	1.88
23	15.00	15.00	32.50	25.00	1.88
24	12.50	16.88	29.38	22.50	1.88
25	18.75	18.75	35.63	29.38	2.50
Promedio	15.10	16.28	29.48	24.63	2.15

**Anexo 5:** Relaciones de temperaturas en el ritmo de crecimiento micelial de los aislamientos de *Phytophthora* en estudio, para la identificación a nivel de especie

Aislamientos	Fundo de procedencia	Ritmo promedio de crecimiento micelial (mm/día)					
		5 °C	10 °C	25 °C	32 °C	35 °C	37 °C
JC1	J. Valverde	0	0.34	3.19	2.73	2.75	0.28
JC2	R. Morales	0	0.35	3.61	2.94	2.83	0.43
JC3	R. Morales	0	0.24	2.25	2.24	2.45	0.17
JC4	R. Morales	0	0.24	3.09	2.90	2.77	0.29
JC5	Tres arbolitos	0	0.31	2.83	2.78	2.97	0.34
JC6	Tres arbolitos	0	0.25	2.99	2.70	2.55	0.29
JC7	Hugo Pretel	0	0.25	3.02	2.69	2.91	0.33
JC8	Bandurria	0	0.39	3.49	3.06	3.06	0.43

**Anexo 6:** Datos meteorológicos registrados en la prueba de control químico y biológico en invernadero

Fechas	Temperatura (° C)		Humedad relativa (%)	
	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
26/05/19 – 01/06/19	24.6	18.7	85.4	70.5
02/06/19 – 08/06/19	24.8	17.9	80.6	68.0
09/06/19 – 15/06/19	25.9	18.3	78.0	67.3
16/06/19 – 22/06/19	22.6	17.7	86.4	76.7
23/06/19 – 29/06/19	25.7	18.2	85.0	73.0
30/06/19 – 06/07/19	22.1	17.9	88.8	80.8
07/07/19 – 13/07/19	24.0	18.5	87.9	76.6
14/07/19 – 20/07/19	22.1	17.7	89.0	79.1

**Anexo 7:** Evaluación de la inhibición del crecimiento micelial (mm) de *Phytophthora nicotianae* en la prueba de control químico *in vitro*

Rep.	Tratamientos									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
1	36.94	0.00	4.94	11.56	2.69	0.00	32.00	12.81	2.50	0.00
2	36.88	0.00	4.00	12.38	5.44	0.00	31.06	14.94	2.19	0.00
3	36.19	0.00	5.19	12.44	5.25	0.00	28.56	15.25	2.81	0.00
4	37.50	0.00	5.13	13.06	4.19	0.00	33.44	14.81	3.06	0.00
5	36.06	0.00	4.75	12.94	4.44	0.00	30.31	13.94	2.25	0.00
6	36.56	0.00	4.75	12.56	4.94	0.00	30.38	14.13	3.19	0.00
7	35.81	0.00	5.00	13.88	3.94	0.00	33.31	13.25	2.38	0.00
8	36.75	0.00	4.44	13.13	3.69	0.00	32.50	15.13	2.75	0.00
9	38.00	0.00	4.69	13.81	3.69	0.00	31.94	14.56	2.38	0.00
10	36.88	0.00	5.56	12.50	4.19	0.00	32.13	13.94	3.00	0.00
11	34.50	0.00	4.94	13.63	3.81	0.00	30.13	14.50	2.50	0.00
12	37.63	0.00	4.44	13.19	4.19	0.00	32.44	14.50	2.06	0.00
13	37.69	0.00	4.19	12.25	3.63	0.00	29.31	14.56	2.69	0.00
14	38.13	0.00	4.44	12.69	2.81	0.00	29.81	15.75	2.81	0.00
15	36.31	0.00	4.69	13.19	4.69	0.00	31.38	14.50	2.44	0.00
16	36.75	0.00	4.06	12.13	4.69	0.00	32.06	14.25	2.31	0.00
17	36.25	0.00	4.00	13.44	3.50	0.00	30.75	14.19	3.00	0.00
18	35.75	0.00	5.31	13.25	3.69	0.00	33.63	14.81	2.00	0.00
19	37.00	0.00	5.06	14.81	5.31	0.00	32.38	14.56	2.31	0.00
20	36.44	0.00	4.69	11.69	5.00	0.00	29.88	14.31	2.25	0.00

**Anexo 8:** Evaluación de la inhibición del crecimiento micelial (mm) de *Phytophthora nicotianae* en la prueba de control biológico *in vitro*

Repeticiones	Tratamientos		
	T1	T2	T3
1	47.75	19.75	19.25
2	49.50	19.25	21.00
3	48.25	17.75	19.75
4	52.50	19.50	20.75
5	49.00	19.00	19.50
6	50.50	19.00	20.25
7	46.25	17.75	19.25
8	50.25	19.00	20.50
9	46.00	18.50	20.00
10	47.75	19.00	19.75
11	50.00	18.75	19.25
12	47.00	17.75	18.75
13	51.25	18.50	20.50
14	49.25	19.00	21.50
15	50.50	17.75	18.75
16	45.75	18.00	20.50
17	50.00	19.00	19.25
18	50.75	19.25	20.25
19	50.50	18.50	19.00
20	50.75	19.50	21.25

**Anexo 9:** Evaluaciones de altura de plantas de mandarino Cleopatra (cm) en la prueba de control químico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Rep.	Tratamientos										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
1	3.10	0.45	0.70	1.20	0.60	1.25	0.55	0.60	0.90	0.90	0.70
2	5.70	0.55	0.75	0.95	0.65	0.95	0.45	0.75	0.75	1.00	0.65
3	6.20	0.55	0.65	0.80	0.70	1.15	0.65	0.80	0.80	0.85	0.35
4	5.30	0.50	0.75	0.85	0.65	1.15	0.75	0.75	0.55	1.30	0.60
5	3.55	0.35	0.80	1.00	0.60	1.10	0.40	0.90	0.65	0.85	0.45
6	3.10	0.15	1.00	1.50	0.65	1.20	0.60	0.70	0.70	0.80	0.75
7	6.35	0.25	0.90	1.20	0.55	1.05	0.40	0.55	0.60	0.95	0.55
8	3.35	0.40	1.05	0.85	0.45	0.95	0.60	0.50	0.70	0.75	0.40
9	3.90	0.50	0.95	1.05	0.65	1.35	0.45	0.80	0.75	1.25	0.45
10	3.80	0.30	0.75	0.90	0.45	0.95	0.65	0.85	0.80	1.05	0.65
11	3.35	0.40	0.70	1.10	0.55	1.05	0.40	0.80	0.65	1.20	0.40
12	3.70	0.55	0.65	1.20	0.60	0.95	0.90	0.85	1.00	0.85	0.50
13	3.65	0.40	0.60	0.90	0.40	0.90	0.70	0.60	0.75	1.15	0.55
14	5.30	0.35	0.65	1.05	0.55	1.05	0.50	0.50	0.80	0.80	0.60
15	4.40	0.55	0.85	1.15	0.50	0.95	0.55	0.45	0.55	0.95	0.45
16	3.00	0.30	1.10	0.85	0.55	1.25	0.90	0.75	0.65	0.75	0.40
17	3.50	0.45	1.05	1.15	0.40	1.30	0.65	0.90	0.50	0.75	0.70
18	3.50	0.25	0.85	1.05	0.65	1.05	0.50	0.75	0.90	0.85	0.60
19	3.90	0.50	0.65	0.85	0.55	1.25	0.60	0.70	0.80	0.90	0.40
20	3.05	0.45	0.70	0.95	0.90	1.30	0.70	0.50	0.60	0.85	0.50

