



Por un Desarrollo  
Agrario Integral y  
Sostenible

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**  
**Departamento de Protección Agrícola y Forestal**

**MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL**

Caracterización del agente causal de la pudrición radicular del aguacate y *Trichoderma* sp., como potencial agente de control biológico en Nicaragua.

**AUTOR**

Lic. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez

**Asesor**

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

Managua, Nicaragua

Junio, 2016

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**  
**Departamento de Protección Agrícola y Forestal**

**MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL**

Caracterización del agente causal de la pudrición radicular del aguacate y *Trichoderma sp* como potencial agente de control biológico en Nicaragua.

AUTOR

Lic. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez

Asesor

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

Tesis sometida a la consideración del Honorable Tribunal Examinador como requisito parcial para optar al grado de:

*Maestro en Ciencias*

Managua, Nicaragua

Junio, 2016

## Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito parcial para optar al título profesional de:

---

### Miembros del Tribunal Examinador

---

Dr.  
Presidente

---

Dr.  
Secretario

---

MSc.  
Vocal

Lugar y Fecha: \_\_\_\_\_

## INDICE DE CONTENIDO

SECCION .....	PAGINA
.....	1
<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>6</b>
2.1.    Objetivo general .....	6
2.2.    Objetivos específicos .....	6
<b>III. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>7</b>
3.1.    Ubicación del estudio.....	7
3.2.    Caracterización morfológica del agente causal de la pudrición radicular del aguacate.	7
3.2.1.    Recolección de muestras en campo.....	7
3.2.2.    Aislamiento de microorganismos fitopatógenos .....	8
3.2.3.    Aislamiento de <i>Phytophthora cinnamomi</i> a partir de muestras de suelo.....	9
3.2.4.    Análisis morfológico de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	10
3.2.5.    Determinación de tipo de compatibilidad .....	10
3.3.    Caracterización molecular del agente causal de la pudrición radicular del aguacate ..	11
3.3.1.    Extracción de ADN.....	11
3.3.2.    Identificación molecular del género <i>Phytophthora</i> .....	12
3.3.3.    Caracterización molecular de la especie de <i>Phytophthora</i> .....	12
3.4.    Selección de potenciales agentes de control biológico mediante pruebas “ <i>in vitro</i> ”..	13
3.4.1.    Ensayo de crecimiento radial de cepas del hongo antagonista <i>Trichoderma</i> .....	13
3.4.2.    Ensayo de crecimiento radial de <i>P. cinnamomi</i> u otras especies de <i>Phytophthora</i> .	14
3.4.3.    Pruebas de antagonismo “ <i>in vitro</i> ” .....	14
3.4.4.    Evaluación del grado de antagonismo de las cepas de <i>Trichoderma</i> .....	15
3.5.    Variables evaluadas.....	16
3.6.    Análisis de los datos.....	17
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
4.1.    Identificación del agente causal de la enfermedad .....	19
4.2.    Aislamiento de <i>P. cinnamomi</i> a partir de muestras de suelo .....	19
4.3.    Análisis morfológico de <i>P. cinnamomi</i> .....	20

4.4.	Determinación del tipo de compatibilidad de <i>P. cinnamomi</i> .....	23
4.5.	Caracterización molecular del agente causal de la pudrición radicular del aguacate ( <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands) .....	26
4.5.1.	Identificación molecular del género <i>Phytophthora</i> .....	26
4.5.2.	Identificación molecular de la especie de <i>Phytophthora</i> .....	26
4.6.	Selección de potenciales agentes de control biológico mediante pruebas “ <i>in vitro</i> ” ..	30
4.6.1.	Ensayo de crecimiento radial de cepas del hongo antagonista <i>Trichoderma</i> .....	30
4.6.2.	Ensayo de crecimiento radial del patógeno <i>P. cinnamomi</i> .....	32
4.6.3.	Pruebas de antagonismo “ <i>in vitro</i> ” .....	34
4.6.4.	Evaluación del grado de antagonismo de las cepas de <i>Trichoderma</i> .....	38
V.	CONCLUSIONES .....	43
VI.	RECOMENDACIONES .....	44
VII.	LITERATURA CONSULTADA .....	45
VIII.	ANEXOS .....	55

## **DEDICATORIA**

Dedico a Jehová por darme la fuerza, la vida, satisfacción y por haberme permitido realizar este trabajo.

### A mis hijos

Cristopher Antonio Sánchez Alguera y Alexander de Jesús Sánchez por darme mucha felicidad con sus vidas. Y por los momentos de alegría que me dan cada día. Son lo más importante de mi vida, gracias a ellos he conseguido descubrir una nueva forma de amar.

### A mis padres

Isabel Auxiliadora Gómez González y Julio Cesar Sánchez Caballeros por el amor y apoyo incondicional que me han brindado durante mi vida.

### A mi asesor

Jorge Ulises Blandón Díaz por su apoyo, paciencia, tiempo y conocimiento que me ha brindado durante el transcurso de este trabajo.

*Isaías Sánchez Gómez*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Jehová por darme la fuerza, la vida, salud y conocimiento para culminar este trabajo.

A mi asesor Jorge Ulises Blandón Díaz por su apoyo, tiempo y conocimiento que me ha brindado durante el transcurso de este trabajo.

A MSc. Guillermo Castillo por su apoyo y tiempo que brindo en la realización del trabajo.

Al programa IICA –PRIICA por el apoyo brindado en la adquisición de materiales y reactivos utilizados en el presente estudio.

Al programa de maestría en Sanidad vegetal de la Universidad Nacional Agraria y equipo de docentes que forman parte de la maestría.

*Isaías Sánchez Gómez*

## INDICE DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
1. Escala de cinco clases utilizada para medir el grado de antagonismo (control biológico) ejercido por los aislados de <i>Trichoderma</i> sobre el patógeno <i>P. cinnamomi</i> .	16
2. Características morfométricas expresadas en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de estructuras sexuales (oogonios y oosporas), asexuales (esporangios) y tipo de apareamiento en diferentes aislados de <i>P. cinnamomi</i> .	22
3. Interacciones del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) del micelio de <i>Phytophthora</i> en enfrentamientos duales con cepas del antagonista <i>Trichoderma</i> .	35

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Esquema en el cual se muestra la ubicación de los aislados para determinar el tipo de apareamiento o compatibilidad de los aislados de <i>Phytophthora cinnamomi</i> de Nicaragua. El A1 y el A2 representan los aislados de referencia y la letra "X" identifica al aislado del cual se desconocía su tipo de compatibilidad	11
2. Representación gráfica del método utilizado para medir el ritmo de crecimiento de las cepas del hongo antagonista <i>Trichoderma</i> y de los aislados del patógeno <i>P. cinnamomi</i> .	14
3. Figura 3. Estructuras morfológicas de <i>P. cinnamomi</i> procedentes de las zonas de muestreo. Hifas coraloides o torulosas, sin septos (A-1) y clamidosporas (A-2); oogonio (B-1) y esporangio (B-2); oospora (C).	21
4. Estructuras morfológicas de <i>P. citrophthora</i> . En A y B se señalan con flechas los esporngios y en C las flechas señalan al oogonio.	21
5. Tipos de compatibilidad A1 y A2 del patógeno <i>P. cinnamomi</i> encontrados en los sitios donde se recolectaron las muestras de suelo.	25
6. Productos PCR obtenidos con los primer A2/I2 de diez aislados del género <i>Phytophthora</i> (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10), un control positivo (C+) y un control negativo (C-). Con la letra M se indica el marcador molecular de 100 pb. El origen y código de los aislados de <i>Phytophthora</i> están detallados en el texto de esta sección.	27
7. Patrones de bandas obtenidos de los aislados de <i>Phytophthora</i> después de la digestión del producto PCR con la enzima de digestión MspI. La letra M indica el marcador molecular de 100 pb, C+ es el control positivo de <i>P. cinnamomi</i> y C- es el control negativo. En el panel A, los números del 1 al 7 corresponden a los aislados identificados como <i>P. cinnamomi</i> . En el panel B, el número 8 representa al aislado que se idenitificó como <i>P. citrophthora</i> (sus tamaños de fragmentos se indican con la línea curvada), los números 9 y 10 corresponden a dos aislados de <i>P. cinnamomi</i> .	28
8. Crecimiento radial de las cepas de <i>Trichoderma</i> (BGP01, MLL08, NG y UNA) seleccionadas para enfrentamientos duales con el patógeno causante de la pudrición radicular del aguacate.	31
9. Crecimiento radial (en mm) de los diferentes aislados de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (BGP04, BGP07, BGP09, MLC04 y MLL05) y <i>P. citrophthora</i> (MLL02) después de un período de incubación de 96 horas.	32

10. Crecimiento radial de los aislados de *P. cinnamomi* (BGP04, BGP07, BGP09, MLC04 y MLL05) y *P. citrophthora* (MLL02) en dependencia del tiempo de incubación. 33
11. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los diferentes aislados de *Phytophthora cinnamomi* (BGP04, BGP07, BGP09, MLC04, y MLL05) y *P. citrophthora* (MLL02) obtenido en enfrentamientos duales con cepas del antagonista *Trichoderma*. 36
12. Inhibición del crecimiento radial (expresado en porcentaje) ejercido por cepas del hongo antagonista *Trichoderma* sobre aislados de los patógenos *P. cinnamomi* y *P. citrophthora*. 37
13. Antagonismo por competencia demostrado por cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora*. En el panel A, se muestra el borde de avance (1) de la cepa NG de *Trichoderma* y el borde de avance del aislado MLL02 de *P. citrophthora* (2). En el panel B se puede observar que la cepa NG de *Trichoderma* creció completamente sobre la colonia del aislado MLL05 de *P. cinnamomi*. 39
14. Grado de antagonismo demostrado por las cepas del hongo antagonista *Trichoderma* sobre aislados de *P. cinnamomi* (BGP04, BGP07, BGP09, MLC04 y MLL05) y *P. citrophthora* (MLL02) de acuerdo a la escala de clases de Bell et al., (1982). Antagonismo por competencia demostrado por cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora*. 40

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO	PAGINA
1. Ciclo biológico de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .	55
2. Mapas donde se muestran los sitios seleccionados para la toma de muestra.	56
3. Tamaño de los amplicones y bandas (pb) derivados de la información de las secuencias de ADN producidos cuando usan primer para genes específicos de diferentes especies de <i>Phytophthora</i> después de la digestión de los fragmentos.	57
4. Crecimiento radial (en mm) de diferentes aislados de <i>P. cinnamomi</i> y <i>P. citrophthora</i> a través del período de incubación en que fueron mantenidos.	58
5. Análisis de varianza multivariado con medias repetidas para el crecimiento radial de las cepas de antagonistas de <i>Trichoderma</i> (SAS versión 9.1).	59
6. Análisis de varianza con medias repetidas para el crecimiento radial del patógeno <i>Phytophthora cinnamomi</i> . (SAS versión 9.1).	60
7. Análisis de la varianza y prueba de separación de medias de Tukey del crecimiento radial de los aislados de <i>Phytophthora</i> .	61
8. Análisis de la varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) utilizando Tukey para la separación de medias.	62

## RESUMEN

En el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill.) se presentan problemas fitosanitarios importantes dentro de los cuales sobresalen por su relevancia las enfermedades de la raíz. Un fitopatógeno limitante de este cultivo es el oomicete *Phytophthora cinnamomi* Rands, que puede causar pérdidas hasta del 90%. Por tal razón el principal objetivo del estudio fue generar información acerca de la etiología del agente causal de la pudrición radicular del aguacate utilizando marcadores morfológicos y moleculares, además de proponer alternativas de manejo de carácter biológico que estén enmarcadas dentro de un programa de manejo integrado de la enfermedad. Se realizaron colectas de muestras de suelo en cuatro localidades del departamento de Masaya. La identificación morfológica del patógeno se realizó mediante claves taxonómicas y se confirmó a través de la técnica PCR-RFLP. Se identificó a *P. cinnamomi* como el principal agente causal de la pudrición radicular del aguacate. Los aislados de *P. cinnamomi* fueron enfrentados con *Trichoderma* sp por el método de cultivo dual en cajas Petri con medio PDA. Se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) a las 72 horas, así como el grado de antagonismo de cada una de las cepas de *Trichoderma* sp utilizadas en el estudio. Las cepas de *Trichoderma* al enfrentarlas a aislados del patógeno *P. cinnamomi* se ubicaron en las Clases 1 y 2 de la escala de evaluación, por lo tanto se consideraron altamente antagonistas. Existe la posibilidad de manejo biológico de las poblaciones de *P. cinnamomi* con microorganismos antagonistas del género *Trichoderma* no solamente en agroecosistemas de aguacate, sino también en otros sistemas agrícolas y forestales donde el patógeno esté presente.

Palabras claves: *Phytophthora cinnamomi*, aguacate, antagonismo, biología poblacional

## ABSTRACT

In avocado plantations, important phytosanitary problems occurred, among which root diseases stand out for their relevance. A limiting plant pathogen of this crop is the oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands, which can cause losses of up to 90%. For this reason, the main objective of the study was to generate information about the etiology of the causative agent of root rot of avocado using morphological and molecular markers, and proposing alternative management strategies of biological nature that are framed within an integrated disease management. Soil samples collections in four locations in the department of Masaya were conducted. Morphological identification of the pathogen was performed using taxonomic keys and confirmed through PCR-RFLP. The oomycete *P. cinnamomi* was identified as the major causative agent of avocado root rot. *Phytophthora cinnamomi* isolates were confronted with *Trichoderma* strains by means of the dual culture method in Petri dishes with PDA medium. The percentage of radial growth inhibition (PRGI) at 72 hours and the degree of antagonism of each of the *Trichoderma* strains used in the study was determined. *Trichoderma* strains showed highly antagonistic performance when confronted with the pathogen isolates, since they were located in the Classes 1 and 2 on the assessment scale. There is a potential opportunity for biological management of *P. cinnamomi* populations with antagonistic microorganisms of the genus *Trichoderma* not only in avocado agroecosystems, but also in other agricultural and forestry systems where the pathogen is present

Keywords: *Phytophthora cinnamomi*, avocado, antagonism, population biology

## I. INTRODUCCION

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una fruta tropical que tiene un alto potencial económico, gracias a su aceptado consumo en fresco y las cualidades que tiene para su procesamiento agroindustrial y que actualmente se cultiva en más de 60 países tropicales y subtropicales (Mohamed y van der Berg, 2011; Ramírez-Gil et al., 2014b). Los cinco países más productores de aguacate alrededor del mundo son en este orden México, Indonesia, Estados Unidos de América, Colombia y República Dominicana (FAOSTAT, 2013).

El nombre aguacate, se deriva del término “ahuacatl”, el cual es un vocablo de origen náhuatl, que literalmente significa testículo en lengua Maya. Desde su centro de origen y domesticación hace ya unos 10 mil años, el cultivo de aguacate se expandió hacia Centro y Sur América y hacia a otros lugares fuera del continente americano. Esta fruta fue llevada a Europa por los españoles en el siglo XVI, junto con otros alimentos nuevos tales como la papa, el maíz, algunas frutas tropicales y el chocolate. En la actualidad, el aguacate es una de las frutas tropicales más populares en el mundo entero por su alto valor nutritivo, sabor agradable, versatilidad y fácil preparación (Alfonso-Bartoli, 2008).

Las variedades modernas de aguacate (*Persea americana* Mill) se han originado a partir de hibridaciones de diferentes materiales trasladados desde sus centros de origen. Existen tres razas o subespecies: mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*), guatemalteca (*Persea nubigena* var. *guatemalensis*) y antillana (*Persea americana* var. *americana*). Estas razas se diferencian en la altura de planta, en la forma y tamaño del fruto, color de follaje y adaptación a diferentes condiciones climáticas y de suelo (Schaffer et al., 2013)

Algunas características distintivas entre las razas que se toman en cuenta son la época de floración, el momento de recolección, el periodo de floración-recolección, el peso y tipo de corteza de la fruta, el contenido de aceite de la pulpa y la resistencia al frío, tanto en las plantas jóvenes como en las adultas. Otras características que se consideran distintivas son el olor que caracteriza a las hojas, ya sea el olor intenso a anís o la ausencia de olor a anís, la forma del pedúnculo y el tipo de grupo floral (A y B) (Alfonso-Bartoli, 2008).

Las variedades de aguacate del grupo floral A abren sus flores por la mañana y se comportan como femeninas, ya que solo reciben polen de otras plantas, se cierran al mediodía y se vuelven abrir hasta por la tarde del día siguiente, comportándose de esta manera, como masculinas, porque no están en condiciones de recibir polen; únicamente lo liberan para otras plantas. Algunos ejemplos de variedades de este grupo floral son Lula, Waldin y Hass (INTA, 2003).

Las variedades del grupo floral B se comportan de forma contraria a las del grupo A, ya que abren sus flores por la tarde comportándose, como masculinas (solo liberan polen), se cierran al medio día y abren nuevamente sus flores hasta por la tarde del día siguiente, comportándose entonces como femeninas, pues solo reciben polen para ser fecundadas. Algunos ejemplos de variedades de este grupo son Fuerte, Booth-7, Booth-8 y Pollock (INTA, 2003).

El aguacate posee valiosas propiedades alimenticias y medicinales por su alto contenido de aceite (7-25%) y proteínas (3-4 %). Además contiene de hidratos de carbono, vitaminas y minerales. Esas características la convierten en una de las frutas más nutritivas, por lo que se está desarrollando su industrialización para la producción de alimentos, extracción de aceites y en la medicina está siendo utilizado para la obtención de productos farmacológicos (Alfonso-Bartoli, 2008). En cuanto a características morfológicas y organolépticas, el mercado internacional prefiere frutos de tamaño mediano (150-300 g) y con un aceptable porcentaje de aceite (>12 %) (Rodríguez, 1982).

Hace aproximadamente tres décadas, en Nicaragua se sembraron pequeñas áreas de aguacate que oscilaban entre 1 y 3 hectáreas, las cuales estaban caracterizadas por una alta dispersión en el territorio nacional y no se usaba ninguna tecnología que ayudara a mejorar el sistema productivo. Las principales zonas productoras de aguacate en Nicaragua están localizadas en los departamentos de Madriz (Somoto), Carazo, Boaco, Estelí, Chinandega, Rivas, Matagalpa (Waslala) y Río San Juan (Solentiname) (INTA, 2003).

En Nicaragua, el aguacate de la raza antillana y algunos híbridos se adaptan mejor a tierras bajas y a precipitación pluvial moderada que son condiciones como las que se presentan en los departamentos de Chinandega, León y Rivas (Belén, Tola). Las variedades e híbridos de la raza guatemalteca se han adaptado mejor a las zonas de mediana elevación como por ejemplo en Carazo, Masaya y La Concepción. Para zonas altas de Jinotega, el Tuma, San Rafael del Norte y las sierras altas de Camoapa se recomiendan las variedades e híbridos de la raza mexicana (INTA, 2003).