**Anexo 10:** Evaluaciones de peso fresco de plantas de mandarino Cleopatra (g) en la prueba de control químico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Rep.	Tratamientos										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
1	21.8	8.4	9.7	12.1	10.7	13.9	10.5	9.9	13.3	13.9	12.0
2	21.0	9.6	12.7	12.4	11.0	12.5	10.7	10.2	13.2	13.8	8.8
3	20.2	9.5	13.3	14.0	9.2	13.5	11.0	9.7	9.6	13.3	9.6
4	22.8	11.6	11.7	14.0	11.6	13.9	13.0	11.8	10.9	13.7	11.3
5	21.1	10.0	9.8	13.6	10.0	14.8	10.0	12.2	13.2	12.2	10.2
6	20.9	11.9	13.4	12.7	12.7	15.6	10.5	11.7	10.1	13.4	11.8
7	22.8	11.6	9.7	13.0	10.7	15.0	12.4	12.3	9.5	14.8	8.5
8	20.7	9.3	12.4	15.1	12.3	13.7	13.3	9.9	10.1	14.5	8.6
9	21.6	10.2	9.7	15.1	13.0	14.5	11.8	9.7	11.2	12.6	11.1
10	21.7	11.4	9.8	13.6	11.6	13.0	12.9	12.9	9.5	14.9	8.6
11	22.8	9.6	12.9	14.1	9.2	14.8	10.7	12.9	10.1	11.6	12.0
12	19.8	9.3	12.7	12.7	11.8	13.1	11.7	9.3	12.9	13.5	10.6
13	20.5	10.8	13.5	13.0	11.6	12.4	10.9	12.3	9.7	13.6	11.8
14	22.2	8.6	10.5	12.1	9.5	13.2	11.2	12.3	13.1	12.8	9.9
15	20.1	11.4	12.2	14.7	9.8	14.7	12.2	10.0	11.2	12.3	9.0
16	21.5	8.4	10.3	14.4	10.4	14.8	9.9	9.8	9.5	14.5	10.4
17	20.7	11.4	11.9	13.6	11.6	13.5	13.0	10.2	13.2	14.3	10.0
18	20.2	8.8	12.6	12.2	9.2	12.7	11.2	10.1	13.3	11.8	11.5
19	21.9	9.6	10.5	14.3	11.6	15.3	9.9	12.8	10.8	12.4	11.6
20	21.6	10.9	13.5	14.8	12.8	14.0	9.3	12.6	13.1	11.8	8.8

**Anexo 11:** Evaluaciones de peso seco de plantas de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control químico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Rep.	Tratamientos										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
1	8.38	4.70	5.20	6.93	5.61	6.86	4.96	4.55	4.65	6.97	3.71
2	8.90	4.60	5.61	6.61	4.76	6.29	4.86	4.43	4.87	7.61	3.75
3	8.49	3.32	5.17	7.48	5.30	7.00	4.41	4.95	5.09	6.43	3.81
4	9.71	3.36	5.59	6.40	5.64	7.59	5.20	5.94	5.89	6.51	4.66
5	7.91	4.10	5.23	6.77	4.77	7.14	5.16	5.90	4.61	7.08	4.03
6	8.48	3.95	6.00	6.41	5.32	6.91	5.62	5.42	5.05	6.53	4.58
7	9.56	3.44	6.23	6.17	4.26	7.01	4.90	5.27	6.26	5.78	3.97
8	9.00	3.54	5.87	6.97	4.41	6.82	5.07	5.25	5.51	6.92	4.54
9	9.07	3.89	4.90	7.14	5.25	7.43	5.28	4.85	6.02	6.57	3.36
10	9.05	4.16	6.00	6.76	4.31	6.45	5.80	5.94	5.58	5.71	4.38
11	9.46	3.53	4.68	6.93	5.76	6.83	4.75	4.69	5.06	7.29	3.72
12	8.05	4.62	5.19	6.73	4.87	7.25	5.51	4.24	5.61	7.46	3.36
13	8.45	3.56	5.67	6.85	5.40	6.29	4.97	5.34	5.85	6.41	4.32
14	9.37	3.82	5.11	6.08	4.93	6.35	5.08	5.88	5.03	6.36	3.61
15	8.88	3.90	4.43	6.98	4.36	7.44	4.41	4.56	5.43	6.44	4.66
16	9.25	3.15	5.82	7.17	5.15	7.10	5.32	4.80	4.55	6.05	3.64
17	8.20	3.92	5.68	6.81	4.81	6.95	5.18	4.39	5.77	6.07	4.42
18	8.51	4.70	4.77	6.30	5.13	6.71	5.19	5.29	5.27	7.16	3.69
19	8.67	3.91	4.72	7.10	5.40	7.46	5.65	4.76	4.80	6.30	3.75
20	8.89	4.75	4.74	7.00	4.71	6.94	5.91	5.26	4.26	7.58	4.16

**Anexo 12:** Evaluaciones de peso fresco de raíces de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control químico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Rep.	Tratamientos										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
1	8.60	2.55	4.32	4.08	2.85	4.27	2.45	3.33	3.17	3.56	1.86
2	7.89	1.82	4.29	3.95	3.43	3.80	2.60	3.15	3.30	3.60	2.25
3	7.90	1.92	3.58	4.18	3.40	3.67	3.10	2.95	2.76	4.05	2.40
4	8.80	2.00	3.38	4.18	3.10	4.47	2.78	2.75	2.87	3.56	2.60
5	7.91	2.30	4.30	3.75	2.75	4.00	2.55	2.35	3.74	3.76	2.16
6	8.81	2.75	4.15	3.80	3.33	4.40	3.38	3.03	3.20	3.85	2.40
7	8.80	1.85	3.37	4.30	2.55	4.75	3.36	3.33	3.74	3.76	2.20
8	7.94	1.85	3.65	4.35	3.05	4.60	3.18	2.83	2.88	4.35	1.96
9	8.81	2.67	3.55	4.35	2.85	4.47	2.65	2.33	2.98	4.35	2.45
10	8.85	1.85	3.46	3.55	2.85	4.20	3.03	3.25	3.74	4.35	2.10
11	8.71	2.65	3.65	3.98	3.05	4.47	2.70	2.75	3.40	3.95	2.30
12	8.01	2.00	4.24	3.55	3.03	3.97	3.38	2.43	2.81	3.56	2.16
13	8.82	2.63	3.41	4.05	3.33	3.77	2.65	2.33	3.44	3.80	2.60
14	8.79	2.23	4.11	3.95	2.95	3.77	2.65	2.95	3.24	4.35	1.90
15	7.91	1.73	3.95	4.40	2.83	3.67	2.80	2.63	3.21	4.10	2.78
16	7.91	2.13	3.51	4.50	3.05	4.67	2.75	3.05	2.91	3.40	1.86
17	7.89	2.23	3.91	4.35	3.43	4.27	3.36	3.15	3.02	3.40	2.60
18	8.77	2.63	4.08	3.80	3.10	3.87	2.65	2.55	2.99	3.46	2.35
19	7.92	2.63	3.39	4.10	2.70	4.47	3.00	2.85	3.64	3.76	2.06
20	8.82	1.65	4.25	3.90	3.43	3.77	2.50	2.53	3.54	3.95	2.55