En el cultivo de aguacate se presentan problemas fitosanitarios importantes entre los que sobresalen por su relevancia las enfermedades de la raíz. Las raíces y el sistema vascular de los árboles de aguacate son afectados por diferentes tipos de fitopatógenos, que causan síntomas similares lo que hace difícil su diagnóstico preciso y la aplicación de prácticas adecuadas de manejo. Un fitopatógeno limitante de este cultivo es el oomicete *Phytophthora cinnamomi* Rands, que puede causar pérdidas hasta del 90% (Pérez, 2008; Tamayo, 2007; Ciro *et al.*, 2006; Coffey, 1991; Zentmyer, 1984).

Otros fitopatógenos que causan afectaciones de raíces y tallo en aguacate son *Phytophthora heveae*, *Phytophthora citricola*, *Verticillium* sp., *Armillaria mellea*, *Cylindrocladium* sp., *Rosellinia* sp., *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Rhizoctonia* sp., *Phymatotrichum omnivorum*, *Cylindrocladiella* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Pythium* sp., y los nematodos *Helicotylenchus* sp., *Rotylenchulus* sp., y *Pratylenchus* sp. (Vitale *et al.*, 2012; Bonilla *et al.*, 2011; Pérez, 2008; Tamayo, 2007; Besoain y Piontelli, 1999; Zentmyer, 1984). No hay reportes de bacterias fitopatógenas que afecten al cultivo de aguacate hasta el momento.

En particular, el oomicete *Phytophthora cinnamomi* es un patógeno presente en el suelo que causa pudrición de raíces de varios cultivos hortícolas, ornamentales y forestales; además, causa canchales en tallos y troncos así como pudrición de frutos (Zentmyer, 1980). La pudrición radicular causada por *Phytophthora cinnamomi* es la más destructiva y la más importante enfermedad del aguacate en todo el mundo. La enfermedad fue descrita en 1922 por Rands en árboles de canela, y detectada en árboles de aguacate por primera vez en Estados Unidos, por Tucker en 1929. El oomicete presenta un rango de hospedantes

sumamente amplio, ya que es capaz de afectar a más de 1000 especies de plantas, lo que se considera como un peligro potencial no sólo para el cultivo de aguacate sino para múltiples cultivos y especies forestales de importancia económica (Zentmyer, 1980; Mahomed y van der Berg, 2011; Gallo Siverio et al., 2007; Vidales-Fernández y Alcantar-Rocillo, 1999).

Las hojas de los árboles de aguacate atacados por *P. cinnamomi* son más pequeñas que las normales, adquieren un color verde pálido en contraste con el verde oscuro que tienen las hojas sanas y tienden a caer prematuramente. Cuando la enfermedad alcanza una fase avanzada, las ramas se mueren de la punta a la base, causando el síntoma conocido como muerte regresiva. El patógeno causa pudrición de raíces finas absorbentes y raíces fibrosas lo que lleva a la muerte regresiva del hospedante, pero también causa cánceres en los tallos (Hardham, 2005).

El patógeno *P. cinnamomi* pertenece al Dominio Eucarya (Woese, 1990), al Reino Chromista (Stramenopile), Filo Oomycota, Orden Peronosporales, Familia Peronosporaceae, Género *Phytophthora* y especie *cinnamomi* (Hardham, 2005). Este oomicete está ubicado en el Clado 7 del sistema de clasificación e identificación de las especies de *Phytophthora* (Kroon et al., 2012). Se reproduce asexualmente mediante esporangios (que dan origen a zoosporas) y clamidosporas, además se reproduce sexualmente a través de oosporas, las cuales se originan cuando están presentes los dos tipos de apareamiento, el A1 y el A2. Por consiguiente, *P. cinnamomi* es una especie heterotálica (Erwin y Ribeiro, 1996; Gerrettson, 1989; Hardham, 2005) (Anexo 1).

Para el manejo de este patógeno se han implementado una serie de tácticas entre las cuales están la solarización (López-Herrera et al., 1999), el uso de fungicidas (metalaxil y fosetil-aluminio) (Guest y Grant, 1991) y uso de fosfitos (Hardy et al., 2001). Sin embargo, debido a la amplia utilización del fosetil-aluminio por los productores, han surgido preocupaciones sobre la posibilidad de desarrollo de resistencia en *P. cinnamomi* (McDonald et al., 2007). Estas preocupaciones se justifican ya que se ha observado tolerancia a los fosfonatos en *P. capsici* y *P. cinnamomi* en pruebas realizadas in vitro (McDonald, et al 2007; Mahomed y van den Berg, 2011).

El uso de portainjertos tolerantes tales como Thomas y Duke-7 también han sido evaluados para el manejo de *P. cinnamomi* en aguacate (Andrade-Hoyos et al., 2015). En los últimos años se ha incrementado el interés del uso de microorganismos antagonistas para el control del agente causal de la pudrición radicular del aguacate. En este sentido, ya se han realizado varios estudios para determinar el grado de antagonismo que ejercen las especies de *Trichoderma* y otros microorganismos sobre *P. cinnamomi* (Aryantha y Guest, 2006; Costa et al., 2000; López-Herrera et al., 1999; McLeod et al., 1995; Ramírez Gil et al., 2014a).

Para el desarrollo de estrategias de manejo eficaces para enfermedades causadas por *P. cinnamomi* y otras especies de *Phytophthora* se requiere de una mejor comprensión de la diversidad fenotípica y genotípica de las poblaciones del patógeno, incluyendo el conocimiento de la variación morfológica, distribución de los tipos de apareamiento, la sensibilidad a los fungicidas, y las variaciones fisiológicas y moleculares (Duan et al., 2008).

En Nicaragua, en algunas localidades del departamento de Masaya se ha detectado la presencia de una enfermedad similar a la pudrición radicular del aguacate afectando plantaciones de este cultivo. Por lo tanto, con esta investigación se ha pretendido generar información acerca del agente causal de la pudrición radicular del aguacate y su posible manejo a través del uso de agentes de control biológico, tales como el hongo antagonistas del género *Trichoderma* debido a que no hay estudios relacionados con la enfermedad en el país.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Generar información acerca del agente causal de la pudrición radicular del aguacate utilizando marcadores morfológicos y moleculares y sobre agentes potenciales de control biológico que estén enmarcadas dentro de un programa de manejo integrado de la enfermedad.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar al agente causal de la pudrición radicular del aguacate mediante marcadores morfológicos usando claves taxonómicas y medios selectivos.
- Identificar mediante la técnica molecular PCR-RFLP el género y especie del agente involucrado en la pudrición radicular del aguacate.
- Determinar mediante pruebas de antagonismo “*in vitro*” la capacidad inhibitoria que tienen cepas del hongo antagonista *Trichoderma* sp., sobre el crecimiento del agente causal de la pudrición radicular del aguacate

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Ubicación del estudio**

El estudio se realizó en el Laboratorios de Microbiología de la Universidad Nacional Agraria, ubicada en el km 12 ½ carretera norte Managua, en las coordenadas 12° 08´ de latitud Norte y 86° 09´ longitud Oeste.

El tipo de estudio fue descriptivo de corte transversal, con el objetivo de generar información acerca del agente causal de la pudrición radicular del aguacate utilizando marcadores morfológicos y moleculares y sobre *Trichoderma* sp como agente potencial de control biológico de la enfermedad. El tipo de muestreo fue no probabilístico tomando como criterio de selección plantas con síntomas de enfermedad y sin síntomas de la misma, así como la disponibilidad y acceso a las fincas de los productores.

#### **3.2. Caracterización morfológica del agente causal de la pudrición radicular del aguacate**

Para la caracterización morfológica del agente causal de la pudrición radicular se realizaron colectas de muestras en zonas con antecedentes de la enfermedad, posteriormente se procedió a aislar al microorganismo e identificarlo mediante claves taxonómicas y el programa interactivo Lucid Key versión 3.4, a continuación se describen cada uno de los procedimientos.

##### **3.2.1. Recolección de muestras en campo**

La colecta de las muestras se realizaron en los municipios de Masatepe, La Concepción, comarca Quebrada Honda y los Altos de Nindirí del departamento de Masaya, el cual se encuentra ubicado entre las coordenadas 11°58' Latitud Norte y 86°05' Longitud Oeste, con una altitud de 234 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Anexo 2).

Se recolectaron 31 muestras compuestas por raíz y suelo, este último con un peso aproximado de 1 kilogramo de árboles con síntomas de la enfermedad y sin síntomas de la misma.

Simultáneamente se tomaron muestras de corteza de árboles que presentaban cánceres con exudación gomosa. Posteriormente se llevaron al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Agraria en Managua para su posterior análisis.

### **3.2.2. Aislamiento de microorganismos fitopatógenos**

En una fase preliminar del estudio se procedió al aislamiento de microorganismos presumiblemente involucrados en la inducción de la sintomatología relacionada a la pudrición radicular del aguacate. Estos microorganismos fueron aislados a partir de las muestras de suelo, raíces y corteza.

Con las muestras de suelo se realizaron diluciones en serie para detectar la posible presencia de hongos, oomicetes o bacterias fitopatógenas. Para el caso de hongos se utilizaron las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  y el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Para oomicetes se utilizaron las mismas diluciones, con la diferencia que se utilizó un medio selectivo denominado PARH, el cual contiene agar harina de maíz suplementado con los antibióticos pimaricina ( $0.01 \text{ g.L}^{-1}$ ), ampicilina ( $0.250 \text{ g.L}^{-1}$ ), rifampicina ( $0.01 \text{ g.L}^{-1}$ ) y himexazol ( $0.05 \text{ g.L}^{-1}$ ). Para el aislamiento de bacterias se utilizaron las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  y se utilizó el medio de cultivo agar nutriente (Agrios, 2007; Almaraz-Sánchez, 2013).

Las muestras de raíces fueron lavadas con agua, se secaron a temperatura ambiente y se hicieron cortes de aproximadamente de 5 mm de largo. Estos cortes se desinfectaron superficialmente con etanol (70%), seguido de un lavado con agua destilada estéril e hipoclorito de sodio (3%) por 30 segundos, posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril con un intervalo de 30 segundos. Los cortes de raíces desinfectadas se sembraron en medios de cultivo antes mencionados para cada uno de los organismos de interés que se quería aislar. De las muestras de corteza se hicieron cortes de aproximadamente 5 mm, se desinfectaron y se colocaron en los mismos medios utilizados para las muestras de suelo y raíces.

De este aislamiento preliminar, se encontró que la morfología y las estructuras reproductivas encontradas con mucho mayor frecuencia en los medios de cultivo y en observaciones

microscópicas correspondían a las de un oomicete y muy particularmente a *Phytophthora cinnamomi* por lo que se procedió a estandarizar la metodología para el aislamiento de este fitopatógeno.

### **3.2.3. Aislamiento de *Phytophthora cinnamomi* a partir de muestras de suelo**

Para el aislamiento de *Phytophthora cinnamomi* de muestras de suelo se siguió el procedimiento de trapeo empleado por Almaraz-Sánchez et al., (2013) con algunas modificaciones. La modificación consistió en sustituir las plantas ornamentales camelia (*Camelia japonica*) y azalea (*Rhodendron indicum*) utilizadas en el estudio de Almaraz-Sánchez et al (2013) por hojas de clavel (*Dianthus caryophyllus*). Se utilizaron recipientes plásticos de 400 ml en los que se depositó y homogenizó la mezcla de 100 gramos de suelo y 300 ml de agua (relación 1:3) con ayuda de una espátula. Para el cebado se utilizaron hojas de clavel que fueron previamente secadas en hornos y desinfectadas al someterlas a tratamiento con luz ultravioleta antes de ser utilizadas. En cada recipiente se colocaron 30 trocitos de hoja de clavel (5 mm de diámetro aproximadamente) y se incubaron a 22°C por 72 horas. Transcurrido este tiempo los trocitos de clavel fueron transferidos a medio V8 agar-PARB (piramicina-ampicilina-rifampicina-benomil). Se colocaron los platos Petri en oscuridad y a temperatura ambiente para promover el crecimiento del patógeno (Mansilla, 1993). Las colonias puras del patógeno fueron mantenidas en papa dextrosa agar (PDA).

Cuando se presentó contaminación con bacterias se utilizó uno de los métodos sugeridos por Kaminskyj (2005), al que se le denomina método por superposición el cual consistió en realizar el siguiente procedimiento. Se colocó en un plato Petri vacío un trozo de medio con micelio contaminado y sobre el trozo se colocó un triángulo de medio PDA con antibióticos (piramicina-ampicilina-rifampicina-benomil-himexazol, es decir, medio PARBH). El micelio creció al interior del triángulo de medio PARBH y emergió en la superficie de éste libre de bacterias. Se utilizó el medio PARBH ya que se quería limpiar un cultivo de *Phytophthora* y en este caso el medio PARBH contiene himexazol, el cual inhibe el crecimiento de las especies de *Pythium*.

#### **3.2.4. Análisis morfológico de *Phytophthora cinnamomi***

En este análisis se incluyeron características tales como morfología de la colonia en medio de cultivo, tipo de micelio (cenocítico o septado), tipo de hifas (coraloides o no coraloides), forma y tamaño del oogonio, tipo de anteridio (anfígeno o parágino), forma y tamaño de las oosporas y de los esporangios, tipo de esporangio (caduco o no caduco, papilado, semi-papilado o sin papila), presencia o ausencia de clamidosporas y su ubicación (terminal, intercalada, lateral, o en grupos). Este análisis morfológico se apoyó en las publicaciones de Gallegly y Hong (2008), Erwin y Ribeiro (1996), Waterhouse (1970) y el programa computarizado para especies comunes de *Phytophthora* Lucid Key versión 3.4 (Ristaino, 2012).

#### **3.2.5. Determinación de tipo de compatibilidad**

El oomicete *P. cinnamomi* es una especie heterotálica es decir tienen que estar presente los dos tipos de compatibilidad, el A1 y el A2, para que se pueda producir la reproducción sexual. El tipo de compatibilidad se determinó usando aislados de referencia (A1 y A2), los cuales fueron generosamente donados por Dr. Jean Beagle Ristaino de la Universidad Estatal de Carolina del Norte, Estados Unidos. Cada uno de los aislados de *P. cinnamomi* que se obtuvieron de las muestras de suelo fueron cruzados con los aislados de referencia A1 y A2 y entre ellos para identificar cual es el tipo de compatibilidad que está presente en Nicaragua. Se cortaron con un sacabocados trozos de micelio de 5 mm de diámetro de los aislados hasta ese momento desconocidos y de los aislados de referencia (A1 y A2) y se colocaron en puntos diametralmente opuestos en platos Petri que contenían agar V8 clarificado (Figura1). Después de una semana de incubación en la oscuridad cada uno de los platos fueron observados al microscopio para saber si se habían formado o no las oosporas que son las estructuras reproductivas sexuales (Pagliaccia et al., 2013).



Figura 1. Esquema en el cual se muestra la ubicación de los aislados para determinar el tipo de apareamiento o compatibilidad de los aislados de *Phytophthora cinnamomi* de Nicaragua. El A1 y el A2 representan los aislados de referencia y la letra “X” identifica al aislado del cual se desconocía su tipo de compatibilidad.

### 3.3. Caracterización molecular del agente causal de la pudrición radicular del aguacate

La caracterización molecular consistió en realizar procedimientos de extracción, realización de PCR y PCR- FRLP, a continuación se detalla cada procedimiento realizado.

#### 3.3.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método CTAB descrito por Doyle & Doyle (1990) el cual consiste en calentar el buffer de extracción CTAB por 30 minutos a 65°C. Se colocó 100 mg de micelio fresco en un tubo Eppendorf de 1.5ml, se adicionaron 500 µL de CTAB (buffer), se maceró el micelio y se incubó a 65°C por 30 minutos. Posterior a la incubación, se adicionaron 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml, se agregó nuevamente cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml, se adicionaron 350 µL de isopropanol, se incubó por 15 minutos a -20°C, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. Al pellet resultante se le adicionaron 100 µL de etanol mezclando por inversión, se centrifugó a 14,000 rpm por 4 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, el pellet fue resuspendido en 100 µL de agua calidad molecular o Tris-EDTA (TE) buffer, se adicionó 1µL de la ribonucleasa ARN-asa y se incubó por 20 minutos a 37°C. El ADN extraído se mantuvo a una temperatura de -20°C hasta su uso.

### **3.3.2. Identificación molecular del género *Phytophthora***

La identificación de *Phytophthora* a nivel de género se realizó mediante la técnica de PCR convencional con reacciones de 25  $\mu\text{L}$  de volumen final, la que consistió en mezclar 2  $\mu\text{L}$  de la muestra a estudiar, 12.5  $\mu\text{L}$  de Master Mix (PROMEGA), 7.5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 2  $\mu\text{L}$  del par de iniciadores I2 reverso (GATATCAGGTCCAATTGAGATGC) y A2 delantero (ACTTTCCACGTGAACCGTTTCAA) respectivamente, que producen diferentes amplicones (Drenth et al., 2006). El desarrollo de la PCR se realizó en un termociclador Eppendorf bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 45 ciclos a 95°C por 45 s, 57°C por 1 minuto, 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Para visualizar los fragmentos se colocaron 8  $\mu\text{L}$  del producto PCR con 2  $\mu\text{L}$  del colorante de carga 6x en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El gel se colocó en una cámara de electroforesis con buffer TBE al 1X. La electroforesis se llevó a cabo por espacio de una hora a 80 voltios y luego se procedió a visualizar en el transluminador registrándose los resultados fotográficamente.

### **3.3.3. Caracterización molecular de la especie de *Phytophthora***

La identificación molecular de la especie de *Phytophthora* involucrada en la pudrición radicular del aguacate se realizó mediante la técnica PCR-RFLP usando el producto de la amplificación de la PCR con los iniciadores reverso I2 y delantero A2. El producto de la PCR se sometió a digestión con la enzima MspI en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . El procedimiento consistió en adicionar 5  $\mu\text{L}$  de producto amplificado PCR, 2  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción y 3  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (PROMEGA). Posteriormente se incubó a 37°C por una hora. Después de la incubación se procedió a realizar la separación de los fragmentos en un gel de agarosa al 1% en solución de Tris-Borato-EDTA (TBE) buffer 1X (Drenth et al, 2006).

### **3.4. Selección de potenciales agentes de control biológico mediante pruebas “*in vitro*”.**

Para la selección de potenciales agentes de control biológico se realizaron ensayos de crecimiento radial de *Trichoderma* sp, de los patógenos *P. cinnamomi* y *P. citrophthora*; además del crecimiento dual patógeno-antagonista en plato Petri.