**Anexo 13:** Evaluaciones de peso seco de raíces de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control químico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Rep.	Tratamientos										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
1	2.52	0.82	1.21	1.34	0.95	1.23	0.99	1.07	0.95	1.28	0.80
2	2.60	0.64	1.22	1.17	1.11	1.28	0.97	1.10	1.04	1.21	0.78
3	2.28	0.62	0.98	1.43	1.12	1.27	0.99	0.93	0.94	1.32	0.79
4	2.48	0.66	1.03	1.24	1.07	1.46	1.12	0.88	0.95	1.18	0.86
5	2.38	0.77	1.17	1.19	0.95	1.29	0.95	1.06	1.24	1.15	0.70
6	2.36	0.64	0.95	1.17	1.15	1.43	1.06	0.98	0.99	1.31	0.85
7	2.31	0.64	0.98	1.22	0.93	1.38	1.16	0.96	1.21	1.33	0.80
8	2.32	0.62	1.01	1.41	1.05	1.37	1.17	1.08	1.20	1.32	0.72
9	2.32	0.83	0.95	1.42	0.95	1.45	0.93	0.92	1.21	1.18	0.79
10	2.51	0.62	1.04	1.16	0.95	1.29	1.13	1.10	1.26	1.30	0.70
11	2.48	0.85	0.99	1.43	0.88	1.42	1.02	0.94	1.21	1.29	0.70
12	2.34	0.77	1.20	1.19	1.10	1.21	1.16	0.90	1.06	1.15	0.76
13	2.56	0.85	1.09	1.22	1.14	1.27	0.94	0.90	1.14	1.21	0.86
14	2.58	0.75	1.22	1.16	0.88	1.22	0.89	0.89	1.12	1.23	0.75
15	2.32	0.64	1.09	1.43	1.10	1.28	0.92	0.93	0.95	1.28	0.90
16	2.55	0.81	0.99	1.43	0.99	1.46	0.97	0.93	0.91	1.16	0.75
17	2.31	0.81	1.17	1.42	1.09	1.30	1.10	0.95	0.92	1.30	0.83
18	2.58	0.83	1.23	1.16	1.08	1.25	0.95	0.89	0.96	1.18	0.89
19	2.35	0.65	1.02	1.19	0.98	1.44	0.95	0.93	1.17	1.36	0.88
20	2.60	0.71	1.20	1.41	1.18	1.20	0.93	0.83	1.18	1.32	0.84

**Anexo 14:** Evaluaciones de severidad de la pudrición radicular de mandarino Cleopatra (%) en la prueba de control químico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Rep.	Tratamientos										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
1	0	97	35	43	98	30	85	48	95	70	100
2	0	100	75	53	43	68	78	63	83	47	45
3	0	100	88	60	75	35	85	78	100	100	80
4	0	98	70	38	90	43	92	68	100	67	86
5	0	95	40	83	100	46	100	96	45	75	85
6	0	96	55	36	65	71	86	73	80	29	83
7	0	98	97	63	100	52	77	39	27	50	86
8	0	100	72	65	85	63	42	58	100	47	100
9	0	100	60	23	96	38	100	88	86	39	23
10	0	98	100	76	94	63	74	48	65	49	89
11	0	96	72	11	93	21	75	80	63	89	87
12	0	100	60	98	44	43	60	97	100	76	100
13	0	88	96	66	62	66	100	100	68	62	96
14	0	100	35	90	96	79	82	68	72	100	83
15	0	100	45	54	55	83	81	100	77	72	48
16	0	100	94	26	87	28	70	63	66	45	100
17	0	93	62	63	57	41	40	78	82	62	92
18	0	87	60	38	84	71	78	68	100	80	78
19	0	100	95	73	75	43	68	78	36	27	100
20	0	100	66	53	68	58	100	73	55	25	82

**Anexo 15:** Evaluaciones de altura de plantas de mandarina Cleopatra (cm) en la prueba de control biológico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Repeticiones	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
1	3.10	0.45	0.55	0.85
2	5.70	0.55	0.70	0.70
3	6.20	0.55	0.90	1.10
4	5.30	0.50	0.45	0.85
5	3.55	0.35	0.75	0.75
6	3.10	0.15	0.85	1.15
7	6.35	0.25	0.55	0.90
8	3.35	0.40	0.60	1.10
9	3.90	0.50	0.40	0.75
10	3.80	0.30	0.65	0.65
11	3.35	0.40	0.70	0.75
12	3.70	0.55	0.60	1.00
13	3.65	0.40	0.80	0.70
14	5.30	0.35	0.50	1.05
15	4.40	0.55	0.80	0.95
16	3.00	0.30	0.50	1.20
17	3.50	0.45	0.50	0.75
18	3.50	0.25	0.60	0.85
19	3.90	0.50	0.85	0.90
20	3.05	0.45	0.45	1.05

**Anexo 16:** Evaluaciones de peso fresco de plantas de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control biológico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Repeticiones	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
1	21.8	8.4	10.3	14.1
2	21.0	9.6	13.3	13.6
3	20.2	9.5	13.5	14.3
4	22.8	11.6	11.5	15.0
5	21.1	10.0	10.2	15.2
6	20.9	11.9	13.6	12.5
7	22.8	11.6	10.6	13.9
8	20.7	9.3	9.8	14.1
9	21.6	10.2	13.2	15.4
10	21.7	11.4	12.8	14.0
11	22.8	9.6	10.1	12.8
12	19.8	9.3	12.6	16.1
13	20.5	10.8	13.5	13.4
14	22.2	8.6	9.8	15.3
15	20.1	11.4	10.7	14.3
16	21.5	8.4	13.6	15.1
17	20.7	11.4	12.9	15.5
18	20.2	8.8	9.8	12.5
19	21.9	9.6	10.8	14.1
20	21.6	10.9	9.9	13.8