#### **3.4.1. Ensayo de crecimiento radial de cepas del hongo antagonista *Trichoderma***

El ritmo de crecimiento del antagonista se determinó sobre una placa Petri conteniendo medio PDA, dibujando en la parte inferior de la placa una cruz y señalando el centro con un marcador de tinta indeleble. Se identificó cada placa con un número y se marcaron cuatro radios con una letra (Figura 2). Se inoculó el centro del medio con el hongo ya crecido bajo las mismas condiciones de estudio, se incubó hasta que se observó un avance del hongo y se marcó el punto de avance sobre los cuatro radios dibujados en la placa y a partir de este momento se inició el estudio de crecimiento. A intervalos de 12 horas se marcó y se midió el crecimiento hasta las 60 horas, para un total de cinco intervalos de mediciones de crecimiento radial. Los valores de incremento permitieron describir una curva de crecimiento. El ritmo promedio de crecimiento se calculó dividiendo el incremento total por el tiempo. Cada radio representó una observación y se realizaron 24 observaciones por cepa de *Trichoderma* en estudio (French y Herbert, 1982). Las cepas que presentaron un ritmo de crecimiento más acelerado, es decir, llenado del plato Petri en un tiempo más corto, fueron seleccionadas para las pruebas de antagonismo “*in vitro*” con el patógeno *P. cinnamomi*. Se aislaron 6 cepas nativas del hongo antagonista *Trichoderma* de los sitios donde se realizó el muestreo de suelo y se probó su velocidad de crecimiento y esporulación a fin de seleccionar las mejores cepas de acuerdo a estos criterios. El crecimiento de las seis cepas nativas se comparó con dos cepas de *Trichoderma* que ya habían sido aisladas y probadas en otros estudios (Cepa NG de Nueva Guinea y la cepa UNA).

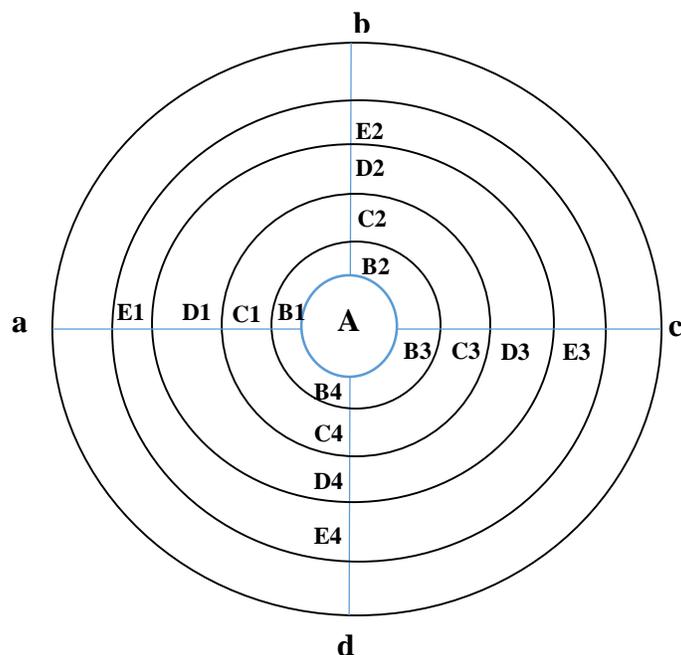


Figura 2. Representación gráfica del método utilizado para medir el ritmo de crecimiento de las cepas del hongo antagonista *Trichoderma* y de los aislados del patógeno *P. cinnamomi*.

### 3.4.2. Ensayo de crecimiento radial de *P. cinnamomi* u otras especies de *Phytophthora*

Para determinar el crecimiento radial de los patógenos se siguió el mismo procedimiento empleado para la selección de los antagonistas y que ya fue descrito en la sección anterior (Figura 2). El registro de crecimiento se hizo a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inoculación del medio PDA con un trozo agar de 5 mm de diámetro que contenía micelio del patógeno (Hüberli, 1995). Los aislados del patógeno que mostraron un crecimiento más acelerado fueron seleccionados para las pruebas de antagonismo “*in vitro*”. De esta manera se seleccionaron seis aislados del patógeno que provenían de los mismos lugares donde se recolectaron las muestras de suelo.

### 3.4.3. Pruebas de antagonismo “*in vitro*”

En las pruebas de antagonismo “*in vitro*” se utilizaron 4 aislados seleccionados del hongo antagonista *Trichoderma* y seis aislados del patógeno *P. cinnamomi*. Para determinar la capacidad inhibidora y de colonización de los diferentes aislados de *Trichoderma* sp se

realizaron las pruebas de antagonismo en cajas de Petri con medio PDA. Se utilizó un diseño completo al azar (DCA) en arreglo factorial  $6 \times 4$  (seis aislados del patógeno y cuatro aislados del antagonista). La unidad experimental estuvo representada por un plato Petri. El procedimiento experimental consistió en colocar dos discos de agar de seis milímetros de diámetro en cada extremo de cada plato Petri, un disco obtenido del cultivo de *Trichoderma* sp y el otro procedente de colonias del patógeno. Los platos Petri se incubaron a 25°C. Para evaluar su capacidad invasora se midió el diámetro de la zona de inhibición de las colonias de cada uno de los aislados a las 24, 48, 72 y 96 horas (Matroudi et al., 2009; Fernández-Larrea Vega, 2001). La reducción del crecimiento radial del patógeno en presencia del antagonista en relación al crecimiento del patógeno en el plato control (testigo) se calculó mediante la fórmula usada por Matroudi et al (2009):

$$PICR (\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

PICR = Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio del patógeno

C= Crecimiento radial del patógeno en el plato control

T= Crecimiento radial del patógeno en presencia de *Trichoderma* sp.

#### **3.4.4. Evaluación del grado de antagonismo de las cepas de *Trichoderma***

A partir del cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento radial del antagonista frente al patógeno se empleó la escala de Bell et al (1982) para evaluar la capacidad de control de *Trichoderma* sp (Cuadro 1).

Cuadro 1. Escala de cinco clases utilizada para medir el grado de antagonismo (control biológico) ejercido por los aislados de *Trichoderma* sobre el patógeno *P. cinnamomi*

Clases	Descripción
1	El antagonista crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre toda la superficie del medio de cultivo.
2	El antagonista cubre al menos las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
3	El antagonista y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.
4	El patógeno cubre al menos dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento del antagonista.
5	El patógeno crece sobre la colonia del antagonista y cubre toda la superficie del medio de cultivo.

Un aislado de *Trichoderma* se consideró que era altamente antagonista si el valor promedio de una comparación determinada era  $\leq 2$  y no era considerado altamente antagonista si el valor promedio era  $\geq 3$  (Bell et al., 1982).

### 3.5. Variables evaluadas

- a) Número de especies de *Phytophthora* encontradas en las fincas
- b) Crecimiento radial (CRA) del antagonista *Trichoderma*
- c) Crecimiento radial del patógeno (CRP) en el plato control
- d) Porcentaje del inhibición del crecimiento radial (PICR) del patógeno
- e) Grado de antagonismo (GA) de *Trichoderma* sp

### 3.6. Análisis de los datos

En la identificación del agente causal de la enfermedad también se llevó a cabo un análisis descriptivo de su morfología y de sus estructuras reproductivas tales como micelio, clamidosporas y esporangios. En los esporangios se midió el largo y ancho de 50 esporangios por cada aislado de *P. cinnamomi* y se determinó la proporción largo:ancho. Se determinó el diámetro (en micras) de los oogonios y las oosporas.

Para determinar el número de especies de *Phytophthora* encontradas solamente se hizo un recuento numérico simple de las especies predominantes. Las variables crecimiento radial del antagonista (CRA) y del patógeno (CRP) fueron sometidas a un análisis de varianza con medidas repetidas. Las hipótesis estadísticas a probar en este caso fueron: i) no hay efecto de tiempo sobre el crecimiento radial; ii) no hay efecto de aislado sobre el crecimiento radial; iii) no hay efecto de interacción tiempo  $\times$  aislado. Los estadísticos de prueba fueron: lambda ( $\lambda$ ) de Wilks, el trazo de Pillai, el trazo de Hotelling-Lawley y la raíz mayor de Roy. Para probar las hipótesis e interpretación de los resultados del análisis se eligió el estadístico lambda ( $\lambda$ ) de Wilks, ya que es el más utilizado y su interpretación es idéntica para los otros tres estadísticos (Balzarini et al., 2008).

Los datos del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) del micelio del patógeno en presencia del antagonista fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANDEVA) como un diseño completamente al azar (DCA) con estructura factorial  $6 \times 4$  (6 aislados del patógeno  $\times$  4 aislados del antagonista), para lo cual se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk} \text{ con } i = 4; j = 6; k = 6$$

Donde,  $Y_{ijk}$  representa la respuesta de la  $k$ -ésima repetición en el  $i$ -ésimo nivel del Factor A (aislado de *Trichoderma*) y  $j$ -ésimo nivel del Factor B (aislado de *P. cinnamomi*),  $\mu$  representa la media general,  $\alpha_i$  el efecto que produce el  $i$ -ésimo nivel del Factor A,  $\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo nivel del Factor B,  $\delta_{ij}$  es el efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles  $i$  del Factor A y  $j$  del Factor B y  $\varepsilon_{ijk}$  representa el error aleatorio

asociado a la observación  $ijk$ -ésima. Las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Diferencia Honestamente Significativa (HSD) de Tukey (Quinn y Keough, 2009).

Antes de realizar el ANDEVA los datos fueron examinados para determinar si se cumplían los supuestos para que el ANDEVA fuera válido. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado y la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene (Quinn y Keough, 2009).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Identificación del agente causal de la enfermedad

En las 31 muestras recolectadas de los diferentes lugares donde se hizo el muestreo de suelo se encontró la presencia del patógeno *P. cinnamomi* y un único aislado de *P. citrophthora*. Además se encontraron en menor cantidad bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, las cuales no han sido reportadas como patógenos en el cultivo de aguacate. La omnipresencia de *P. cinnamomi* en todas las muestras y la presencia de *P. citrophthora* en una única muestra hizo que el estudio se dirigiera hacia el aislamiento y purificación de estos oomicetes para analizarlos morfológicamente y usando técnicas moleculares y confirmar su etiología. Es importante mencionar, que *P. cinnamomi* y *P. citrophthora* se aislaron de suelo donde estaban plantados árboles de aguacate que presentaban síntomas de muerte regresiva y pudrición radicular. En estudios similares, *P. cinnamomi* ha sido aislada con mucho mayor frecuencia del suelo en plantaciones de aguacate y plantaciones forestales de encino (*Quercus* sp) que presentaban la sintomatología antes descrita (Alvarado-Rosales et al., 2007; Ramírez Gil et al., 2014b; Rodríguez-Molina et al., 2003).

### 4.2. Aislamiento de *P. cinnamomi* a partir de muestras de suelo

La utilización del método de trapeo con hojas clavel resultó ser muy efectivo, ya que se pudo detectar el crecimiento de esporangios sobre los tozos de clavel que luego fueron transferidos a un medio selectivo de agar V8-PARB y PDA para observar el crecimiento típico de las colonias de *P. cinnamomi*. El método de trapeo ha sido eficaz para el aislamiento de *P. cinnamomi* de muestras de suelo extraídas de diferentes hospedantes como aguacate, plantas ornamentales y árboles forestales como el encino. Para el trapeo se han utilizado diversos materiales de origen vegetal tales como hojas de camelia (*Camelia japonica*), azalea (*Rhodendron indicum*), hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) frutos de aguacate, de pera, de manzana, de chile dulce (*Capsicum annuum*), pétalos inmaduros de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y otros (Almaraz-Sánchez et al., 2013; Alvarado-Rosales et al., 2007; Alvarado-Rosales et al., 2008; Eggers et al., 2012; Ochoa-Fuentes et al., 2007;

Ramírez-Gil et al., 2014b; Rodríguez-Molina et al., 2003; Sepúlveda-Chavera et al., 2013). En el presente estudio como se mencionó con anterioridad se utilizó hojas de clavel para llevar a cabo la detección de los esporangios de *P. cinnamomi* y su posterior aislamiento en medios selectivos de agar.

Para los experimentos posteriores se seleccionaron nueve aislados de *P. cinnamomi* y el único aislado de *P. citrophthora* para un total de diez aislados de *Phytophthora*. Estos diez aislados fueron usados en el análisis morfológico y molecular; en el ensayo para determinar el tipo de compatibilidad solamente se usaron los nueve aislados de *P. cinnamomi*, mientras que en las pruebas de selección de potenciales agentes de control biológico se utilizaron cinco aislados de *P. cinnamomi* y el único aislado de *P. citrophthora*, ya que fueron los que presentaron un ritmo de crecimiento más acelerado y tuvieron el mayor crecimiento radial.

#### **4.3. Análisis morfológico de *P. cinnamomi***

El micelio de los nueve aislados de *P. cinnamomi* presentó una forma arositada en el medio de cultivo PDA y una coloración blanca-grisácea con abundante producción de hifas, las cuales no presentaban septos (cenocíticas). Las hifas eran coraloides o torulosas y presentaban un gran número de hinchamientos globosos o de formas irregulares. Se pudo observar también una producción abundante de clamidosporas agrupadas en racimos que es una característica morfológica muy distintiva y particular de esta especie del género *Phytophthora*. Las clamidosporas estaban dispuestas en forma terminal o intercalada y tenían forma globosa. Los esporangios presentaban forma ovalada o elipsoide, con pedicelo largo, no caducos y no presentaban papila. Los oogonios eran de pared lisa, hialinos, amarillentos o de color marrón amarillento. Los anteridios eran anfígenos, esféricos u oblongos y unicelulares. Las oosporas eran hialinas o de color marrón amarillento, pleróticas (la oospora llenó la cavidad del oogonio) (Figura 3). Se midió el tamaño de las oosporas y de los esporangios. En el caso de los esporangios se midió el largo y ancho y se determinó la proporción largo:ancho del esporangio. En las oosporas se midió el diámetro (Cuadro 2).

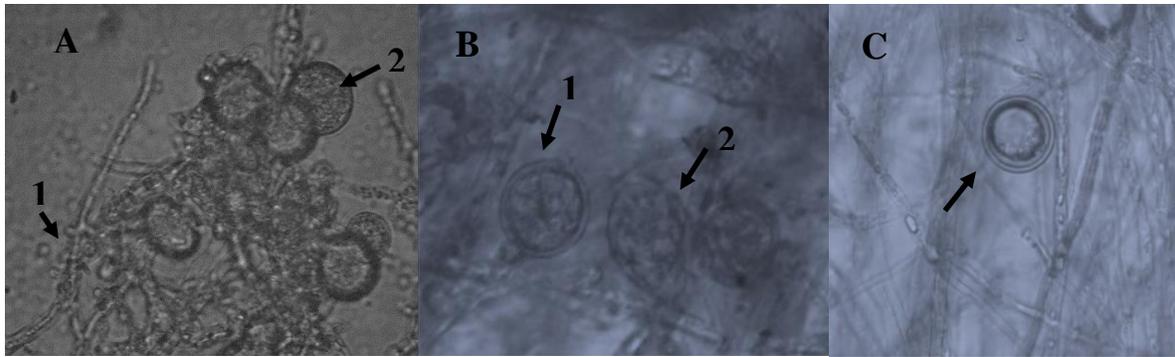


Figura 3. Estructuras morfológicas de *P. cinnamomi* procedentes de las zonas de muestreo. Hifas coraloides o torulosas, sin septos (A-1) y clamidosporas (A-2); oogonio (B-1) y esporangio (B-2); oospora (C).

El aislado de *P. citrophthora* presentó una forma arossetada en el medio de cultivo PDA de coloración blanca grisácea con abundante producción de hifas no septadas. Las hifas eran coraloides o torulosas y sin hinchamientos globosos o de formas irregulares. Los esporangios presentaban forma ovalada o periforme, papilados, con pedicelo corto, no caducos. Los oogonios eran de pared lisa, sin ornamentaciones, hialinos, amarillentos o de color marrón amarillento. La ausencia de ornamentaciones en la superficie de los oogonios facilitó la diferenciación de *P. citrophthora* de *P. katsurae*. Se midieron los esporangios de la misma forma que con *P. cinnamomi* (Figura 4; Cuadro 2).

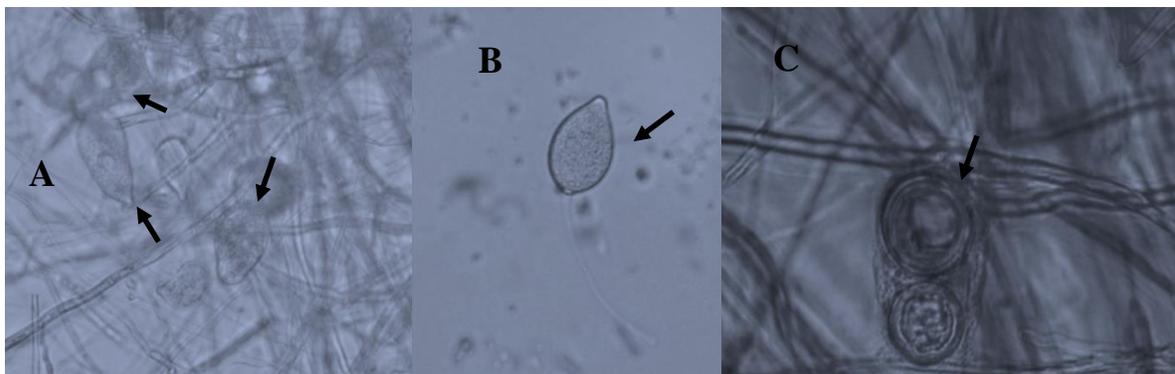


Figura 4. Estructuras morfológicas de *P. citrophthora*. En A y B se señalan con flechas los esporangios y en C las flechas señalan al oogonio.

Cuadro 2. Características morfométricas expresadas en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de estructuras sexuales (oogonios y oosporas), asexuales (esporangios) y tipo de apareamiento en diferentes aislados de *P. cinnamomi*.

Aislado <sup>1</sup>	Medidas de esporangios ( $\mu\text{m}$ )			Medidas en $\mu\text{m}$ de:		Tipo de apareamiento
	Largo (L)	Ancho (A)	L $\times$ A	Oogonios	Oosporas	
BGP04	65	36	1.80	38	34	A2
CA24	60	35	1.85	39	35	A1
CA26	70	37	1.89	38	35	A2
MLC03	70	35	2.0	40	35	A1
BGP09	60	35	1.85	39	35	A2
BGP07	70	35	2.0	39	35	A1
MLL05	60	35	1.85	40	35	A2
MLL02	60	30	2.0	38	ND <sup>2</sup>	ND <sup>2</sup>
MLC04	65	35	1.86	39	35	A2
ALT21	70	35	2.0	40	36	A1

<sup>1</sup>Los aislados fueron codificados de acuerdo al lugar de donde se extrajeron las muestras de suelo: BGP04, BGP07 y BGP09 (Banco de germoplasma de Campos Azules, Masatepe); CA24 y CA26 (Campos Azules, Masatepe); MLC03 y MLC04 (Municipio La Concepción); MLL02 y MLL05 (Comarca Mirazul del Llano); ALT21 (Comarca Altos de Nindirí).

<sup>2</sup>ND = En este aislado no se determinó el tipo de compatibilidad porque pertenecía a la especie *Phytophthora citrophthora* y por lo tanto no se realizó el apareamiento con los aislados de referencia A1 y A2 de *P. cinnamomi*.

En las dos especies, *P. cinnamomi* y *P. citrophthora*, se observó una morfología arositada de la colonia, lo cual es consistente con varios estudios que se han realizado en otros lugares (Almaraz-Sánchez et al., 2013; Alvarado-Rosales et al., 2008; Ramírez-Gil et al., 2014b; Sepúlveda-Chavera et al., 2013). Sin embargo, hay investigaciones que reportan además del crecimiento tipo arositado de la colonia, otra forma de la colonia de *P. cinnamomi* que tiene aspecto estrellada en medio PDA (Eggers et al., 2012; Ho y Zentmyer, 1977). Algunos autores señalan que en el medio agar V8 *P. cinnamomi* forma un micelio medianamente denso que crece uniformemente desde el punto de partida, llena completamente el plato Petri y no muestra ningún patrón característico (arositado o estrellado) como si lo hace en el medio PDA (Erwin and Ribeiro 1996; Hardham 2005). Por lo tanto, al parecer el medio de cultivo donde crece *P. cinnamomi* influye en la morfología de la colonia. Otro factor que ha sido señalado como responsable en la variación de la morfología de la colonia es la temperatura.

Con respecto a las medidas de los esporangios (largo, ancho y la proporción largo:ancho) y el diámetro de las estructuras sexuales, oogonios y oosporas, estas concuerdan con las que se reportan en varias investigaciones previas (Almaraz-Sánchez et al., 2013; Duan et al., 2008; Eggers et al., 2012; Erwin and Ribeiro 1996; Gallegly y Hong 2008; Gerrettson, 1989; Ristaino, 2012). A través del análisis de varios trabajos de investigación, Zentmyer (1980) determinó que las dimensiones promedio de los esporangios de *P. cinnamomi* estaban en el rango de 43.6-75.0  $\mu\text{m}$  de largo y 25.9-47.0  $\mu\text{m}$  de ancho, y la proporción largo:ancho de los esporangios estaba en el rango de 1.4-1.9  $\mu\text{m}$ . Estos promedios están en concordancia con las dimensiones que se reportan en el presente estudio y solamente hay una leve variación en la proporción largo:ancho de los esporangios en cuatro aislados (MLC03, BGP07, MLL02 y ALT21), los cuales presentan un valor de 2.0 (Cuadro 2).

#### **4.4. Determinación del tipo de compatibilidad de *P. cinnamomi***

De los nueve aislados de *P. cinnamomi* utilizados, cuatro resultaron ser del tipo de compatibilidad A1 y cinco aislados del tipo de compatibilidad A2 al someterlas a prueba de apareamiento con cepas de referencia (Cuadro 2; Figura 5). Como resultado del apareamiento se pudo observar en la zona de contacto de los dos micelios la presencia de oosporas hialinas o de color marrón amarillento, además de llenar la cavidad del oogonio (oospora plerótica). Aunque en este estudio se utilizaron pocos aislados de *P. cinnamomi* para determinar su tipo de compatibilidad, los resultados indican que los dos tipos de apareamiento se presentan en una proporción de casi 1:1 en las localidades donde se recolectaron las muestras de suelo.

Este hallazgo puede sugerir que las poblaciones de *P. cinnamomi* se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y son altamente diversas debido a la reproducción sexual que podría estar ocurriendo no solamente en las plantaciones de aguacate, sino también en todas las plantas anuales, ornamentales y plantaciones forestales que son hospedantes de este oomicete. Otro aspecto importante a considerar es que si el patógeno se reproduce sexualmente bajo las condiciones de Nicaragua, por consiguiente puede sobrevivir como oosporas, lo cual puede traer serias consecuencias epidemiológicas para todas aquellas plantas (anuales y perennes) que son afectadas por el patógeno y repercusiones económicas para los productores y el país en general.

A nivel mundial se reporta que el tipo de compatibilidad A2 es el que está más ampliamente distribuido y tiene cientos de hospedantes, mientras que el tipo de compatibilidad A1 tiene una distribución más estrecha y su rango de hospedantes es menor (Duan et al., 2008; Linde et al., 1997; Linde et al., 1999; Pagliaccia et al., 2013; Zentmyer, 1976; Zentmyer, 1980; Zentmyer, 1988). Sin embargo, en el presente estudio se encontró que no hay predominancia de ninguno de los tipos de apareamiento, ya que la relación fue de casi 1:1 y por lo tanto podrían estar ocurriendo eventos de recombinación genética en las poblaciones de *P. cinnamomi* de Nicaragua. Sin embargo, estos resultados necesitan ser confirmados a través de estudios posteriores donde se involucre un mayor número de sitios de muestreo y un mayor número de aislados de *P. cinnamomi* obtenidos no solamente de aguacate sino también de otros hospedantes.

En América Latina hay pocos estudios relacionados al patosistema aguacate-*P. cinnamomi* a pesar de que ya desde los años 50's se había reportado la presencia de *P. cinnamomi* en países como México y Costa Rica (Zentmyer, 1951). En un estudio reciente, Besoain et al (2005), reportan la presencia de los dos tipos de compatibilidad, el A1 y el A2, bajo condiciones de laboratorio, en muestras de suelo obtenidas de plantaciones de aguacate en Chile. Sin embargo, estos mismos autores no aportan evidencia de si está ocurriendo reproducción sexual del patógeno o si hay sobrevivencia mediante oosporas bajo condiciones naturales en el campo.

En Nicaragua, este es el primer reporte de la existencia de los dos tipos de apareamiento (A1 y A2) en un oomicete heterotálico como lo es *P. cinnamomi*. En estudios realizados con anterioridad sobre la estructura poblacional en Nicaragua de otro oomicete heterotálico muy importante como lo es *Phytophthora infestans*, solamente se encontró el tipo de apareamiento A2, el cual corresponde a un nuevo genotipo de linaje clonal (NI-1) muy agresivo para los cultivos de papa y tomate (Blandón-Díaz et al., 2012). Se requiere de más investigación para corroborar si *P. cinnamomi* se reproduce sexualmente bajo condiciones naturales en el campo o si las poblaciones de este patógeno están representadas por uno o unos pocos linajes

clonales cómo ha sido reportado de otras partes del mundo (Duan et al., 2008; Dobrowolski et al., 2003).

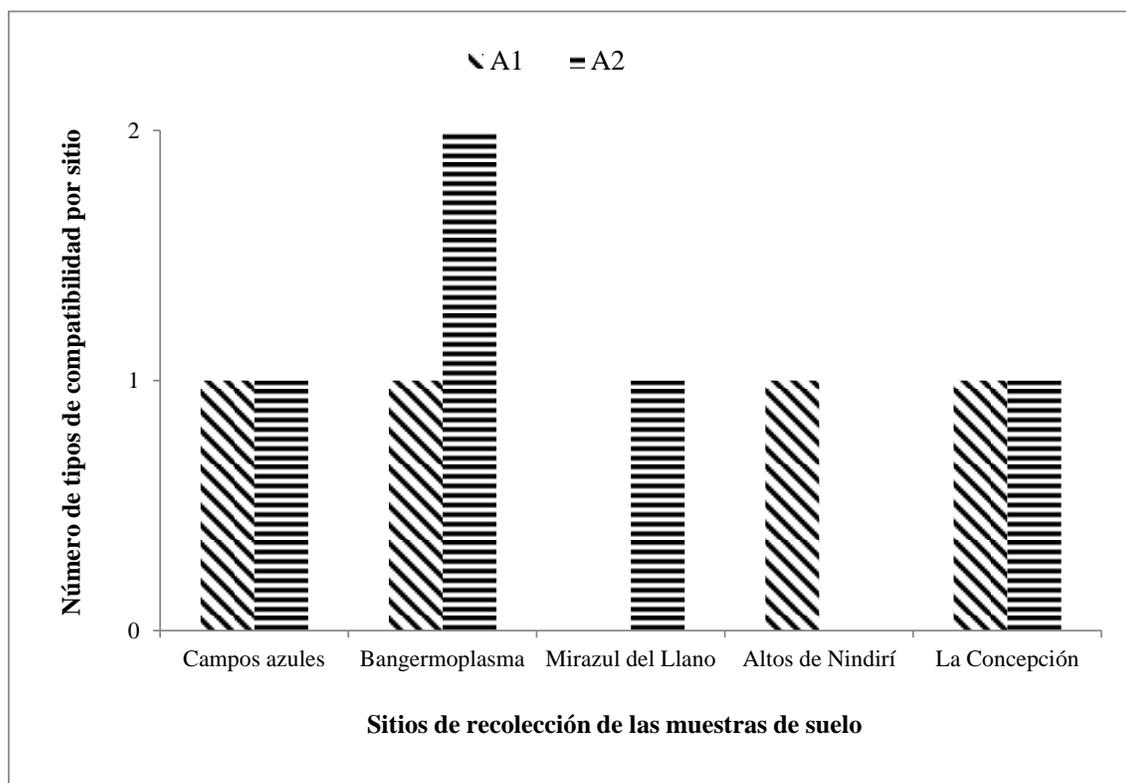


Figura 5. Tipos de compatibilidad A1 y A2 del patógeno *P. cinnamomi* encontrados en los sitios donde se recolectaron las muestras de suelo.

El sistema de apareamiento es uno de los principales factores evolutivos que impulsan la dinámica espacial y temporal de la variación genética en las poblaciones de patógenos. En la naturaleza, los patógenos pueden variar espacial y temporalmente sus tipos de apareamiento y por consiguiente la capacidad de tener diversos sistemas de apareamiento puede ser una estrategia que les permite a los agentes patógenos adaptarse mejor a una amplia gama de entornos bióticos y abióticos. Además, los sistemas de apareamiento afectan la cantidad y distribución de la variación genética dentro de las poblaciones de patógenos, ya que afectan en gran medida otros dos factores evolutivos como son la deriva genética y el flujo de genes. En poblaciones que se reproducen sexualmente se espera que las poblaciones muestren una alta variación genética (Calo et al., 2013; McDonald y Linde, 2002; Zhu et al., 2015).

#### **4.5. Caracterización molecular del agente causal de la pudrición radicular del aguacate (*Phytophthora cinnamomi* Rands)**

Para identificar el género de *Phytophthora* aislado de las diferentes zonas de muestreo donde se cultiva aguacate se precedió a realizar PCR convencional y PCR-FRLP para identificar las especies.

##### **4.5.1. Identificación molecular del género *Phytophthora***

A partir de diez aislados obtenidos por el método de captura se detectó la presencia del género *Phytophthora* mediante la técnica PCR, amplificándose alrededor de 828 a 829 pb (Figura 6; Anexo 3) con el par de iniciadores I2 reverso (GATATCAGGTCCAATTGAGATGC) y A2 delantero (ACTTTCCACGTGAACCGTTTCAA). Siete aislados de *Phytophthora* eran procedentes del municipio de Masatepe, de los cuales cinco fueron obtenidos del banco de germoplasma del INTA (CA24, CA26, BPG04, BPG07 y BPG09) y dos de la comarca Mirazul del Llano (MLL02 y MLL05). Dos aislados procedían del municipio de la Concepción (MLC03 y MLC04) y uno de los Altos de Nindirí (ALT21).

En la Figura 6 estos aislados están identificados con números de la siguiente manera: los números 1, 2, 4, 9 y 10 corresponden a los aislados CA24, CA26, BPG04, BPG07 y BPG09 respectivamente; los números 5 y 8 corresponden a los aislados MLL05 y MLL02; los números 3 y 6 son los aislados MLC03 y MLC04; y por último el número 7 identifica al aislado ALT21.

##### **4.5.2. Identificación molecular de la especie de *Phytophthora***

El producto PCR de los diez aislados de *Phytophthora* obtenidos de la amplificación con los primer I2/A2 se sometieron a digestión con la enzima de restricción MspI, identificándose patrones de bandas de 339 pb, 221 pb, 146 pb, en nueve aislados *Phytophthora* y patrones de 301, 254, 226 en uno de los productos de *Phytophthora* (Figura 7; Anexo 3). Por consiguiente, al comparar los patrones de bandas encontrados en este estudio con los patrones de bandas obtenidos en el estudio realizado por Drenth et al., (2006) se pudo determinar que

nueve de los aislados correspondían a *Phytophthora cinnamomi* (patrones de bandas 339, 221 y 146 pb) y un aislado a *Phytophthora citrophthora* (patrones de bandas 301, 254 y 226 pb) (Figura 6; Anexo 3).

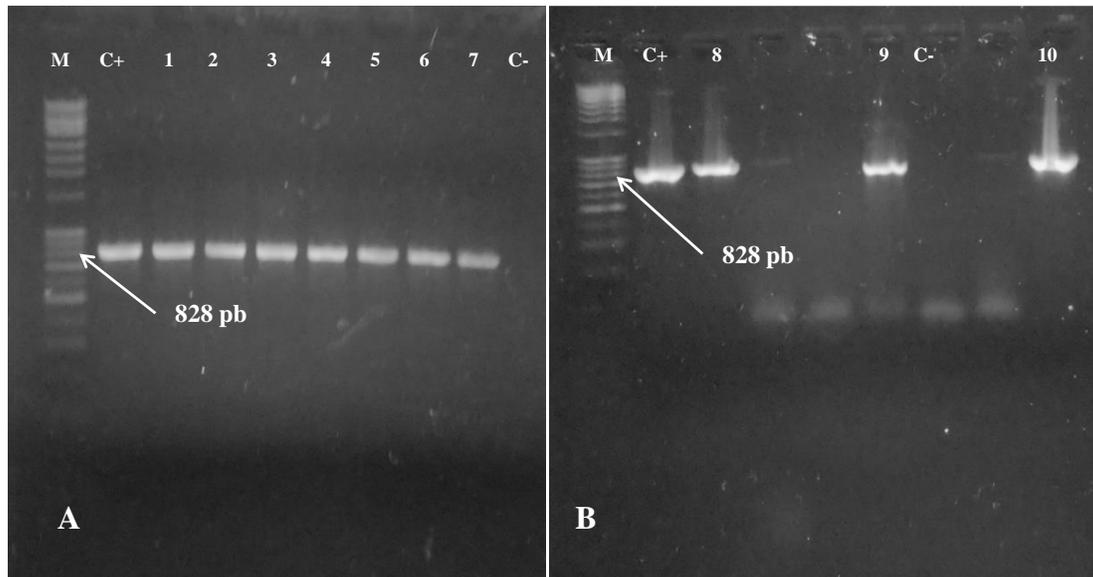


Figura 6. Productos PCR obtenidos con los primer A2/I2 de diez aislados del género *Phytophthora* (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10), un control positivo (C+) y un control negativo (C-). Con la letra M se indica el marcador molecular de 100 pb. El origen y código de los aislados de *Phytophthora* están detallados en el texto de esta sección.

Las invasiones biológicas operan a nivel mundial y se considera que son la segunda causa de pérdida de biodiversidad después de la alteración y destrucción directa del hábitat. En este contexto, las especies de *Phytophthora* son de particular importancia en todo el mundo, ya que son uno de importantes agentes patógenos en la agricultura, horticultura y silvicultura donde causan importantes pérdidas económicas y ecológicas. Por lo tanto, es necesario que se utilicen técnicas de detección e identificación de especies de *Phytophthora* que sean eficientes y rápidas (Català et al., 2015).

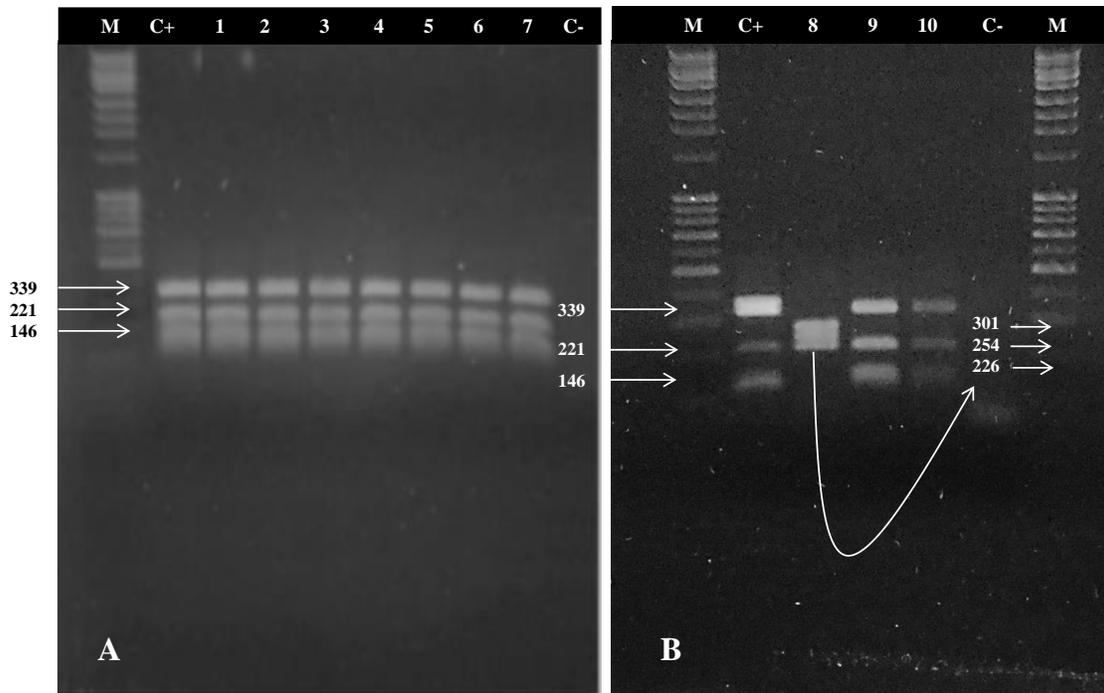


Figura 7. Patrones de bandas obtenidos de los aislados de *Phytophthora* después de la digestión del producto PCR con la enzima de digestión MspI. La letra M indica el marcador molecular de 100 pb, C+ es el control positivo de *P. cinnamomi* y C- es el control negativo. En el panel A, los números del 1 al 7 corresponden a los aislados identificados como *P. cinnamomi*. En el panel B, el número 8 representa al aislado que se identificó como *P. citrophthora* (sus tamaños de fragmentos se indican con la línea curvada), los números 9 y 10 corresponden a dos aislados de *P. cinnamomi*.

Tradicionalmente, se han utilizado diferentes métodos para la detección de especies de *Phytophthora*, los cuales se basan en el aislamiento del patógeno en medios selectivos o en el uso de diferentes técnicas de trapeo con frutos u otros materiales de origen vegetal. Sin embargo, estas técnicas requieren mucho tiempo y, a veces producen falsos negativos debido a la baja disponibilidad de inóculo. Asimismo, la identificación basada en características morfológicas requiere de conocimientos taxonómicos específicos y de un esfuerzo considerable. Por el contrario, los métodos basados en técnicas moleculares que se han desarrollado y aplicado para especies de *Phytophthora* permiten una detección e identificación rápida y precisa incluso cuando la cantidad de inóculo es baja (Pavon et al., 2008; Schena et al., 2006; Tooley et al., 2006).