**Anexo 17:** Evaluaciones de peso seco de plantas de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control biológico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Repeticiones	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
1	8.38	4.70	4.05	4.51
2	8.90	4.60	5.15	5.35
3	8.49	3.32	5.23	4.98
4	9.71	3.36	4.43	5.67
5	7.91	4.10	3.88	5.00
6	8.48	3.95	5.27	4.47
7	9.56	3.44	4.35	4.93
8	9.00	3.54	3.77	5.02
9	9.07	3.89	5.02	5.41
10	9.05	4.16	4.38	4.82
11	9.46	3.53	4.29	4.60
12	8.05	4.62	5.17	5.77
13	8.45	3.56	4.46	5.05
14	9.37	3.82	4.30	5.57
15	8.88	3.90	4.46	5.67
16	9.25	3.15	5.14	5.71
17	8.20	3.92	4.72	5.51
18	8.51	4.70	4.17	4.76
19	8.67	3.91	3.98	4.76
20	8.89	4.75	4.09	4.90

**Anexo 18:** Evaluaciones de peso fresco de raíces de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control biológico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Repeticiones	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
1	8.60	2.55	3.06	5.11
2	7.89	1.82	3.10	4.47
3	7.90	1.92	3.65	4.80
4	8.80	2.00	3.00	4.60
5	7.91	2.30	2.60	4.68
6	8.81	2.75	3.65	4.30
7	8.80	1.85	2.70	4.70
8	7.94	1.85	2.56	5.00
9	8.81	2.67	2.60	5.08
10	8.85	1.85	2.76	4.80
11	8.71	2.65	2.60	4.37
12	8.01	2.00	3.65	5.00
13	8.82	2.63	3.25	4.57
14	8.79	2.23	2.86	4.48
15	7.91	1.73	2.76	4.77
16	7.91	2.13	3.64	4.30
17	7.89	2.23	3.55	4.78
18	8.77	2.63	2.76	4.07
19	7.92	2.63	3.56	4.68
20	8.82	1.65	2.80	4.70

**Anexo 19:** Evaluaciones de peso seco de raíces de mandarina Cleopatra (g) en la prueba de control químico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Repeticiones	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
1	2.52	0.82	0.86	1.31
2	2.60	0.64	0.90	1.21
3	2.28	0.62	1.12	1.33
4	2.48	0.66	0.86	1.33
5	2.38	0.77	0.88	1.44
6	2.36	0.64	1.10	1.21
7	2.31	0.64	0.83	1.27
8	2.32	0.62	0.86	1.22
9	2.32	0.83	1.12	1.45
10	2.51	0.62	0.96	1.32
11	2.48	0.85	0.84	1.20
12	2.34	0.77	1.11	1.39
13	2.56	0.85	1.08	1.21
14	2.58	0.75	0.86	1.45
15	2.32	0.64	0.83	1.40
16	2.55	0.81	1.11	1.36
17	2.31	0.81	1.12	1.45
18	2.58	0.83	0.94	1.19
19	2.35	0.65	1.10	1.38
20	2.60	0.71	0.84	1.19

**Anexo 20:** Evaluaciones de severidad de la pudrición radicular de mandarina Cleopatra (%) en la prueba de control biológico de *Phytophthora nicotianae* en invernadero

Repeticiones	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
1	0	97	68	20
2	0	100	40	45
3	0	100	13	22
4	0	98	43	65
5	0	95	65	18
6	0	96	13	21
7	0	98	93	19
8	0	100	96	10
9	0	100	87	8
10	0	98	88	7
11	0	96	96	25
12	0	100	10	23
13	0	88	17	25
14	0	100	100	17
15	0	100	13	35
16	0	100	40	36
17	0	93	25	17
18	0	87	100	43
19	0	100	24	14
20	0	100	45	13

**Anexo 21:** Secuencias de la región cox II de los aislamientos en estudio y de referencia (GenBank) de *Phytophthora nicotianae* utilizadas en el análisis bioinformático

Aislamiento	Género/Especie	Procedencia	Hospedante	Secuencia
JC1	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	CGGTTATGGAGGGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTTTAATTA TGATTACAGTATTTGTTTGGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGATG AAAAAAAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTGAAATT ATTTGGACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTCCATCTTTT GCATTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTACTTTAAAAGTA ATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTACAAATATTCAGATAATTTAGAATTTTC AAATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGATTTAGCAA TAGGTCAATTTAACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTCCAATAAT AGTCATATTAAGTATTAATTACTGCATCAAATGTATTACATTCATGGGCTATT CCTTCATTAGGCATTAATTAATGCTTGTCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCT ATGTTTATTAATA
JC2	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	CTGCAACTCCGGTTATGGAGGGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTT TTTTAATTATGATTACAGTATTTGTTTGGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCT TTTTGATGAAAAAAAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTA TTGAAATTATTTGGACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTC CATCTTTGCATTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTACTT TAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTTA GAATTTCAAATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGA TTTAGCAATAGGTCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTC CAACTAATAGTCATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAAATGTATTACATTCA TGGGCTATTCCTTCATTAGGCATTAATTAGATGCTTGTCCAGGTCGTTTAAAT CAAACCTTCTATGTTTATTAATA
JC3	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	CCTGCAACTCCGGTTATGGAGGGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTT TTTTAATTATGATTACAGTATTTGTTTGGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTC TTTTTGATGAAAAAAAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACT ATTGAAATTATTTGGACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTT CCATCTTTTGCATTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTACT TAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTT AGAATTTCAAATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATG ATTTAGCAATAGGTCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTT CAAACCTAATAGTCATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAAATGTATTACATTC

				ATGGGCTATTCCTTCATTAGGCATTAATAATTAGATGCTTGCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTATTAAGAGAGAAGGTGTTTTTTA
JC4	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	TGCAACTCCGGTTATGGAGGGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTAATTATGATTACAGTATTTGTTTGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTGATGAAAAAAAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTGAAATTATTTGGACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTCCATCTTTTGCATTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTACTTTAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTTAGAATTTCAAATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGATTTAGCAATAGGTCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTCCAATAATAGTCATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAAATGTATTACATTCATGGGCTATTCCTTCATTAGGCATTAATAATTAGATGCTTGCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTATTAAGAGAGAAGGTGTTTTTTATGGTCAATGTATG
JC5	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	TGCAACTCCGGTTATGGAGGGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTAATTATGATTACAGTATTTGTTTGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTGATGAAAAAAAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTGAAATTATTTGGACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTCCATCTTTTGCATTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTACTTTAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTTAGAATTTCAAATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGATTTAGCAATAGGTCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTCCAATAATAGTCATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAAATGTATTACATTCATGGGCTATTCCTTCATTAGGCATTAATAATTAGATGCTTGCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTATTAAGAGAGAGGTGTTTTTTATGGTCAATGTATG
JC6	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	CTGCAACTCCGGTTATGGAGGGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTAATTATGATTACAGTATTTGTTTGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTGATGAAAAAAAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTGAAATTATTTGGACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTCCATCTTTTGCATTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTACTTTAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTTAGAATTTCAAATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGATTTAGCAATAGGTCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTCCAATAATAGTCATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAAATGTATTACATTCATGGGCTATTCCTTCATTAGGCATTAATAATTAGATGCTTGCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTATTAAGAGAGAGGTGTTTTTTATGGTCAAT