Se han desarrollado diferentes técnicas basadas en el uso de los espaciadores internos transcritos (ITS, por sus siglas en inglés) para el diseño de cebadores que son altamente

específicos para especies individuales del género *Phytophthora* (Bonants et al., 1997; Drenth et al., 1999; Kroon et al., 2004). En otros casos se han utilizado patrones de restricción del ADN mitocondrial para establecer diferencias entre especies (Martin y Tooley, 2004). Sin embargo, estos estudios mencionados anteriormente solamente llegan a identificar una especie de *Phytophthora* en particular. Por lo tanto, era necesario desarrollar y aplicar un procedimiento que pudiera detectar e identificar varias especies de *Phytophthora* al mismo tiempo, lo cual llegó a concretarse con el estudio llevado a cabo por Drenth et al., (2006).

En el presente estudio, por un lado, se ha comprobado la especificidad de los primer A2/I2 desarrollados por Drenth et al., (2006) para la identificación de aislados de *Phytophthora* a nivel de género. Por otro lado, también se logró determinar dos especies de *Phytophthora* utilizando la técnica de PCR-RFLP. Esto indica que el procedimiento tiene versatilidad y robustez para llevar a cabo ensayos de diagnóstico que tengan como fin la detección e identificación simultánea de muchas especies de *Phytophthora* tanto en la agricultura como en la silvicultura, ya que el rango de hospedantes de *P. cinnamomi* es bastante amplio.

De manera general se puede afirmar que se logró dilucidar la etiología de la enfermedad conocida como pudrición radicular del aguacate (también denominada como “tristeza del aguacate”) a través de las características morfológicas del patógeno *P. cinnamomi* y utilizando técnicas moleculares (PCR-RFLP específicamente). Sin embargo, no solamente *P. cinnamomi* fue encontrado en las muestras de suelo, sino también otra especie, *P. citrophthora*, lo cual no es muy común, ya que *P. citrophthora* ha estado asociado con una enfermedad conocida como “gomosis de los cítricos”, la cual afecta principalmente el tronco de los árboles y conduce a la aparición de cánceres, aunque también este patógeno causa pudrición radicular en cítricos (Erwin y Ribeiro, 1996). Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios futuros que corroboren el involucramiento también de *P. citrophthora* en la pudrición radicular del aguacate.

Los resultados del análisis morfológico y molecular de aislados de *P. cinnamomi* obtenidos en este estudio se constituyen en una base para el estudio de la estructura poblacional y la diversidad genética de este importante patógeno que afecta no solamente en agroecosistemas,

sino también en poblaciones naturales de árboles. Aunque la mayoría de los estudios realizados en el patosistema aguacate-*P. cinnamomi* indican que existe una baja diversidad genética del patógeno (Duan et al., 2008; Linde et al., 1997; Linde et al., 1999; Pagliaccia et al., 2013), en otros estudios se ha encontrado una alta variabilidad genética de *P. cinnamomi* fuera de su centro de origen que se presume que sea Papua Nueva Guinea o Taiwán (Ochoa-Fuentes et al., 2007).

#### **4.6. Selección de potenciales agentes de control biológico mediante pruebas “*in vitro*”**

Se seleccionaron cuatro aislados del hongo antagonista *Trichoderma*, cinco aislados de *P. cinnamomi* y un aislado de *P. citrophthora* de acuerdo a su crecimiento radial en medio de cultivo. El antagonismo de *Trichoderma* se examinó mediante la técnica del cultivo dual.

##### **4.6.1. Ensayo de crecimiento radial de cepas del hongo antagonista *Trichoderma***

De las seis cepas nativas de *Trichoderma* que inicialmente se aislaron, solamente dos fueron seleccionadas por su rápido ritmo de crecimiento y abundante esporulación en el medio de cultivo PDA. El plato con el medio de cultivo fue cubierto completamente por las dos cepas del antagonista a las 60 horas de incubación. Una de las cepas nativas seleccionada fue obtenida del Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Campos Azules del INTA, en el Municipio de Masatepe y fue codificada como BPG01 y la segunda se aisló de un sitio de la Comarca Mirazul del Llano y se codificó como MLL08. Estas cepas nativas de *Trichoderma* tuvieron un ritmo crecimiento casi igual cuando se compararon entre ellas mismas y con las otras dos cepas que se incluyeron en el estudio, la cepa NG y la cepa UNA tal y como se aprecia en la Figura 8.

El análisis de varianza no detectó diferencias significativas entre las cepas en cuanto al crecimiento radial ( $p = 0.0818$ ), ni en la interacción cepa  $\times$  tiempo (valor Lambda de Wilks = 0.3657;  $p = 0.3031$ ). Como se esperaba, el tiempo sí tuvo efecto significativo sobre el crecimiento radial de las colonias de las diferentes cepas de *Trichoderma* (valor Lambda de

Wilks = 0.0001349;  $p = <.0001$ ), es decir, a medida que transcurría el tiempo (horas o días) el radio de las colonias aumentaba (Figura 8; Anexo 5).

En este estudio se utilizó un criterio simple de selección de los antagonistas, el cual consistió en observar el crecimiento y la producción de esporas de las diferentes cepas y se seleccionaron las cepas con rápido crecimiento y con abundante producción de esporas. Una alta tasa de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* está asociada con su habilidad para controlar patógenos de plantas (Matroudi et al., 2009). En otros estudios se han utilizado criterios numéricos porcentuales arbitrarios. Por ejemplo, Aryantha y Guest (2006), utilizaron como criterio de selección que los antagonistas inhibieran en al menos el 39% el crecimiento de la colonia de *P. cinnamomi*. En consecuencia, los antagonistas que cumplieran este criterio eran seleccionados para ensayos posteriores de antagonismo. Sin embargo, en el estudio de Aryantha y Guest (2006) no se evaluó el grado de antagonismo que ejercieron los microorganismos benéficos sobre *P. cinnamomi*.

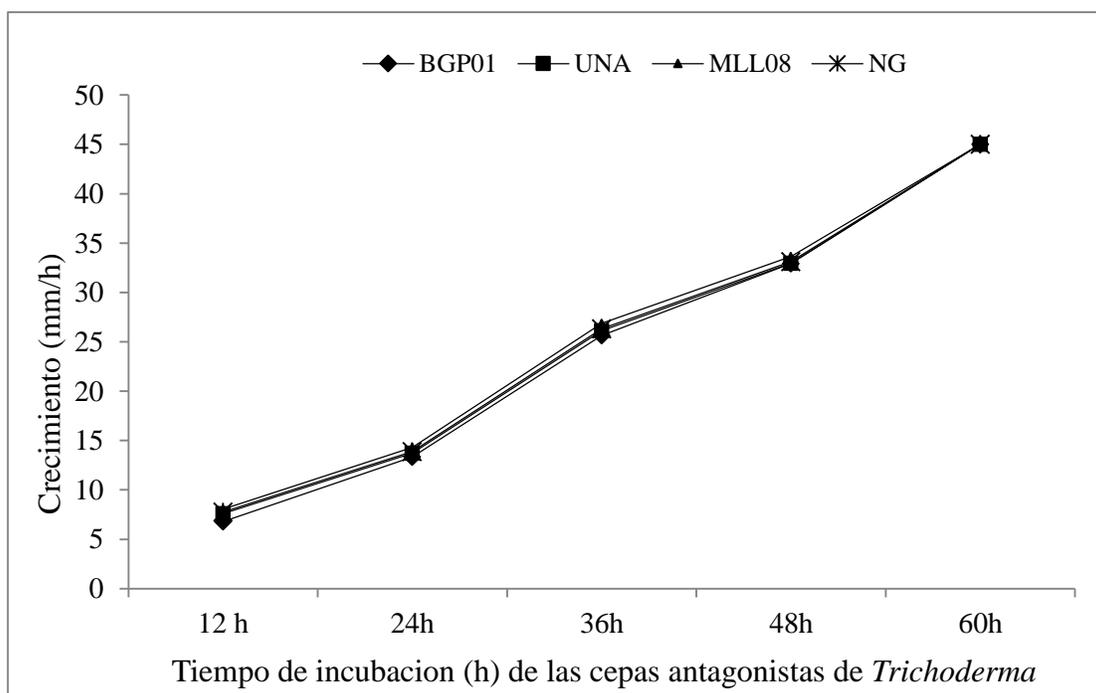


Figura 8. Crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma* (BGP01, MLL08, NG y UNA) seleccionadas para enfrentamientos duales con el patógeno causante de la pudrición radicular del aguacate.

#### 4.6.2. Ensayo de crecimiento radial del patógeno *P. cinnamomi*

En este ensayo se utilizaron cinco aislados de *P. cinnamomi*, de los cuales tres eran procedentes del Banco de Germoplasma de aguacate del Centro Experimental Campos Azules, Masatepe (BGP04, BPG07 y BPG09), uno del Municipio La Concepción (MLC04), uno de la Comarca Mirazul del Llano (MLL05) y el único aislado de *P. citrophthora* que era procedente de la Comarca Mirazul del Llano (MLL02). El análisis de varianza (Anexo 6) detectó diferencias significativas en el tiempo de incubación de los aislados de *Phytophthora* (valor Lambda de Wilks = 0.0002407;  $p < .0001$ ), entre los aislados de *Phytophthora* ( $p = < .0001$ ) y en la interacción tiempo de incubación  $\times$  aislado de *Phytophthora* (valor Lambda de Wilks = 0.00017799;  $p = < .0001$ ). De acuerdo a la prueba de separación de medias de Tukey el aislado que tuvo el mayor crecimiento radial fue el BGP04 (33.73 mm) y se diferenció significativamente de los aislados BGP09, MLL02, MLL05 y BGP07, pero no del aislado MLC04 (32.90 mm). El aislado con menor crecimiento radial durante el período de incubación fue el BGP09 con 22.43 mm en 96 horas (Figura 9; Anexo 7).

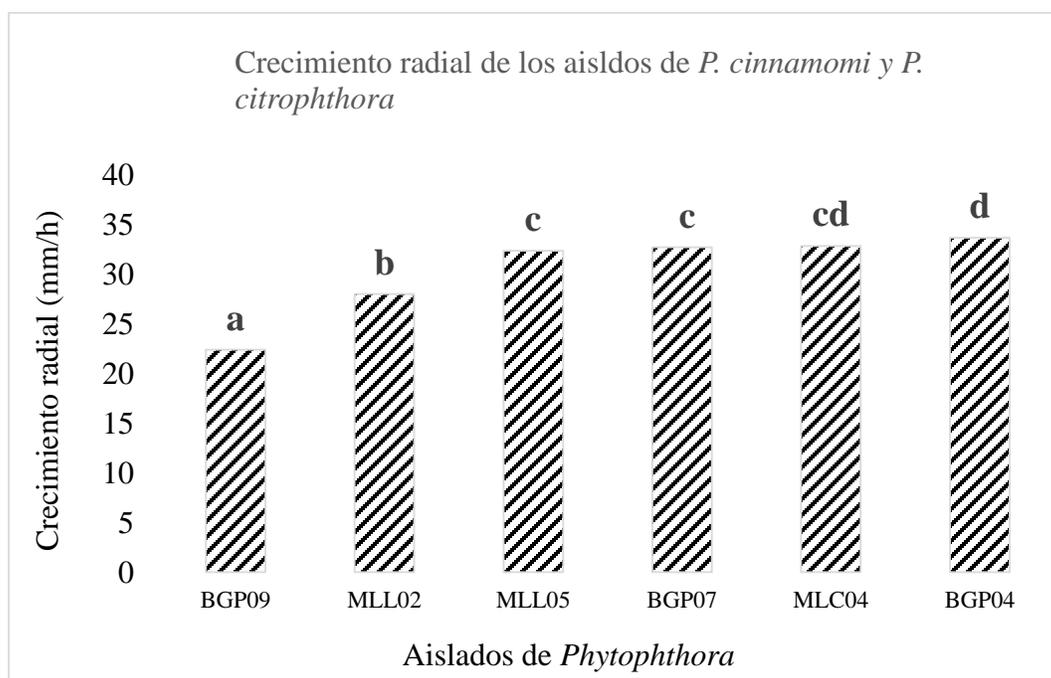


Figura 9. Crecimiento radial (en mm) de los diferentes aislados de *Phytophthora cinnamomi* (BGP04, BGP07, BGP09, MLC04 y MLL05) y *P. citrophthora* (MLL02) después de un período de incubación de 96 horas.

En cuanto a la interacción entre el tiempo de incubación y el aislado de *Phytophthora* también se observaron diferencias significativas. El aislado BGP09 presentó atraso en su crecimiento con respecto a los demás aislados hasta las 72 horas cuando su crecimiento radial era de 35.33 mm. Otro aislado que tuvo retraso en su crecimiento hasta las 24 horas de evaluación fue el aislado MLL02. Sin embargo, a partir de las 48 horas este aislado creció de forma muy similar a los aislados BGP04, BGP07, MLC04 y MLL05. A las 96 horas de evaluación se observó que el crecimiento de todos los aislados era similar y alcanzó un máximo de 45 mm (Figura 10; Cuadro 3). Se decidió evaluar hasta las 96 horas para verificar si había alguna diferencia en cuanto al crecimiento individual de los aislados.

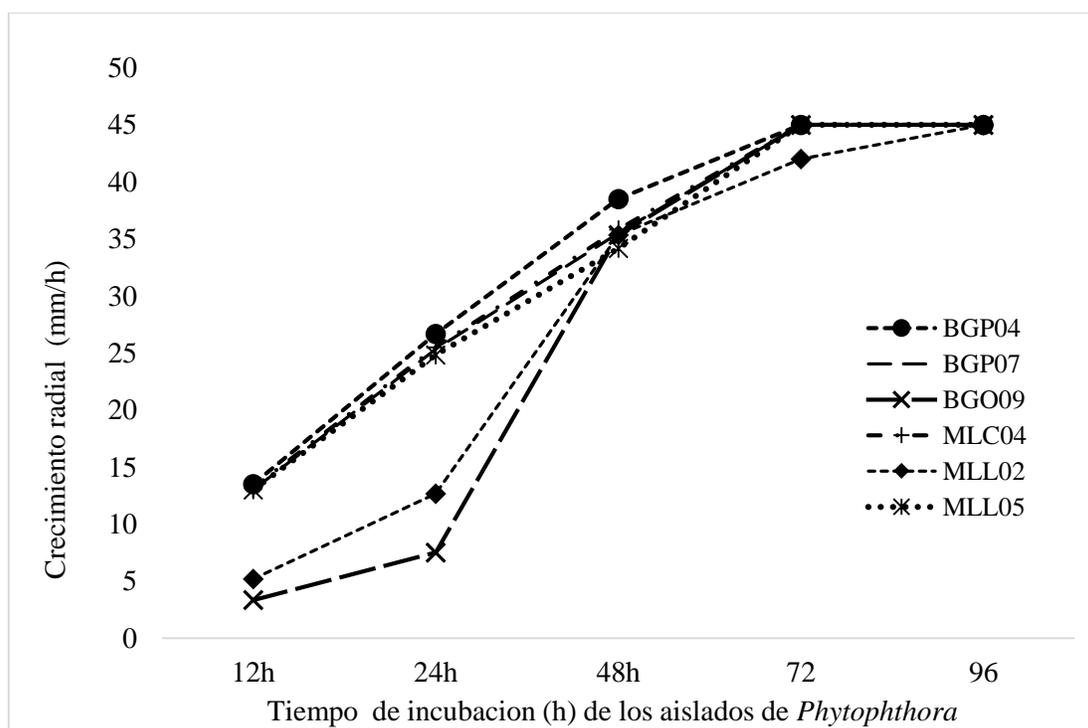


Figura 10. Crecimiento radial de los aislados de *P. cinnamomi* (BGP04, BGP07, BGP09, MLC04 y MLL05) y *P. citrophthora* (MLL02) en dependencia del tiempo de incubación.

En estudios pioneros sobre el crecimiento radial de los aislados de *P. cinnamomi* se reportan diferencias en cuanto a esta característica fenotípica del patógeno. Estas diferencias han sido relacionadas con la temperatura de incubación, el medio de cultivo utilizado y el tipo de apareamiento del patógeno (A1 o A2). Por ejemplo, Zentmyer (1976) observó diferencias en

el crecimiento del micelio de *P. cinnamomi* de acuerdo al tipo de apareamiento y de acuerdo a la temperatura. El autor señala que los aislados probados en su estudio tuvieron un mayor crecimiento radial a 25°C en el medio PDA en comparación con otros dos medios de cultivo (MM – medio mínimo, y Agar V8 clarificado) y que el tipo de apareamiento A2 tuvo una tasa de crecimiento mayor que el tipo de apareamiento A1. En otros estudios similares se encontró que aislados de *P. cinnamomi* tuvieron una mayor tasa de crecimiento en Agar V8 que en el medio PDA y que su tasa de crecimiento era mayor a temperaturas entre 24°C y 28°C que a temperaturas de 15°C y 32°C (Hüberli, 1995; Hüberli et al., 2001). En este estudio el ensayo de crecimiento radial del micelio de *P. cinnamomi* fue establecido a 26°C y su crecimiento fue óptimo y se observaron diferencias significativas en el crecimiento radial de los diferentes aislados incluidos en el ensayo. Por lo que se confirma que la temperatura óptima para el crecimiento del patógeno en condiciones “*in vitro*” está entre 24 y 28°C.

#### **4.6.3. Pruebas de antagonismo “*in vitro*”**

El valor de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks (modificado) fue de 0.534, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula y se acepta que los residuos tienen una distribución normal. En la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene se obtuvo un valor de 0.25 por lo cual no se rechaza la hipótesis nula, ya que no había evidencias suficientes para afirmar que los residuos no son homogéneos.

El análisis de varianza reveló diferencias significativas entre las cepas del antagonista *Trichoderma* ( $p=0.0023$ ), entre los aislados de *Phytophthora* ( $p<0.0001$ ) y en la interacción cepas de *Trichoderma* × aislados de *Phytophthora* ( $p = 0.0001$ ). El PICR osciló desde un 21.83% obtenido en la interacción de la cepa MLL08 de *Trichoderma* con el aislado BGP04 de *Phytophthora*, hasta un 54.83% obtenido en la interacción de la cepa NG de *Trichoderma* con el aislado BGP09 de *Phytophthora* (Cuadro 4; Anexo 8).

Cuadro 3. Interacciones del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) del micelio de *Phytophthora* en enfrentamientos duales con cepas del antagonista *Trichoderma*.

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Aislados de <i>Phytophthora</i>					
	BGP04	BGP07	BGP09	MLC04	MLL02	MLL05
BGP01	23.68abc <sup>1</sup>	27.07abc	53.72f	27.80c	44.42dc	24.05abc
MLL08	21.83a	25.92abc	54.47f	25.92abc	45.17de	24.80abc
NG	25.53abc	24.80abc	54.83f	25.92abc	45.93e	26.28bc
UNA	24.82abc	24.42abc	52.23f	23.33ab	41.47d	26.68bc

<sup>1</sup>Los valores de medias para una determinada interacción dentro columnas con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Los aislados BPG09 de *P. cinnamomi* y el aislado MLL02 de *P. citrophthora* tuvieron los PICR's promedio más altos (53.81% y 44.25% respectivamente) cuando fueron enfrentados a cualquiera de las cepas antagonistas. El aislado BGP09 se diferenció significativamente del resto de aislados y podría considerarse como el más susceptible al efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma*. Por el contrario, el aislado BGP04 podría ser considerado como el menos susceptible al efecto antagónico ejercido por las cepas de *Trichoderma*, ya que su PICR promedio fue el más bajo (23.97%) y en este sentido se diferenció significativamente de todos los aislados de *Phytophthora* que se incluyeron en las pruebas de antagonismo. El aislado MLL02 de *P. citrophthora* también se podría considerar como uno de los más susceptibles al efecto antagónico de *Trichoderma*, ya que su PICR promedio también fue alto (44.25%) y se diferenció significativamente del resto de aislados (Figura 12; Cuadro 4).

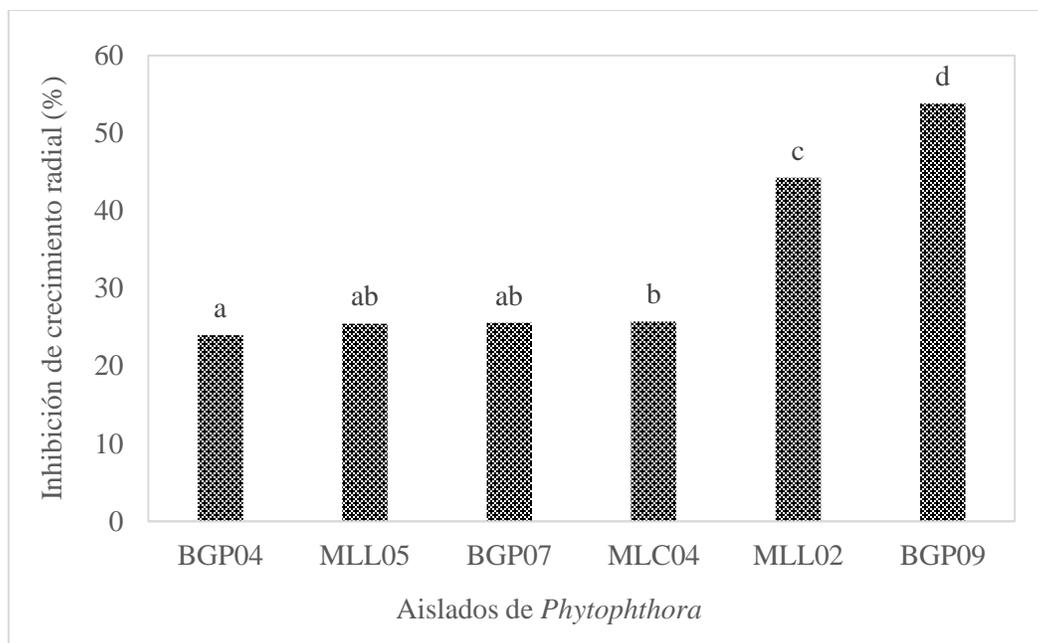


Figura 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los diferentes aislados de *Phytophthora cinnamomi* (BGP04, BGP07, BGP09, MLC04, y MLL05) y *P. citrophthora* (MLL02) obtenido en enfrentamientos duales con cepas del antagonista *Trichoderma*.

En cuanto al comportamiento individual de cada una de las cepas de *Trichoderma* en los enfrentamientos duales con los aislados de *Phytophthora*, el ANDEVA y la prueba de separación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) indican que la cepa NG de *Trichoderma* se diferenció significativamente de las cepas UNA y MLL08, pero no de la cepa BGP01. Con la cepa NG se obtuvo un 33.88% de reducción general del crecimiento radial de los aislados de *Phytophthora*. La cepa UNA de *Trichoderma* fue la que redujo de manera general en menor porcentaje el crecimiento radial de los aislados de *Phytophthora* (Figura 13). No obstante, desde el punto de vista biológico el comportamiento antagónico general de las cepas de *Trichoderma* tiene un gran significado ya que en la observación directa de los enfrentamientos duales se pudo observar su efecto supresor sobre el avance del micelio de los diferentes aislados de *Phytophthora* contra los cuales fueron enfrentados.

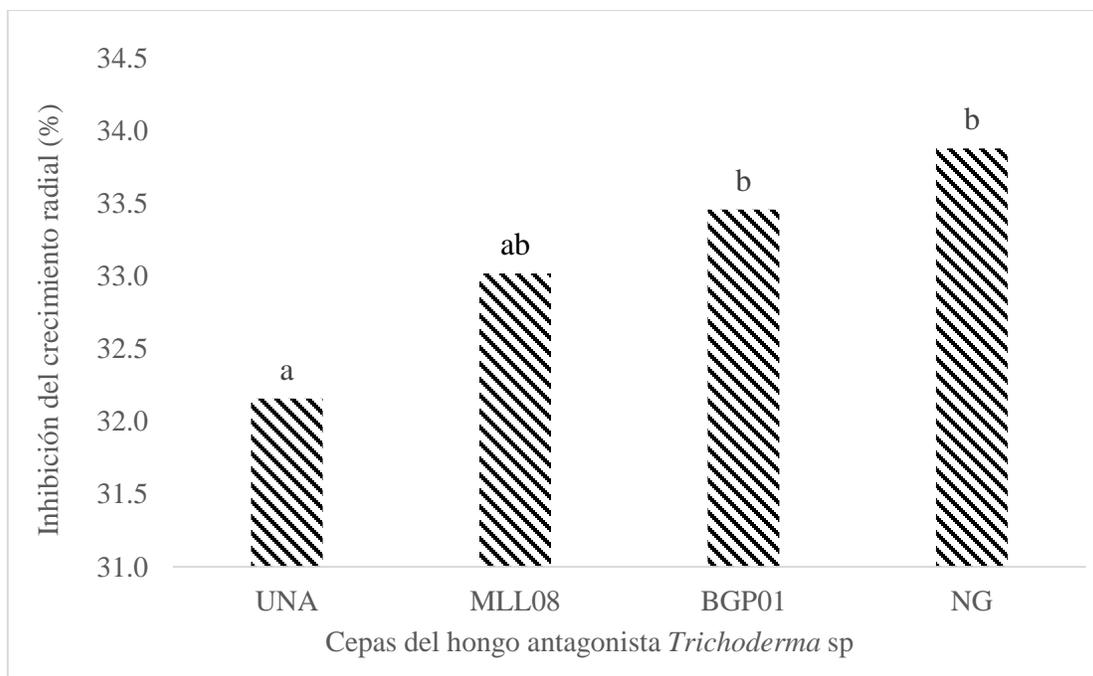


Figura 12. Inhibición del crecimiento radial (expresado en porcentaje) ejercido por cepas del hongo antagonista *Trichoderma* sobre aislados de los patógenos *P. cinnamomi* y *P. citrophthora*.

Las especies de *Trichoderma* han sido propuestas como agentes de control biológico potencialmente viables para el manejo de diferentes géneros y especies de patógenos que atacan plantas. En el control biológico de patógenos de plantas, las especies de *Trichoderma* ocupan un lugar predominante, ya que en el 90% de los casos se ha usado este antagonista y el otro 10% corresponde a otros microorganismos. El efecto antagónico y benéfico de estas especies se manifiesta en forma de inhibición del crecimiento de los patógenos mediante antibiosis, competencia, micoparasitismo, promoción del crecimiento de las plantas e inducción de resistencia (Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004).

En el manejo biológico de las especies de *Phytophthora* el uso de *Trichoderma* no ha sido la excepción. Por ejemplo, en investigaciones donde se puso a prueba la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* actuando de manera individual y en combinación con la bacteria *Burkholderia cepacia* se determinó que el hongo antagonista ejerció competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y lisis enzimática, mientras que la bacteria manifestó su efecto antagónico a través de antibiosis sobre el oomicete *Phytophthora capsici* cuando fueron enfrentados en cultivos duales “*in vitro*” (Ezziyani et al., 2004; Ezziyani et al., 2011). En

otro experimento, donde se estudió el comportamiento antagónico de cepas de *Trichoderma* contra el oomicete *P. ramorum*, se encontró que la actividad antagónica de *Trichoderma* fue variable, ya que algunas cepas no mostraron ninguna actividad supresora del patógeno, mientras que otras cepas inhibieron completamente el crecimiento del patógeno en los cultivos duales (Widmer, 2014).

En este estudio, como ya se mencionó anteriormente se pudo observar las características antagónicas que poseen las cepas nativas de *Trichoderma* y otras cepas incluidas en el experimento al inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi* en cultivos duales “*in vitro*”. El mecanismo antagónico observado fue por competencia de espacio y nutrientes (Figura 14). No se llevaron a cabo estudios de micoparasitismo o de antibiosis. Estos resultados concuerdan con los de Almaraz-Sánchez et al., (2012), los cuales reportan una reducción significativa del micelio de *P. cinnamomi* en presencia de cepas antagónicas de *Trichoderma* lo cual se lo atribuyen a la capacidad que posee el antagonista de crecer más rápidamente que el patógeno y esto a su vez hace que aumente su capacidad antifúngica.

#### **4.6.4. Evaluación del grado de antagonismo de las cepas de *Trichoderma***

Todas las cepas de *Trichoderma* sin excepción se ubicaron en la Clase 1 de la escala de Bell et al., (1982) cuando fueron enfrentados con los aislados BGP09 de *P. cinnamomi* y MLL02 de *P. citrophthora*, eso quiere decir que, el antagonista creció completamente sobre la colonia del patógeno y cubrió toda la superficie del medio de cultivo. Por otro lado, cuando las cepas de *Trichoderma* (todas sin excepción), se enfrentaron a los aislados BGP04, BGP07, MLC04 y MLL05 de *P. cinnamomi*, mostraron un grado antagónico que se ubicó en la Clase 2 de la escala de Bell et al., (1982), por lo tanto, el antagonista cubrió al menos las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y un 50% de la colonia del patógeno (Figura 14 y 15).

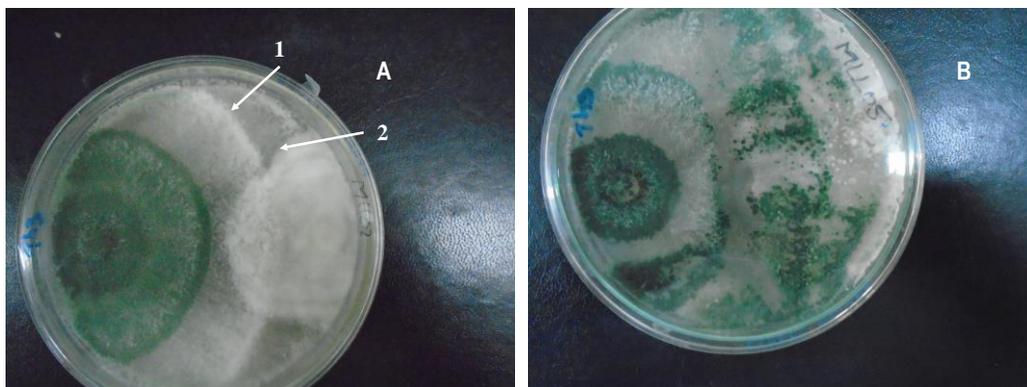


Figura 13. Antagonismo por competencia demostrado por cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora*. En el panel A, se muestra el borde de avance (1) de la cepa NG de *Trichoderma* y el borde de avance del aislado MLL02 de *P. citrophthora* (2). En el panel B se puede observar que la cepa NG de *Trichoderma* creció completamente sobre la colonia del aislado MLL05 de *P. cinnamomi*.

Un aislado de *Trichoderma* era considerado altamente antagonista si el valor promedio de una comparación determinada era  $\leq 2$  y no era considerado altamente antagonista si el valor promedio era  $\geq 3$  (Bell et al., 1982). Las cepas de *Trichoderma* probadas en este estudio se ubicaron en las Clases 1 y 2 de la escala, por lo tanto, se consideran altamente antagonistas contra los aislados de *P. cinnamomi* y *P. citrophthora*.

En la actualidad son pocas las investigaciones que se han desarrollado específicamente en el patosistema aguacate (*Persea americana*) – *Phytophthora cinnamomi* y en las cuales se haya incluido el uso de agentes antagonistas como *Trichoderma* para el manejo biológico del agente causal de la pudrición radicular del aguacate. En algunos estudios se ha reportado el antagonismo “*in vitro*” ejercido por las cepas de *Trichoderma* sobre *P. cinnamomi* a través de sus tres principales mecanismos de acción como lo son la competencia, la antibiosis y el micoparasitismo, sin embargo, en esos estudios no se ha determinado la capacidad antagónica o el grado antagónico que tienen las distintas cepas de *Trichoderma* cuando se enfrentan a los aislados del patógeno (Almaraz-Sánchez et al., 2012; Aryantha y Guest, 2006).

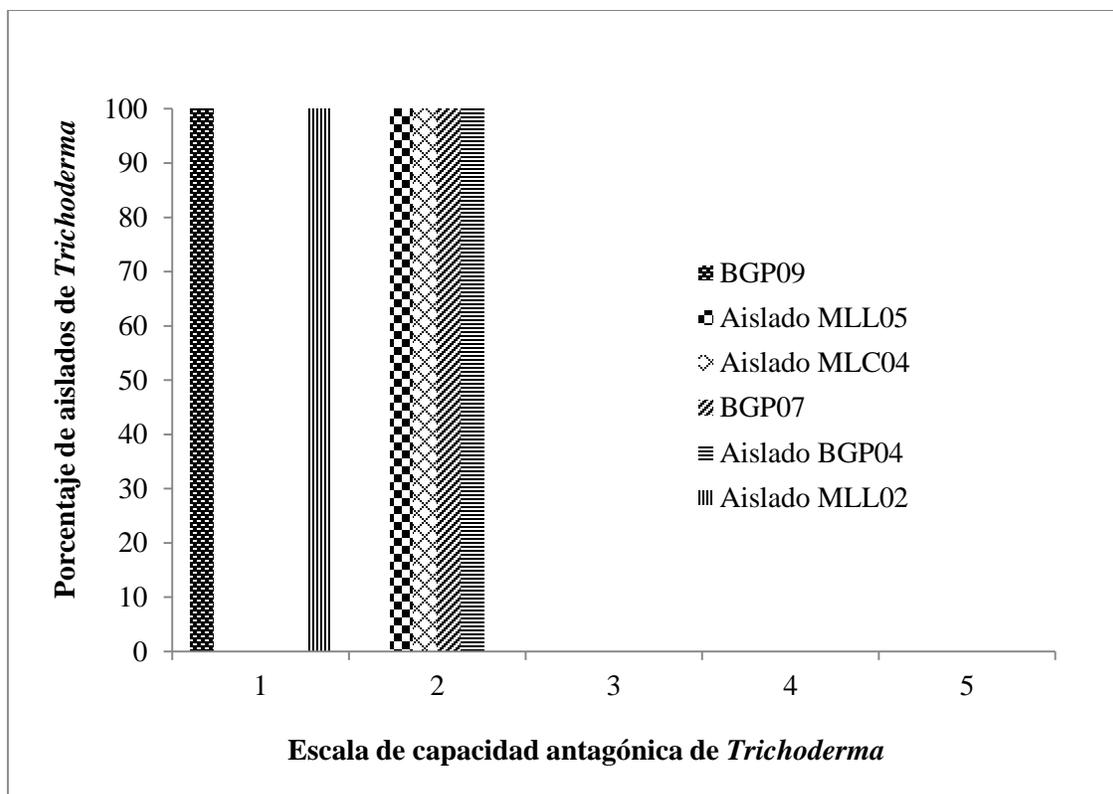


Figura 14. Grado de antagonismo demostrado por las cepas del hongo antagonista *Trichoderma* sobre aislados de *P. cinnamomi* (BGP04, BGP07, BGP09, MLC04 y MLL05) y *P.citrophthora* (MLL02) de acuerdo a la escala de clases de Bell et al., (1982).

En otras investigaciones donde se han estudiado otros patosistemas que incluyen a especies de *Trichoderma* si se ha determinado el grado antagonico alcanzado por las distintas cepas de *Trichoderma* usando la escala de Bell et al., (1982). En una investigación llevada a cabo para determinar los modos de acción de aislados de *Trichoderma* spp., frente a *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm, agente causal de la “gomosis” de las cucurbitáceas, mediante la técnica de cultivo dual, se encontró que las cepas del antagonista se ubicaron en la Clase 1 de la escala (Martínez et al., 2013). De forma similar, en otros estudios donde se ha pretendido determinar el grado antagonico de aislados de *Trichoderma* contra patógenos como *Mycosphaerella fijiesis*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y otros usando la escala de Bell et al., (1982), el grado antagonico alcanzado por las cepas del antagonista ha estado entre la Clase 1 y la Clase 2 de la escala (Acosta-Suárez et al., 2013; Calvo-Araya et al., 2012; Mir et al., 2011).

Por un lado, este estudio llevado a cabo en Nicaragua está en concordancia con los trabajos de investigación mencionados anteriormente ya que las cepas de *Trichoderma* al enfrentarlas a aislados del patógeno *P. cinnamomi* se ubicaron las Clases 1 y 2 de la escala lo que las hace potencialmente viables para ser usadas en investigaciones posteriores a nivel de casa malla o de campo. Por otro lado, el uso de la escala de Bell et al., (1982) es una herramienta muy importante que debería ser utilizada cuando de lleven a cabo estudios cuyo objetivo sea el de seleccionar cepas de *Trichoderma* con un alto grado de antagonismo a diversos patógenos de plantas.

El establecimiento de la capacidad antagónica o el grado antagónico de las cepas de *Trichoderma* en condiciones “*in vitro*” es una necesidad prioritaria y se constituye en una premisa para la selección de estas cepas, no solamente para las pruebas siguientes en condiciones de casa malla y campo, sino que también se puede generar información sobre una posible formulación con un vehículo apropiado que les dé mayor estabilidad y eficacia en condiciones de campo. De esta manera se pueden obtener resultados consistentes y satisfactorios en el manejo biológico de patógenos no solamente en agroecosistemas, sino también en ecosistemas de vegetación natural donde poco se sabe sobre el impacto que tienen las poblaciones nativas e invasivas de fitopatógenos y su posible manejo con microorganismos antagonistas.

En resumen, se puede aseverar con toda certeza que el oomicete *P. cinnamomi* es el principal agente causal de la pudrición radicular del aguacate, enfermedad que es también conocida como “tristeza del aguacate”. Esta aseveración se basa en el examen de las características morfológicas, las cuales coinciden con las del patógeno en mención y que fueron confirmadas a través de la técnica PCR-RFLP. Hasta el momento, los resultados indican que existen los dos tipos de apareamiento del patógeno (A1 y A2), lo que de confirmarse en estudios posteriores, representaría una seria amenaza para la agricultura y silvicultura en Nicaragua, ya que esto implicaría que el patógeno pudiera estarse reproduciendo de forma sexual y sobreviviendo como oosporas en el suelo o en diferentes sustratos asociados a vegetación.