JC7	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	CTGCAACTCCGGTTATGGAGGGTATTATTAACCTTCATCATGATTTAATGTTTT TTTTAATTATGATTACAGTATTTGTTTGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCT TTTTGATGAAAAAAAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTA TTGAAATTATTTGGACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTC CATCTTTTGCATTATTATATTTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTACTT TAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTTA GAATTTTCAAATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGA TTAGCAATAGGTCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTC CAACTAATAGTCATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAAATGTATTACATTCA TGGGCTATTCCTTCATTAGGCATTAATAATGCTTGTCCAGGTCGTTTAAAT CAAACCTTCTATGTTTATTAAGAGAAGGTGTTTTTTATGGTCAA
JC8	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	CTGCAACTCCGGTTATGGAGGGTATTATTAACCTTCATCATGATTTAATGTTTT TTTTAATTATGATTACAGTATTTGTTTGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCT TTTTGATGAAAAAAAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTA TTGAAATTATTTGGACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTC CATCTTTTGCATTATTATATTTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTACTT TAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTTA GAATTTTCAAATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGA TTAGCAATAGGTCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTC CAACTAATAGTCATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAAATGTATTACATTCA TGGGCTATTCCTTCATTAGGCATTAATAATGCTTGTCCAGGTCGTTTAAAT CAAACCTTCTATGTTTATTAAGAGAAGGTGTTTTTTATGGTCAA
KF636133 (Sun <i>et al.</i> 2013)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	ATGGAGGGTATTATTAACCTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTTAATTATGATT ACAGTATTTGTTTGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGATGAAAA AAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTGAAATTATTTG GACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTCCATCTTTTGCATT ATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTACTTTAAAAGTAATAG GTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTTAGAATTTTTCAGAT GAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGATTTAGCAATAGG TCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTCCAATAATAGTC ATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAGATGTATTACATTCATGGGCTATTCCT CATTAGGCATTAATAATGATGCTTGTCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCTATGT TTATTAATA
GU318304 (Martin and Radmer 2009)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	ATGGAGGGTATTATTAACCTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTTAATTATGATT ACAGTATTTGTTTGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGATGAAAA AAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTGAAATTATTTG

				GACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTCCATCTTTTGCATT ATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTACTTTAAAAGTAATAG GTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTTAGAATTTTCAGAT GAACCTTTAATTTTGGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGATTTAGCAATAGG TCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTCCAACATAATAGTC ATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAGATGTATTACATTCATGGGCTATTCCTT CATTAGGCATTAATTTAGATGCTTGTCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCTATGT TTATTAAGAGAAGGTGTTTTTATGGACAATGTAGTGAAATTTGTGGAGTA AATCATGGATTTATGCCTATTGTAGTAGAAGCTGTATCATTAGAAGATTATTT AATTTGGTTAAAAAATAAAATTAATTTTGATTTTAAATGCATAATAAATAAAAA ATTTATGATATTTAAAATCATTGGTATAACTTTTTTAATATTATTATTACT GATATTAAGCAAATAATTAATAAAATTAACAATTTTTTAATAAATAAATAA AAAAATCCAACGCTTTTTTTAATAAATATATATATCTAATTTGCATTTAAAAT AAATTAATAAATAAATTTAAAATGAATTTTCAAATATAAATAAATGGTCA ACAAGATGGCTTTTTTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTAAT T
JN383429 (Das <i>et al.</i> 2011)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	GTTATGGAGGGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTTAATTATG ATTACAGTATTTGTTTGGATGTTATTTAGAGTTACTCTTTTTGATGAA AAAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTGAAATTAT TTGGACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTCCATCTTTTGC ATTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTACTTTAAAAGTAAT AGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTTAGAATTTTCAG ATGAACCTTTAATTTTGGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGATTTAGCAATA GGTCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTCCAACATAATAG TCATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAGATGTATTACATTCATGGGCTATTC TTCATTAGGCATTAATTTAGATGCTTGTCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCTAT GTTTATTAAGAGAAGGTGTTTTTATGGACAATGTAGTGAAATTTGTGGAG TAAATCATGGATTTATGCCTATTGTAGTAGAAGCTGTATCATTAGAAGATTAT TTAATTTGGTTAAAAAATAAAATTAATTTTGATTTTAAATGCATAATAAATAAA AAATTTATGATATTTAAAATCATTGGTATAACTTTTTTAATATTATTATTT ACTGATATTAAGCAAATAATTAATAAAATTAACAATTTTTTAATAAATAA TAAAAAATCCAACGCTTTTTTTAATAAATATATATATCTAATTTTGCATTTA AAATAAATTAATAAATAAATTTAAAATGAATTTTCAAATATAAATAAATG GTCAACAAGATGGCTTTTTTC

JN383428 (Das <i>et al.</i> 2011)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	ATGGAGGGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTTTAATTATGATT ACAGTATTTGTTTGGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGATGAAAA AAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTGAAATTATTTG GACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTCCATCTTTTGCATT ATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTACTTTAAAAGTAATAG GTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTTAGAATTTTCAGAT GAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGATTTAGCAATAGG TCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTCCAACATAATAGTC ATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAGATGTATTACATTCATGGGCTATTCCTT CATTAGGCATTAATTTAGATGCTTGTCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTCTATGT TTATTAAGAGAAGGTGTTTTTATGGACAATGTAGTGAAATTTGTGGAGTA AATCATGGATTTATGCCTATTGTAGTAGAAGCTGTATCATTAGAAGATTATTT AATTTGGTTAAAAATAAAATTAATTTTGATTTAATGCATAATAATTAATA ATTTATGATATTTAAAATCATTGGTATAACTTTTTTAATATTATTATTACT GATATTAAGCAAATAATTAATAAAATTAACAATTTTTTAATAAATAAAATA AAAAATCCAACGCTTTTTTTAATAAATATATATATCTAATTTTGCATTTAAA ATAAATTAATAAATAATTTAATAAATGAATTTTCAAATATAAATAAATGGTC ACAAGATG
JF771534 (Martin and Radmer 2011)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	ATGGAGGGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTTTAATTATGATT ACAGTATTTGTTTGGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGATGAAAA AAAAATAAAATCCCATCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTGAAATTATTTG GACATCTATTCCAGCTTTAATTTTATTAACAGTTGCAGTTCCATCTTTTGCATT ATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTACTTTAAAAGTAATAG GTAGTCAATGGTATTGGAGTTACGAATATTCAGATAATTTAGAATTTTCAGAT GAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGATTTAGCAATAGG TCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTAGTTCCAACATAATAGTC ATATTAGAGTATTAATTACTGCATCAGATGTATTACATTCATGGGCTATTCCTT CATTAGGCATTAATTTAGATGCTTGTCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTCTATGT TTATTAAGAGAAGGTGTTTTTATGGACAATGTAGTGAAATTTGTGGAGTA AATCATGGATTTATGCCTATTGTAGTAGAAGCTGTATCATTAGAAGATTATTT AATTTGGTTAAAAATAAAATTAATTTTGATTTAATGCATAATAATTAATA ATTTATGATATTTAAAATCATTGGTATAACTTTTTTAATATTATTATTACT GATATTAAGCAAATAATTAATAAAATTAACAATTTTTTAATAAATAAAATA AAAAATCCAACGCTTTTTTTAATAAATATATATATCTAATTTTGCATTTAAA ATAAATTAATAAATAATTTAATAAATGAATTTTCAAATATAAATAAATG

<p>KC559768 (Scanu <i>et al.</i> 2014)</p>	<p><i>P. cinnamomi</i></p>	<p>Referencia</p>	<p>n/a</p>	<p>ATGGAAGGTATTATTAATTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTTTAATTACTATT  ACTGTTTTTGTGTGTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGATGAAGAA  AAAAATAAAATTCCAGCAACTGTTGTGCATGGAGCAACTATTGAAATTATTTG  GACTTCTATACCTGCTTTAATTTTATTAAGTGTGCTATACCATCATTTGCTTTA  TTATATTCAATGGATGAAGTTATTGATCCAATTATTACATTAAGTAATAGG  TAGTCAATGGTATTGGCGTTATGAATATTCAGATAATTTAGAATTTTCAGATG  AACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAGAAGATGATTTAGCTATTGGTC  AATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTGTAGTTGTTCCAATAATAGTCAT  ATTAGAGTTTTAATTACAGCATCAGATGTTTTACATTCATGGGCTATACCATCA  TTAGGTATTAATTAGATGCTTGTCTCGTCTTAAATCAAACCTTCAATGTTT  ATTAAGAGAAGGTGTTTTTATGGACAATG</p>
--	----------------------------	-------------------	------------	---

**Anexo 22:** Secuencias de la región ITS de los aislamientos en estudio y de referencia (GenBank) de *Phytophthora nicotianae* utilizadas en el análisis bioinformático

Aislamiento	Género/Especie	Procedencia	Hospedante	Secuencia
JC1	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	CTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAGTTGGGGGTCTTATTGGGCGGCGG CTGCTGGCTTAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAG GCGAACGTTTGGGCTTCCGCCTGATTTAGTAATCTTTTTTCTTTTAAACCCAT TCCTTAATACTGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATA GCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAAAACGCTGCGA ACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGAATCAGTGAGTCATCCAAATTTTGAA CGCATATTGCACTTCCGGGTAGTCCTGGAAGTATGCCTGTATCAATGTCCGT ACATTAACCTTGACTTTCTTCCTTCCCTGTAATCCGTGGAAGAAATGTCAAATG TGAAGTGTCTTGGCATTGGTCTTCGGACCGGCTGCCAATCCTTTTAAATGTA AACTGAACTTCTCTTTGCTCCAAAAGTGGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAGGCT GCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAAAA TGTTCCATTCTGGTATGGTTGGCTTCCGCTGAACAATGCATTTATTGGACGTT TTTCTGCTGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATAACTCGGTGGCTTGGCTTTT GAATTGGCTTTGCTGTTGCAAAGTAGGGTGGCAGCTTCCGTTGTCCAGGGTCCG ATCCATTTGGGAACCTAATGTGTAAGTTCGGTATGCATC
JC2	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	CCCGTGAACCGTTTCAACCCAATAGTTGGGGGTCTTATTGGGCGGCGGCTGCT GGCTTAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGA ACGTTTGGGCTTCCGCCTGATTTAGTAATCTTTTTTCTTTTAAACCCATTCTT AATACTGAATATACTGTGGGGACCAAGTCTCTGCTTTTAACTAAATAGCAAC TTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAAAACGCTGCGA GATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCCAAATTTTGAACGCAT ATTGCACTTCCGGGTAAATCCTGGAAGTATGCCTGTATCAATGTCCGTACATTA AACTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAATCCGTGGAAGAAATGTCAAAGTGA TGTCTTGGCATTGGTCTTCCGACCGGCTGCCAATCCTTTTAAATGTA GAACTTCTCTTTGCTCCAAAAGTGGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAGGCTGCTATT GTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAAAAATGTTCC ATTCCTGGTATGGTTGGCTTCCGCTGAACAATGCATTTATTGGACGTTTTTCT GCTGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATAACTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATT GGCTTTGCTGTTGCGAAGTAAGGTGGCAGCTTCCGTTGTGCGAGGGTCCATCCA TTGGGAACTTAATGTGTAAGTTCGGTATGCATCTCATTGG

JC3	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	CCCAATAGTTGGGGGTCTATTTGGCGGGCGGCTGCTGGCTTAATTGTTGGCGG CTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCCGCCT GATTTAATAATCCTTTTTTTCTTTTAAACCCATTCTTAATACTGAATATACCGT GGGGACCAAAGTCTCTGCTTTTAACTAAATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTC TAGGCTCGCACATCGATGAAAAACGCTGCCAACTGCGATACCTAATGCCAATT GCAAGAATCAGTGAGTCATCCAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCCGGTTA ATCCTGGAAATATGCCTGTATCAATGTCCGTACATTAAACTTGACTTTCTTCT TCCGTGTAATCCGTGGAAGAAAAGTCAAAAGTGAAATGTCTTGCCATTGGTCT TCCGACCGGCTGCCAATCCTTTTAAATGTACTAACTGAACCTCTCTTTGCTCC AAAAATGGTGGCCTTGCTGGTTGTGAAAGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCCAC CGTTTTGTCTGCTGCCGCGTTAATGGAAAAATGTTCCATTCTGGTATGGTTGG CTTCCGCTGAACAATGCACTTATTGGACCTTTTTCTGCTGTGGCGTGATGGAC TGGTGAACCATAACTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCAA GTAGGGTGGCAGCTTCGGTTGTGCGAGGGTCGATCCATTTGGGAACCTAATGTG TACTTCGGTATGCATCTCAA
JC4	<i>P. parasitica</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	AAGTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAACTTTT TCCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAGTTTGGGGGTCTTATTTTGGCGGG GCTGCTGGCTTAATTTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAA AGGCGAACGTTTGGGCTTCGGCCTGATTTAGTAGTCTTTTTTTCTTTTAAACCC ATTCCTTAATACTGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGA TAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAAAACGCTGC GAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTG AACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCC GTACATTAACCTTGACTTTCTTCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGAGATGTCAG ATGTGAAGTGTCTTGCATTGGTCTTCGGACCGGCTGCGAGTCTTTTAAATGT ACTAAACTGAACCTTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAG GCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAA AAATGTTTCGATTTCGTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGCACTTATTGGA CGTTTTCTGCTGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATAGCTCGGTGGCTTGG CTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAATAGGGTGGCAGCTTCGGTTGTGAG GGTCGATCCATTTGGGAACCTAATGTGTACTTCCGGTATGCATCTCAATTGGAC CTGATATCAGGC
JC5	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	CACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAGTTGGGGGTCTTA TTTGGCGGGCGGCTGCTGGCTTAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCCCTA TCAAAAAAAGGCAAACGTTTGGGCTCCGCCGAATTAATAATCCTTTTTT CCTTTAAACCATTCTTTAATACCGGAATATACCGGGGGGACCAAAGTCTCT

				GCTTTTAACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGA TGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAG TCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGC CTGTATCAGTGTCCGTACATTAACCTTGACTTTCTTCCCTTCCGTGTAGTCGGTG GAGGAGATGTCAGATGTGAAGTGTCTTGCATTGGTCTTCGGACCGGCTGCGA GTCCTTTTAAATGTACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTT GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGCTGC GGCGTTAATGGAAGAGTGTTTCGATTTCGTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAA TGCATTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATAG CTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGGGTGGCAGC TTCGGTTGTGAGGGTCGATCCATTTGGGAACCTAATGTGTACTTCGGTATGC ATCTCAA
JC6	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	CTTCCACCTGAACCGTTTCAACCAATAGTTGGGGGTCTTATTTGGCGGCGG CTGCTGGCTTAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAATGAGCCCTATCAAAAAAAAA GGCGAACGTTTGGGCTTCGGCCTGATTTAGTAGTCTTTTTTTCTTTTAAACCCA TTCCTTAATACTGAATATACGGTGGGGACAAAAGTCTCTGCTTTTAACTAAAT AGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATAAAAAACGCTGCG AACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGA ACGCAAAATGGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCG TACATTAACCTTGACTTTCTTCCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGAAATGTCAAAT GTGAAGTGTCTTGCATTGGTCTTCCGACCGGCGGCAAGTCCTTTTAAATGTA CTAAACTGAACTTCTCTTTGCTCAAAAAGTGGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAGG CTGCTATGGTGGCAAATTTGGCAACGGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAAA AGTGTTCAATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGCACTTATGGGAC GTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGAACTGGTGAACCATACTCGGTGGCTTGGCT TTGGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAAATAGGGTGGCAGCTTCGGTTGTCAAGGG TCGATCCATTTGGGAACCTAATGTGTACTTCGGTATGCATCTC
JC7	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	GGCGAACGTTTGGGCTTCGGCCTGATTTAGTAGTCTTTTTTTCTTTTAAACCCA TTCCTTAATACTGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGAT AGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCG AACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGA ACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCG TACATTAACCTTGACTTTCTTCCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGAGATGTCAGAT GTGAAGTGTCTTGCATTGGTCTTCCGACCGGCTGCGAGTCCTTTTAAATGTA CTAAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAGG CTGCTATTGTGGCAAATTTGGCGACTGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAAAG

				AGTGTTTCGATTTCGTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGCACTTATTGGAC GTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATAGCTCGGTGGCTTGGC TTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGGGTGGCAGCTTCGGTTGTCGAGG GTCGATCCATTTGGGAACCTAATGTGTACTTCGGTATGCATCTC
JC8	<i>P. nicotianae</i>	Lima (Huaral)	Mandarina Cleopatra	GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAATTTCCACGTGA ACCGTTTCAACCCAATAGTTGGGGTCTTATTTGGCGGCGGCTGCTGGCTTAA TTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGG GCTTCGGCCTGATTTAGTAGTCTTTTTTTCTTTTAAACCCATTCTTAATACTGA ATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCA GTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGT AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCAC TTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATTAACCTG ACTTTCTTCCCTCCGTGTAGTCGGTGGAGGAGATGTCAGATGTGAAGTGTCTT GCGATTGGTCTTCGGACCGGCTGCGAGTCTTTTAAATGTAATAACTGAACT TCTCTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGG CAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAAGAGTGTTCGATTC GTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGCACTTATTGGACGTTTTTCCTGCTG TGGCGTGATGGACTGGTGAACCATAGCTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGGCT TTGCTGTTGCGAAGTAGGGTGGCAGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCCATTTG GGAACCTAATGTGTACTTCGGTATGCATCTCAATTGGACCTGATATCAGGCAA GATTACCCGCTGA
MG208675 (Alsultan <i>et al.</i> 2017)	<i>P. parasitica</i>	Referencia	n/a	TACCACACCTAAAAAATTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAGTTGGGGG TCTTATTTGGCGGCGGCTGCTGGCTTAAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAG CCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCGGCCTGATTTAGTAGTCTTT TTTTCTTTTAAACCCATTCTTAATACTGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCTC TGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCG ATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGA GTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACCTTCGGGTTAGTCCTGGAAGTATG CCTGTATCAGTGTCCGTACATTAACCTGACTTTCTTCCCTCCGTGTAGTCGGT GGAGGAGATGTCAGATGTGAAGTGTCTTGGCATTGGTCTTCGGACCGGCTGCG AGTCCTTTTAAATGTAATAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGT TGCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGCTG CGGCATTAATGGAAGAGTGTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACA ATGCACCTATTGGACGTTTTCTGCTGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATA GCTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGGGTGGCAG

				CTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGAACTTAATGTGTACTTCGGTATGC ATCTCAATTGGACCTGATATCAGGCAAGATTACCCGCTG
GU258649 (Coffey <i>et al.</i> 2009)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	CCACACATAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCAATAGTTGGGGGTC TTATTTGGCGGGCTGCTGGCTTAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCC CTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCGGCTGATTTAGTAGTCTTTTT TTCTTTTAAACCCATTCCCTTAATACTGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTG CTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGAT GAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGT CATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCC TGTATCAGTGTCCGTACATTAACCTTGACTTTCTTCCCTCCGTGTAGTCGGTGG AGGAGATGTCAGATGTGAAGTGTCTTGCATTGGTCTTCGGACCGGCTGCGAG TCCTTTTAAATGTACTAACTGAACCTTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTTG CTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGCTGCG GCGTTAATGGAAGAGTGTTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAT GCACTTATTGGACGTTTTTCCCTGCTGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATAGC TCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGGGTGGCAGCTT CGGTTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGAACTTAATGTGTACTTCGGTATGCAT CTCAA
KJ494902 (Zheng and Feng 2014)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAACTTTCCACG TGAACCGTTTCAACCAATAGTTGGGGGCTTATTTGGCGGGCGGCTGCTGGCT TAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTT TGGGCTTCGGCCTGATTTAGTAGTCTTTTTTTCTTTTAAACCCATTCCCTAATAC TGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCA GCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATA CGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTG CACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATTAAC TTGACTTTCTTCCCTCCGTGTAGTCGGTGGAGGAGATGTCAGATGTGAAGTGT CTTGCATTGGTCTTCGGACCGGCTGCGAGTCTTTTAAATGTACTAAACTGA ACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGT GGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGCTGCGCGTTAATGGAAGAGTGTTCGAT TCGTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGCACTTATTGGACGTTTTTCCCTGC TGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATAGCTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGG CTTTGCTGTTGCGAAGTAGGGTGGCAGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCCATT TGGGAACTTAATGTGTACTTCGGTATGCATCTCAATTGGACCTGATATCAGGC AAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