Existe la posibilidad de manejo biológico de las poblaciones de *P. cinnamomi* con microorganismos antagonistas del género *Trichoderma* no solamente en agroecosistemas de aguacate, sino también en otros sistemas agrícolas y forestales donde el patógeno esté presente. Sin embargo, la inclusión de cepas de *Trichoderma* de forma individual en la lucha biológica contra este patógeno resulta insuficiente, por lo que se requiere de una combinación de antagonistas que tengan diversos modos de supresión y que actúen de forma similar tal y como ocurre en la naturaleza para alcanzar un manejo satisfactorio y aplicable en cualquier tipo de situación.

## V. CONCLUSIONES

- El oomicete *P. cinnamomi* es el agente causal de pudrición radicular del aguacate o tristeza del aguacate y fue confirmada mediante la aplicación de técnicas moleculares PCR-RFLP.
- En las pruebas de selección “*in vitro*”, solamente dos cepas nativas de *Trichoderma sp*, BGP01 y MLL08, recolectadas del Banco de Germoplasma del INTA, Masatepe, y de la Comarca Mirazul del Llano, mostraron capacidad antagonica frente a aislados de *P. cinnamomi* y *P.citrophthora*.
- La cepa NG de *Trichoderma* fue la que tuvo un mejor comportamiento antagonico cuando fue enfrentada a los diferentes aislados de *P. cinnamomi* y *P. citrophthora*; no obstante, las cuatro cepas de *Trichoderma* incluidas en el estudio mostraron alto grado de antagonismo al ubicarse en las Clases 1 y 2 de la escala de evaluación.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios sobre la estructura poblacional de *P. cinnamomi* para corroborar si se reproduce sexualmente bajo condiciones naturales en el campo o si las poblaciones de este patógeno están representadas por uno o unos pocos linajes clonales cómo ha sido reportado de otras partes del mundo.
- En base a los resultados obtenidos de las pruebas in vitro se sugiere realizar pruebas en invernadero y campo para el uso de *Trichoderma* sp., en combinación con otros antagonistas y con variedades o patrones resistentes para el manejo de la pudrición radicular del aguacate.

## VII. LITERATURA CONSULTADA

- Acosta-Suárez, M., Pichardo, T., Roque, B., Cruz-Martín, M., Mena, E., Leiva-Mora, M., Castro, R., y Alvarado-Capó, Y. 2013. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* rifai contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotecnología Vegetal* 13:231-235.
- Agrios, G.N. 2007. *Fitopatología*. Segunda Edición. México, México, D.F. Editorial Limusa, S.A. de C.V. 819 p.
- Alfonso Bartoli J.A. 2008. Manual técnico del cultivo del aguacate HASS (*Persea americana* L.). La lima, Cortes, Honduras, C.A. FHIA. 58 p.
- Almaraz-Sánchez, A., Alvarado-Rosales, D., Tlapal-Bolaños, B., Espinoza-Victoria, D. 2012. Identificación de hongos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi* Rands en bosques de encino del Arrayanal, Colima y Tecoaapa, Guerrero. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18:341-356.
- Almaraz-Sánchez, A., Alvarado-Rosales, D., y Saavedra-Romero, Luz de L. 2013. Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de esporulación. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 19:5-12.
- Alvarado-Rosales, D., Saavedra-Romero, L. L., Almaraz-Sánchez, A., Tlapal-Bolaños, B., Trejo-Ramírez, O., Davidson, J. M., Kliejunas, J.T., Oak, S., O'Brien, J.G., Orozco-Torres, F., and Quiroz-Reygadas, R. D. 2007. Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en el centro-oeste de México. *Polibotanica*, 23:1–22.
- Alvarado-Rosales, D., Saavedra-Romero, L. L., y Almaraz-Sánchez, A. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands asociado al encino (*Quercus* sp.) en Tecoaapa, Guerrero, México. *Agrociencia* 42:565–572.

- Andrade-Hoyos, P., Molina Gayosso, E., De León, C., Espíndola Barquera, M.C., Alvarado Rosales, D., y López Jiménez, A. 2015. Mecanismos de defensa en portainjertos de aguacate ante *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6:347-360.
- Aryantha, N.P., and Guest, D.I. 2006. Mycoparasitic and antagonistic inhibition of *Phytophthora cinnamomi* Rands by microbial agents isolated from manure composts. *Plant Pathology Journal* 5:291-298.
- Balzarini, M.G., González, L.A., Tablada, E.M., Casanoves, F., Di Rienzo, J.A., y Robledo, C.W. 2008. Infostat: Manual del usuario. Grupo Infostat, FCA, Universidad de Córdoba, Argentina. Primera Edición. Editorial Brujas, Argentina. 334 p.
- Bell D.K, Wells H.D, Markham C.R. 1982. In vitro antagonism of Trichoderma species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 72(4):379-382.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., y Codón, A.C. 2004. Biocontrol mechanism of Trichoderma strains. *International Microbiology* 7:249-260.
- Besoain, X., y Piontelli, E. 1999. Pudrición negra en raicillas de palto (*Persea americana* Mill.) por *Cylindrocarpon destructans*: patogenicidad y aspectos epidemiológicos. *Boletín Micológico* 14:41-47.
- Besoain, X., Arenas, C., E. Salgado, E., y Latorre, B.A. 2005. Efecto del periodo de inundación en el desarrollo de la tristeza del palto (*Persea americana*), causada por *Phytophthora cinnamomi*. *Ciencia e Investigación Agraria* 32:97-103.
- Blandón-Díaz, J. U., Widmark, A.-K., Hannukkala, A., Andersson, B., Högberg, N., and Yuen, J. E. 2012. Phenotypic variation within a clonal lineage of *Phytophthora infestans* infecting both tomato and potato in Nicaragua. *Phytopathology* 102:323-330.
- Bonants, P., de Weerd, M.H., van Gent-Pelzer, M., Lacourt, I., Cooke, D., Duncan, J. 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology* 103:345–355.

- Bonilla, T., Sánchez, P., Gonzales, M., y Pérez, M. 2011. *Neofusicoccum parvum* y *Phytium vexans*: nuevos patógenos del aguacate descritos en Andalucía. En: VII Congreso Mundial del Aguacate, Cairns. Memorias, editado por avocadosource. p.1-5.
- Calo, S., Billmyre, R. B., and Heitman, J. 2013. Generators of phenotypic diversity in the evolution of pathogenic microorganisms. *PLoS Pathogens* 9:1-4.
- Calvo-Araya, J.A., Rivera-Coto, G., Orozco-Cayasso, S., Orozco-Rodríguez, R. 2012. Aislamiento y evaluación in vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana* 23:225-231.
- Català, S., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P. 2015. The use of genus-specific amplicon pyrosequencing to assess *Phytophthora* species diversity using eDNA from soil and water in Northern Spain. *PLoS ONE* 10:1-14.
- Ciro, D., Rendon, K. y Navarro, R.A. 2006. Reconocimiento de la pudrición de raíces (*Phytophthora cinnamomi*) en aguacate (*Persea americana*) en Antioquia. *Revista Universidad Católica de Oriente* 22:41-51.
- Coffey, M. 1991. Cause and diagnosis Avocado root rot. *California Grower* 15:22-23.
- Costa, J.L.S., Menge, J.A., and Casale, W.L. 2000. Biological control of *Phytophthora* root rot of avocado with microorganisms grown in organic mulches. *Brazilian Journal of Microbiology* 31:239-246.
- Dobrowolski, M. P., Tommerup, I. C., Shearer, B. L., and O'Brien, P. A. 2003. Three clonal lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia revealed by microsatellites. *Phytopathology* 93:695-704.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Drenth, A., Wagels, G., Smith, B., Sendall, B., O'Dwyer, C., Irvine, G., and Irwin, J. A. G. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology* 35:147-159.

- Drenth, A., Wagels, G., Irwin, J.A.G., Liew, E.C.Y., Maclean, D.J. 1999. DNA based methods for the detection of *Phytophthora* species. Australia patent number 16330/97.
- Duan, C.-H., Riley, M.B., and Jeffers, S.N. 2008. Characterization of *Phytophthora cinnamomi* populations from ornamental plants in South Carolina, USA. Archives of Phytopathology and Plant Protection 41:14-30.
- Eggers, J. E., Balci, Y., and MacDonald, W. L. 2012. Variation among *Phytophthora cinnamomi* isolates from oak forest soils in the eastern United States. Plant Disease 96:1608-1614.
- Erwin, D.C., and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora: Diseases worldwide*. First Edition. Minnesota, U.S.A. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A. 269-280 p.
- Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Ahmed, A.S., Requena, M.E. Ey Candela M.E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) Anales de Biología 26:35-45.
- Ezziyyani, M.; Hamdache, A.; Requena, A.; Egea-Gilabert, C.; Candela, M. E. González-Ramiro, L. y Requena, M. E. 2011. Mejora de la capacidad antifúngica in vitro e in vivo de un combinado de antagonistas compatibles frente a *Phytophthora capsici* Leonian. Anales de Biología 33: 67-77.
- FAOSTAT. 2013. Avocado production. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S>. Acceso: 23 de Octubre 2015.
- Fernández –Larrea Vega, O.2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integrado de plagas 62: 96-100.
- French, E., y Herbert, T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. San José (C.R), IICA. 150 p.

- Gallegly, M.E., and Hong, C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. First Edition. Minnesota, U.S.A. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A. 158 p.
- Gallo Siverio, L. F. Rodríguez-Pérez, A.M. 2007. Thermal sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* and long-term effectiveness of soil solarisation to control avocado root rot. *Annals of Applied Biology* 150: 65-73.
- Gerrettson-Cornela, L. 1989. Compendium and classification of the species of the genus *Phytophthora* de Bary by the canons of the traditional taxonomy. *Research Division State Forests of New South Wales, Australia* 45: 15-16 p.
- Guest, D., and Grant, B. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews* 66:159–187.
- Hardham, A.R. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 6:589–604.
- Hardy, G.E.S., Barrett, S. and Shearer, B.L. 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology* 30:133–139.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-antagonistic avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2:43-56.
- Ho, H., and Zentmyer, G. 1977. Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia* 69:701-713.
- Hüberli, D. 1995. Analysis of variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* Rands from *Eucalyptus marginata* Donn ex Sm., and *E. calophylla* R. Br., based on cultural characteristics, sporangia and gametangia morphology, and pathogenicity. Thesis Bachelor of Science. Murdoch University, Western Australia, AU. School of Biological and Environmental Sciences. 145 p.

- Hüberli, D., Tommerup, I.C., Dobrowolski, M.P., Calver, M.C., and Hardy, G.E. St. J. 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycological Research* 105:1053-1064.
- INTA. 2003. Cultivo del aguacate. Primera Edición. Managua, Nicaragua. Guía Tecnológica No. 9. INPASA. 40 p.
- Kaminskyj, S.G.W. 2005. Drug-Free Methods for Purifying Contaminated Fungi Cultures. *Inoculum (Supplement to Mycologia)* 56:11-14.
- Kroon, L.P.N.M., Verstappen, E.C.P., Kox, L.F.F., Flier, W.G., Bonants, P.J.M. 2004. A rapid diagnostic test to distinguish between American and European populations of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 94:613–620.
- Kroon, L. P. N. M., Brouwer, H., de Cock, A. W. A. M., and Govers, F. 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* 102:348-364.
- Linde, C., Drenth, A., and Wingfield, M. J. 1999. Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. *European Journal of Plant Pathology* 105:667-680.
- Linde, C., Drenth, A., Kemp, G. H. J., Wingfield, M. J., and von Broembsen, S. L. 1997. Population structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Phytopathology* 87:822-827.
- Lopez-Herrera, C.J; Pérez-Jiménez, R.M., Llobel, A; Vázquez, E.M; Zea-Bonilla, T. 1999. Estudio in vivo de *Trichoderma* como agente biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:261-265.
- Mahomed W., and van den Berg, N. 2011. EST sequencing and gene expression profiling of defence-related genes from *Persea americana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *BMC Plant Biology* 11:1-14.
- Mansilla Vásquez, J. P., Salinero Corral, M.C., y Pintos Varela, C. 1993. Aislamiento e identificación en la provincia de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* Rands como patógeno de viña. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* 19:541-549.

- Martin, F.N., and Tooley, P.W. 2004. Identification of *Phytophthora* isolates to species level using restriction fragment length polymorphism analysis of a polymerase chain reaction-amplified region of mitochondrial DNA. *Phytopathology* 94:983–991.
- Martínez, B., Pérez, J., Infante, D., Duarte, Y., Moreno, M. 2013. Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma spp.*, frente a *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. *Revista Protección Vegetal* 28:192-198.
- Matroudi, S., Zamani, M.R., y Motallebi, M. 2009. Antagonistic effects of three species of *Trichoderma sp.* on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. *Egyptian Journal of Biology* 11:37-44.
- McDonald, B. A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-379.
- McDonald, V., Pond E, Crowley, M., McKee, B., and Menge, J. 2007. Selection for and evaluation of an avocado orchard soil microbially suppressive to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Soil* 299:17–28.
- McLeod, A., Labuschagne, N., and Kotzé, J.M. 1995. Evaluation of *Trichoderma* for biological control of avocado root rot in bark medium artificially infested with *Phytophthora cinnamomi*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 18:32-37.
- Mir, G.H., Devi, L.S., Ahmad, S., Kumar, V.M., and Williams, P. 2011. Antagonistic potential of native isolates of *Trichoderma viride* on corn pathogen complex of saffron (*Crocus sativus*) in Kashmir. *Plant Pathology Journal* 10:73-78.
- Ochoa-Fuentes, Y.M., Martínez-de la Vega, O., Olalde-Portugal, V., Cerna-Chávez, E., Landeros-Flores, J., Hernández-Castillo, F.D., Flores-Olivas, A. 2007. Genetic Variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:161-166.

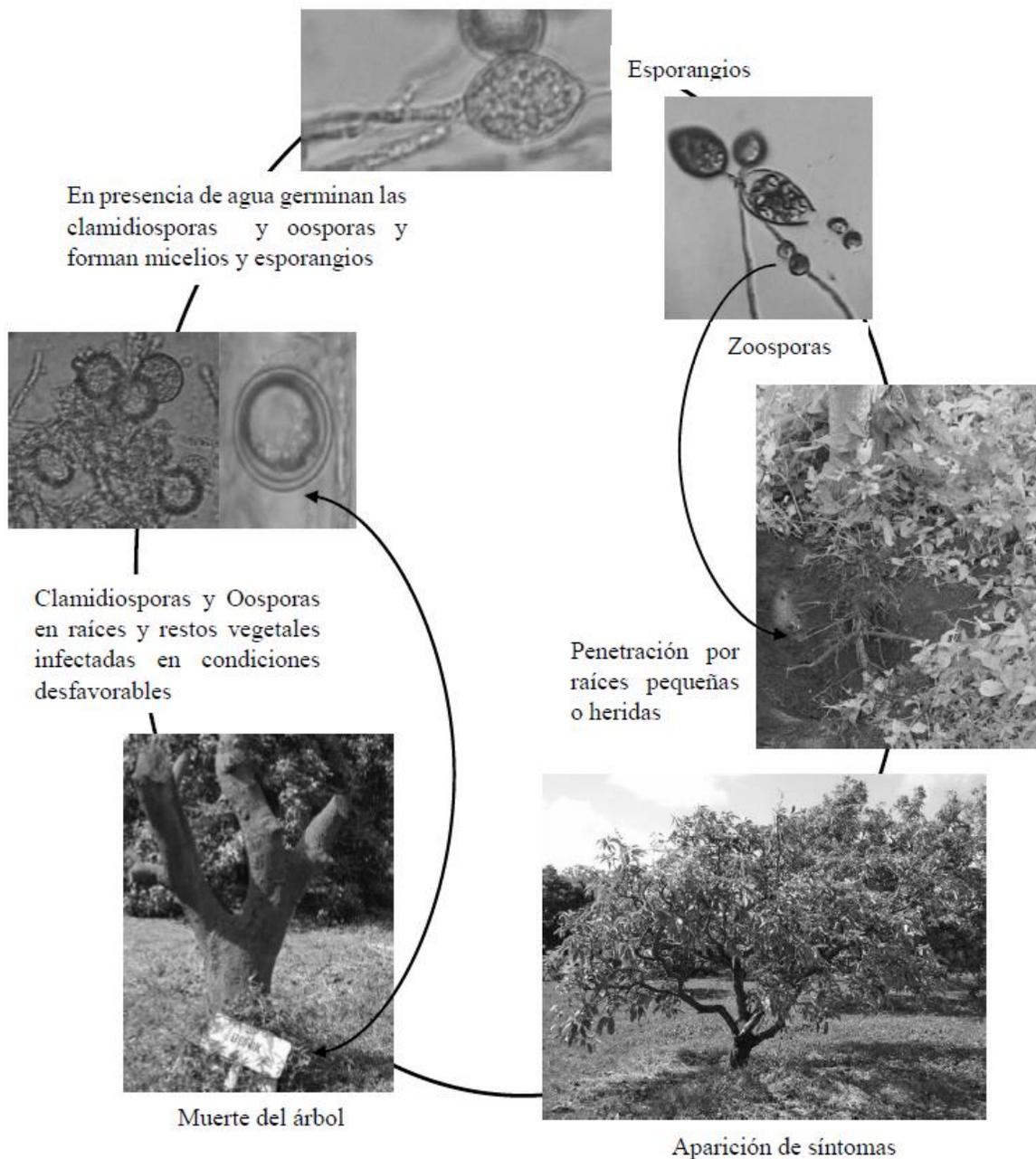
- Pagliaccia, D., Pond, E., McKee, B., and Douhan, G. W. 2013. Population genetic structure of *Phytophthora cinnamomi* associated with avocado in California and the discovery of a potentially recent introduction of a new clonal lineage. *Phytopathology* 103:91-97.
- Pavon, C.F., Babadoost, M., Lambert, K.N. 2008. Quantification of *Phytophthora capsici* oospores in soil by sieving-centrifugation and real-time polymerase chain reaction. *Plant Disease* 92:143–149.
- Pérez, R.M. 2008. Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2:1-24.
- Quinn, G. P., and Keough, M. J. 2009. *Experimental design and data analysis for biologists*. Eighth printing. New York, USA. Cambridge University Press, New York. 537 p.
- Ramírez-Gil, J.G., Castañeda-Sánchez, D.A., Morales-Osorio, J.G. 2014a. Alternativas microbiológicas para el manejo de *Phytophthora cinnamomi* Rands., en *Persea americana* Mill., bajo condiciones de casa-malla. *Cultivos Tropicales* 35:19-27
- Ramírez-Gil, J.G., Castañeda-Sánchez, D.A., Morales-Osorio, J.G. 2014b. Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres, Viçosa* 61:50-61.
- Ristaino, J.B. 2012. A Lucid Key to the common species of *Phytophthora*. *Plant Disease* 96:897-903.
- Rodríguez, F. 1982. *El aguacate*. AGT Editor, S.A. Mexico, D.F. Mexico. 167 p..
- Rodríguez-Molina, M.C., Santiago Merino, R., Blanco Santos, A., Pozo Quintanillas, J.D., Colino Nevado, M.I., Palo Núñez, E.J., Torres Vila, L.M. 2003. Detección de *Phytophthora cinnamomi* en dehesas de Extremadura afectadas por "seca" y su comportamiento in vitro. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 29:627-640.
- Schaffer, B., Wolstenholem, B.N., and Whiley, A.W. (eds). 2013. *The avocado: botany, production and uses*. Second Edition. Florida, USA. CABI Publishing, USA. 584 p.