GU993910 (Ristaino and Hu 2010)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	CCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAGTTGGGGGTC TTATTTGGCGGCGGCTGCTGGCTTAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCC CTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCGGCCTGATTTAGTAGTCTTTT TTTCTTTTAAACCCATTTCCTTAATACTGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCT GCTTTTAACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGA TGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAG TCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGC CTGTATCAGTGTCCGTACATTAACCTTGACTTTCTTCTTCCGTGTAGTCGGTG GAGGAGATGTCAGATGTGAAGTGTCTTGCATTGGTCTTCGGACCGGCTGCGA GTCCTTTTAAATGTACTAACTGAACCTTCTTTTCTCGAAAAGTGGTGGCGTT GCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGCTGC GGCRTTAATGGAAGAGTGTTTCGATTTCGTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAA TGCACTTATTGGACGTTTTTCTGCTGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATAG CTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGGGTGGCAGC TTCGGTTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGAACCTAATGTGTACTTCGGTATGC ATCTCAA
AF467087 (Appiah <i>et al.</i> 2002)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	AAGGATCACTACCACACCCAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAAT AGTTGGGGGTCTTATTTGGCGGCGGCTGCTGGCTTAATTGTTGGCGGCTGCTG CTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCGGCCTGATTT AGTAGTCTTTTTTTCTTTTAAACCCATTTCCTTAATACTGAATATACTGTGGGA CGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGC TCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAG GATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCC TGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATTAACCTTGACTTTCTTCTTCCG TGTAGTCGGTGGAGGAGATGTCAGATGTGAAGTGTCTTGCATTGGTCTTCGG ACCGGCTGCGAGTCTTTTAAATGTACTAACTGAACCTTCTTTTCTCGAAA AGTGGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGG TTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAAGAGTGTTTCGATTTCGTGGTATGGTTGGCTT CGGCTGAACAATGCACCTTATTGGACGTTTTTCTGCTGTGGCGTGATGGACTG GTGAACCATAGCTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGT AGGGTGGCAGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGAACCTAATGTGTA CTTCGGTATGCATCTCAATTGGACCTGATATCAGGCAAGATTACCCGCTGAAC TTAA
GU259311 (Coffey <i>et al.</i> 2009)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	CCACCCTAAAAAACTTTCCCGTGGACCGTTTCAACCCATAGTTGGGGGTCTTATT TGGCCGCGGCTGCTGGCTTAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCCCTAT CAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCGGCCTGATTTAGTAGTCTTTTTTTTCT

				TTTTAAACCCATTTCCTTAATACTGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTT TAACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAA GAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTTCAGTGAGTCATC GAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCCTGTA TCAGTGTCCGTACATTAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGA GATGTCAGATGTGAAGTGTCTTGCGATTGGTCTTCGGACCGGCTGCGAGTCCT TTTTAAATGTAATAACTGAACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTTGCTG GTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGCTGCGGCG TTAATGGAAGAGTGTTCGATTTCGTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGCA CTTATTGGACGTTTTTCTGCTGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATAGCTCG GTGGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGGGTGGCAGCTTCG GTTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGAACTTAATGTGTACTTCGGTATGCATCTC AA
KJ494903 (Zheng and Feng 2014)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAACTTTCCACG TGAACCGTTTCAACCAATAGTTGGGGGTCTTATTTGGCGGCGGCTGCTGGCT TAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTT TGGGCTTCGGCCTGATTTAGTAGTCTTTTTTTCTTTTAAACCCATTTCCTAATAC TGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCA GCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATA CGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAAATTTGAACGCATATTG CACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATTAAC TTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGAGATGTCAGATGTGAAGTGT CTTGCGATTGGTCTTCGGATCGGCTGCGAGTCCTTTTAAATGTAATAACTGA ACTTCTCTTTGCTCGAAAAGTGGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGT GGCAAATTGGCGACTGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAAGAGTGTTCGAT TCGTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGCACTTATTGGACGTTTTTCTGCT TGTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATAGCTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGG CTTGCTGTTGCGAAGTAGGGTGGCAGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCCATT TGGAACTTAATGTGTACTTCGGTATGCATCTCAATTGGACCTGATATCAGGC AAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
JF792526 (Das <i>et al.</i> 2011)	<i>P. nicotianae</i>	Referencia	n/a	ATCATTACCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCAATAGTT GGGGGTCTTATTTGGCGGCGGCTGCTGGCTTAAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGA GTGAGCCCTATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCGGCTGATTTAGTAG TCTTTTTTTCTTTTAAACCCATTTCCTAATACTGAATATACTGTGGGGACGAAA GTCTCTGCTTTTAACTAAATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCA CATCGATGAAAAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTC

				AGTGAGTCATCCAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAATCCTGGAA GTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATTAACCTTGACTTTCTTCCTTCCGTGTAA TCGGTGGAGGAAATGTCAGATGTGAAATGTCTTGCGATTGGTCTTCCGACCGG CTGCCAATCCTTTTAAATGTACTAACTGAACTTCTCTTTGCTCCAAAAGTGGT GGCGTTGCTGGTTGTGAAAGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCGCCTGGTTTGTG TGCTGCGGCGTTAATGGAAGAGTGTTCGATTTCGTGGTATGGTTGGCTTCGGCT GAACAATGCACCTATTGGACGTTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGACTGGTGAA CCATAGCTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGGGT GGCAGCTTCGGTTGTGCGAGGGTCGATCCATTTGGGAACCTAATGTGTACTTCG GTATGCATCTCAATTGGAC
EF055303 (Chavarriaga <i>et al.</i> 2007)	<i>P. cinnamomi</i>	Referencia	n/a	CCCATGTGAACCTGCGGAAGGATCTTACCCACCTAAAAAATTTCCCGTGAA CCGTATCAACCAATTAGTTGGGGGCCTGCTCTGGGCGGCGGCTGTCGATGTC AAAGTCGACGGCTGCTGCTGCGTGGCGGGCCCTATCACTGGCGAGCGTTTGGG TCCCTCTCGGGGAACTGAGCTAGTAGCCTCTCTTTAAACCCATTCTGTAATA CTGAACATACTGTGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTC AGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAAGTGGAT ACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATT GCACTTCCGGGTTAGTCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAA CTTGGCTCTCTTCCCTCCGTGTAGTCGGTGGATGGAGGTGCCANACGTGAAGT GTCTTGCGGGCGGTCTTCGGACTGGCTGTGAGTCCCTTGAAATGTACTGAACT GTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCTGT ATGGCCAGTCGGCGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGGAGGAGTGTTT GATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTTCTTC CTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCTTGGCGTTT AACCGGCGGTGTTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCTGTGCGAGGGTCG ATCCATTTGGGAACCTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTGTGCTTGTGGTGGCAT CTCAATTGGACCTGATATCAGGCAAGATTACCCGC