- Schena, L., Hughes, K.J., and Cooke, D.E. 2006. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology* 7:365–379.
- Sepúlveda-Chavera, G., Salvatierra-Martínez, R., Bilbao-Apata, C., Sepúlveda-Ramírez, P., Allende-Castro, M., y Alache-González, J. 2013. Presence of *Phytophthora cinnamomi* Rands in avocado orchards in Azapa and Codpa valleys, Chile. *IDESIA* 31:41-47.
- Tamayo, P.J. 2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica* 4:52-71.
- Tooley, P.W., Martin, F.N., Carras, M.M., Frederick, R.D. 2006. Real-time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions. *Phytopathology* 96:336–345.
- Vidales-Fernández, J. A., Alcantar-Rocillo, J. J. 1999. Acción de la solarización y de la material orgánica en el control de la tristeza *Phytophthora cinnamomi* Rands del aguacate *Persea americana* L. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:255-259.
- Vitale, A., Aiello, D., Guarnaccia, V., Perrone, G., Stea, G., and Polizzi, G. 2012. First report of root rot caused by *Ilyonectria (Neonectria) macrodidyma* on avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology* 160:156-159.
- Waterhouse, G.M. 1970. The genus *Phytophthora de Bary*. *Mycological Paper No. 122*. 52 p.
- Widmer, T.L. 2014. Screening *Trichoderma* species for biological control activity against *Phytophthora ramorum* in soil. *Biological control* 79:43-48.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87:4576-4579.

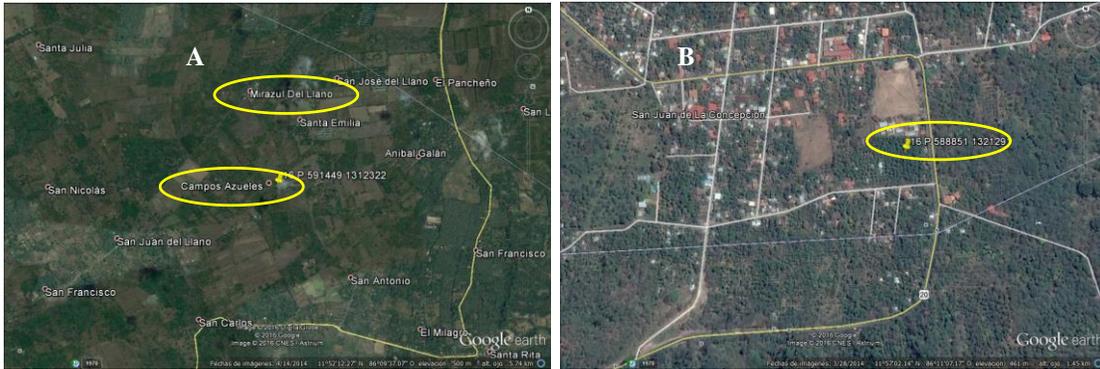
- Zentmyer, G. A. 1951. Avocado diseases in México and Costa Rica. California Avocado Society Yearbook 36:103-104.
- Zentmyer, G. A. 1976. Distribution of the A1 mating type of *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 66:701-703.
- Zentmyer, G. A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph No. 10. American Phytopathological Society. 96 p.
- Zentmyer, G. A. 1984. Avocado diseases. Tropical Pest Management 30:388-400.
- Zentmyer, G. A. 1988. Origin and distribution of four species of *Phytophthora*. Transactions of the British Mycological Society 91:367-378.
- Zhu, W., Yang, L-N, Wu, E-J., Qin, Ch-F., Shang, L-P., Zong-Hua Wang, Z-H., and Zhan, J. 2015. Limited sexual reproduction and quick turnover in the population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Fujian, China. Nature Scientific Reports 5:1-11.

## VIII. ANEXOS

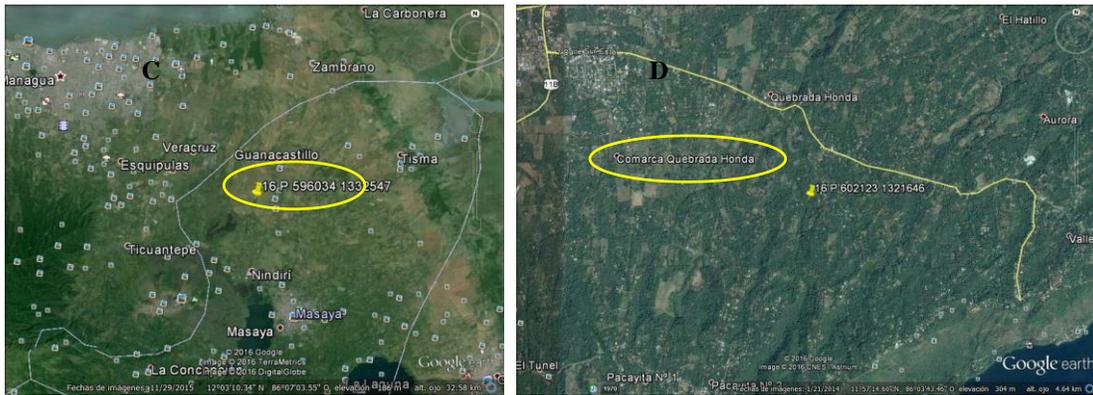
### Anexo 1. Ciclo biológico de *Phytophthora cinnamomi*.



Anexo 2. Mapas donde se muestran los sitios seleccionados para la toma de muestras.



En la Figura A se encuentran dos sitios: Campos Azules y Mirazul del Llano. En la Figura B están los sitios muestreados en el Municipio de la Concepción



En la Figura C se muestran los sitios muestreados en Los Altos de Nindirí y en la Figura D, los sitios en la Comarca Quebrada Honda.

Anexo 3. Tamaño del fragmento y tamaños de bandas en pares de bases (pb) derivados de la información de las secuencias de ADN producidos cuando usan cebadores para genes específicos de diferentes especies de *Phytophthora* después de la digestión de los fragmentos.

<i>Phytophthora</i> species	Accession number	PCR amplicon	<i>MspI</i> band sizes	<i>RsaI</i> band sizes	<i>TaqI</i> band sizes
<i>P. palmivora</i>	UQ1294	788	467, 321	359, 314, 105, 10	283, 235, 147, 59, 57, 7
<i>P. arecae</i>	UQ2820	788	467, 321	359, 314, 105, 10	283, 235, 147, 59, 57, 7
<i>P. megakarya</i>	UQ2822	791	464, 327	359, 278, 105, 31, 10	235, 193, 146, 88, 59, 57, 7
<i>P. nicotianae</i>	UQ848	804	349, 335, 120	373, 293, 105, 33	249, 193, 148, 90, 59, 58, 7
<i>P. parasitica</i>	UQ630	804	349, 335, 120	373, 293, 105, 33	249, 193, 148, 90, 58, 44, 15, 7
<i>P. boehmeria</i>	UQ4505	828	515, 313	351, 303, 174	256, 227, 197, 89, 59
<i>P. katsurae</i>	UQ4058	776	302, 254, 220	340, 181, 140, 105, 10	216, 150, 142, 89, 62, 59, 51, 7
<i>P. citrophthora</i>	UQ1320	781	301, 254, 226	339, 321, 111, 10	215, 199, 149, 90, 59, 32, 30, 7
<i>P. capsici</i>	UQ1529	752	281, 250, 221	318, 274, 105, 45, 10	194, 194, 149, 90, 60, 59, 7
<i>P. capsici</i>	UQ2819	752	250, 221, 204, 77	318, 274, 105, 45, 10	194, 149, 148, 90, 60, 59, 46, 7
<i>P. iranica</i>	UQ2132	793	323, 249, 221	361, 284, 105, 33, 10	439, 237, 59, 58
<i>P. mirabilis</i>	UQ1691	797	329, 247, 221	367, 282, 105, 33, 10	283, 243, 155, 59, 57
<i>P. infestans</i>	UQ2118	797	329, 247, 221	367, 282, 105, 33, 10	283, 243, 155, 59, 57
<i>P. vignae</i>	UQ136	827	368, 340, 119	378, 332, 107, 10	195, 195, 150, 90, 72, 59, 59, 7
<i>P. cinnamomi</i>	UQ733	828	339, 221, 146, 122	377, 170, 165, 106, 10	194, 181, 150, 90, 74, 60, 59, 12, 7
<i>P. cinnamomi</i>	UQ881	829	368 <sup>A</sup> , 339, 221, 147, 122	377, 171, 165, 106, 10	194, 181, 151, 90, 74, 60, 59, 12, 7
<i>P. fragariae</i>	UQ3668	832	340, 221, 146, 125	378, 170, 168, 106, 10	194, 194, 151, 90, 81, 60, 59, 3
<i>P. sojiae</i>	UQ336	828	341, 222, 146, 119	379, 332, 107, 10	195, 194, 150, 90, 72, 60, 59, 7
<i>P. cactorum</i>	UQ2620	794	326, 220, 140, 108	364, 282, 105, 33, 10	240, 193, 148, 89, 59, 58, 7
<i>P. syringae</i>	UQ2635	814	314, 222, 180, 98	352, 176, 149, 107, 20, 10	228, 195, 166, 90, 69, 59, 7
<i>P. citricola</i>	UQ2621	761	291, 220, 178, 72	329, 317, 105, 10	205, 193, 149, 90, 59, 58, 7
<i>P. clandestina</i>	UQ726	792	249, 221, 202, 120	360, 284, 105, 33, 10	432, 236, 59, 58, 7
<i>P. erythroseptica</i>	UQ1569	797	257, 145, 122, 100, 85, 52, 32, 4	351, 329, 107, 10	227, 195, 167, 90, 59, 59
<i>P. cryptogea</i>	UQ843	801	261, 145, 122, 100, 85, 52, 32, 4	354, 329, 107, 10	230, 195, 167, 90, 59, 59
<i>P. drechsleri</i>	UQ3041	799	262, 146, 122, 117, 100, 52	352, 330, 107, 10	228, 195, 167, 91, 59, 59
<i>P. medicaginis</i>	UQ125	795	257, 177, 122, 100, 84, 51, 4	350, 192, 136, 107, 10	226, 195, 167, 90, 59, 58
<i>P. gonapodyides</i>	UQ2823	819	334, 147, 125, 115, 98	372, 172, 158, 107, 10	150, 143, 143, 130, 118, 69, 59, 8
<i>P. megasperma</i>	UQ3043	814	334, 143, 125, 114, 98	372, 325, 107, 10	149, 143, 140, 130, 118, 67, 59, 8
<i>P. cambivora</i>	UQ2633	832	340 <sup>A</sup> , 294, 221, 146, 125, 46	378, 170, 168, 106, 10	194, 194, 151, 90, 84, 60, 59
<i>P. cambivora</i>	UQ2634	832	340 <sup>A</sup> , 294, 221, 146, 125, 46	378, 170, 168, 100, 10	194, 194, 151, 90, 76, 60, 59, 8
<i>P. trifolii</i>	UQ2143	795	277, 257, 122, 84, 51, 4	350, 328, 107, 10	226, 200, 167, 90, 58, 54

<sup>A</sup>Additional band within species due to the presence of different amplicons within one species.

Anexo 4. Crecimiento radial (en mm/h) de diferentes aislados de *P. cinnamomi* y *P. citrophthora* a través del período de incubación en que fueron mantenidos.

Aislados de <i>Phytophthora</i>	Tiempo de incubación (horas)				
	12	24	48	72	96
BGP04	13.50 c <sup>1</sup>	26.67 e	38.50 g	45.00 i	45.00 i
BGP07	13.00 c	25.33 e	35.50 f	45.00 i	45.00 i
BGP09	3.33 a	7.50 b	21.00 d	35.33 f	45.00 i
MLC04	13.17 c	25.5 e	35.83 f	45.00 i	45.00 i
MLL02	5.17 ab	12.67 c	35.33 f	42.00 h	45.00 i
MLL05	13.00 c	24.83 e	34.17 f	45.00 i	45.00 i

<sup>1</sup>Los valores de medias con una letra en común en una fila y/o columna no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Anexo 5. Análisis de varianza con medidas repetidas para el crecimiento radial de las cepas antagonistas de *Trichoderma*. (SAS versión 9.1).

a) Prueba de hipótesis de no efecto del tiempo

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.0001349	22229.2	4	12	<.0001
Pillai's Trace	0.9998651	22229.2	4	12	<.0001
Hotelling-Lawley Trace	7409.7384881	22229.2	4	12	<.0001
Roy's Greatest Root	7409.7384881	22229.2	4	12	<.0001

b) Prueba de hipótesis de no efecto de la interacción tiempo × cepa

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.36568553	1.24	12	32.041	0.3031
Pillai's Trace	0.68380796	1.03	12	42	0.4378
Hotelling-Lawley Trace	1.59927294	1.51	12	17.106	0.2126
Roy's Greatest Root	1.50966952	5.28	4	14	0.0083

c) Prueba de hipótesis de no efecto en la interacción tiempo × repetición

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.43220136	0.59	20	40.749	0.8997
Pillai's Trace	0.73461694	0.67	20	60	0.8344
Hotelling-Lawley Trace	0.96866425	0.54	20	19.869	0.9123
Roy's Greatest Root	0.48470098	1.45	5	15	0.2622

d) Prueba de hipótesis univariada de efectos entre efectos principales

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
cepa	3	11.04800000	3.68266667	2.71	0.0818
rep	5	8.59066667	1.71813333	1.27	0.3285
Error	15	20.34800000	1.35653333		

e) Prueba de hipótesis univariada de efectos dentro efectos principales

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	Adj Pr > F	
						G - G	H - F
time	4	21542.07617	5385.51904	19409.8	<.0001	<.0001	<.0001
time*cepa	12	4.07117	0.33926	1.22	0.2893	0.3112	0.2893
time*rep	20	4.99683	0.24984	0.90	0.5876	0.5614	0.5876
Error(time)	60	16.64783	0.27746				

Anexo 6. Análisis de varianza con medidas repetidas para el crecimiento radial del patógeno *Phytophthora cinnamomi*. (SAS versión 9.1).

The GLM Procedure  
Repeated Measures Analysis of Variance

a) Prueba de hipótesis de no efecto del tiempo sobre el crecimiento radial

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.0002407	22842.8	4	22	<.0001
Pillai's Trace	0.9997593	22842.8	4	22	<.0001
Hotelling-Lawley Trace	4153.2284156	22842.8	4	22	<.0001
Roy's Greatest Root	4153.2284156	22842.8	4	22	<.0001

b) Prueba de hipótesis de no efecto de la interacción tiempo × patógeno (Phytophthora)

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.00017799	46.22	20	73.916	<.0001
Pillai's Trace	2.50154409	8.35	20	100	<.0001
Hotelling-Lawley Trace	193.25131829	203.05	20	41.459	<.0001
Roy's Greatest Root	179.93087470	899.65	5	25	<.0001

c) Prueba de hipótesis de no efecto de la interacción tiempo × repetición

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.45084525	1.00	20	73.916	0.4689
Pillai's Trace	0.70200934	1.06	20	100	0.3984
Hotelling-Lawley Trace	0.91185435	0.96	20	41.459	0.5259
Roy's Greatest Root	0.42255657	2.11	5	25	0.0972

d) Prueba de hipótesis de efectos entre sujetos

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
phytoph	5	2880.844444	576.168889	459.38	<.0001
rep	5	10.111111	2.022222	1.61	0.1934
Error	25	31.355556	1.254222		

e) Prueba de hipótesis univariada para efectos dentro de sujetos

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	Adj G - G	Pr > F H - F
time	4	31895.81111	7973.95278	5506.45	<.0001	<.0001	<.0001
time*phytoph	20	1399.98889	69.99944	48.34	<.0001	<.0001	<.0001
time*rep	20	27.38889	1.36944	0.95	0.5327	0.4940	0.5121
Error(time)	100	144.81111	1.44811				

Anexo 7. Análisis de la varianza y prueba de separación de medias de Tukey del crecimiento radial de los aislados de *Phytophthora*.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
cr	180	0.99	0.99	3.93

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	36176.64	29	1247.47	875.76	<0.0001
tiempo	31895.81	4	7973.95	5597.94	<0.0001
phytoph	2880.84	5	576.17	404.49	<0.0001
tiempo*phytoph	1399.99	20	70.00	49.14	<0.0001
Error	213.67	150	1.42		
Total	36390.31	179			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.76876**

Error: 1.4244 gl: 150

tiempo Medias n E.E.

12.00	10.19	36	0.20	A
24.00	20.42	36	0.20	B
48.00	33.39	36	0.20	C
72.00	42.89	36	0.20	D
96.00	45.00	36	0.20	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.87988**

Error: 1.4244 gl: 150

phytoph Medias n E.E.

BGP09	22.43	30	0.22	A
MLL02	28.03	30	0.22	B
MLL05	32.40	30	0.22	C
BGP07	32.77	30	0.22	C
MLC04	32.90	30	0.22	C D
BGP04	33.73	30	0.22	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Anexo 8. Análisis de la varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) utilizando Tukey para la separación de medias.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PICR	144	0.98	0.97	5.91

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	19603.40	23	852.32	222.64	<0.0001
Cepa-Tr	58.70	3	19.57	5.11	0.0023
A-Phyt	19350.16	5	3870.03	1010.91	<0.0001
Cepa-Tr*A-Phyt	194.55	15	12.97	3.39	0.0001
Error	459.39	120	3.83		
Total	20062.79	143			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.20154**

Error: 3.8283 gl: 120

Cepa-Tr	Medias	n	E.E.	
UNA	32.16	36	0.33	A
MLL08	33.02	36	0.33	A B
BGP01	33.46	36	0.33	B
NG	33.88	36	0.33	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.63589**

Error: 3.8283 gl: 120

A-Phyt	Medias	n	E.E.	
BGP04	23.97	24	0.40	A
MLL05	25.45	24	0.40	A B
BGP07	25.55	24	0.40	A B
MLC04	25.74	24	0.40	B
MLL02	44.25	24	0.40	C
BGP09	53.81	24	0.40	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )