

TESIS DOCTORAL

“ESTUDIOS DE ETIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA Y
CONTROL DE UN NUEVO SÍNDROME DE
LESIONES EN TRONCO Y RAMAS
PRINCIPALES DE CÍTRICOS ASOCIADO A
Phytophthora”

Presentada por:

Luis Armando Alvarez Bernaola

Dirigida por:

José García Jiménez

María Paloma Abad Campos

Valencia, abril de 2008

*En realidad, todas las cosas, todos los acontecimientos,
para quien sabe leerlos con profundidad,
encierran un mensaje que, en definitiva, remite a Dios.*

Juan Pablo II

Pienso que estamos más cerca a la trascendencia en la vida cuando nos damos cuenta de que el esfuerzo valió la pena. Esta tesis lo valió y todo el tiempo que he dedicado en ella, porque me sirvió para entender que hay mucho de satisfacción en seguir los caminos de la curiosidad constructiva sin pensar en el resultado final de la misma. También sirvió para confrontar mis propias ideas con las de la vida, saber que los pinceles del creador están allí, donde menos te lo esperas.

Quiero dedicar esta tesis a mis padres, sé que será satisfactorio para ellos saber que he logrado uno de los principales objetivos en mi vida. Su incansable labor cotidiana y su total apoyo a mis decisiones y proyectos ha sido siempre para mí una fuente de inspiración; palabras para referirme a ellos y agradecerles por todo se quedan cortas.

Agradezco también la impaciencia justificada de mi madre y la de mis seres queridos por mi pronto retorno, ello me ha hecho entender que lo más valioso de la vida es la familia y lo que compartes con ella.

AGRADECIMIENTOS

He llegado al final de este largo e intenso camino que representó una vivencia llena de ilusiones, alegrías, a veces sin sabores; pero sobre todo, posibilidades de crecer, personal y profesionalmente. Esta vivencia ha provocado en mí una variedad de sentimientos que he podido compartir con personas muy valiosas para mí y a las que ha llegado el momento de expresarles la gratitud y estima.

Deseo comenzar expresando mi agradecimiento al Dr. José García Jiménez, director de esta tesis doctoral, por todo el apoyo y las facilidades que me ha brindado durante estos años y por todas las horas y el esfuerzo que ha dedicado en la corrección de este manuscrito. Considero por ello que él es el verdadero artífice de que haya podido lograr con éxito mi objetivo. Deseo resaltar en estas líneas la enorme influencia que ha tenido en mi formación académica, profesional y, sobre todo en la humana.

Quisiera también expresar mi agradecimiento a la Dra. Paloma Abad Campos, directora de esta tesis doctoral por la confianza que desde un principio depositó en mí, en mi trabajo y las facilidades y oportunidades brindadas para el desarrollo del mismo. Sus comentarios y apoyo a muchas de mis ideas han sido gratificantes y me han infundido aliento para profundizar en mi trabajo.

Quisiera también en estas líneas expresar mi agradecimiento al Dr. Josep Armengol por el apoyo brindado a mis diferentes actividades durante todo este tiempo. Su perseverancia en el trabajo, paciencia y razonamiento crítico me han servido de modelo en incontables oportunidades para encarar eventualidades.

Deseo expresar mi aprecio y agradecimiento a Antonio Vicent, amigo y compañero en esta etapa de formación. Deseo agradecerle por su activa e invaluable participación en todas las fases de esta tesis, por haberme introducido en este tema y haber creado las condiciones apropiadas para desarrollar mi labor. Su modo particular de concebir la fitopatología y su enorme capacidad de trabajo me han servido de inspiración para desarrollar mi potencial y mantener siempre el entusiasmo en las cosas que hacía.

Durante el tiempo que he estado en el Laboratorio de Patología Vegetal he tenido la oportunidad y el placer de compartir trabajo y experiencia con muchas personas; el haberlas conocido ha sido para mí una experiencia enriquecedora y fructífera que llevaré por siempre.

Quisiera destacar la labor de los ingenieros David García, Perfecto Sanz, Ana Fons, Inma Dicenta y David Gramaje, quienes a través de sus trabajos finales de carrera han intervenido en diferentes partes de esta tesis doctoral y a quienes agradezco profundamente por su esfuerzo, profesionalidad y dedicación. Quisiera agradecer a David Gramaje y a Maela León por su enorme apoyo en etapas fundamentales en el desarrollo de mis temas de investigación. A mis compañeros: Sandra Alaniz, Mónica Berbegal, Nelson Montaña y Ana Pérez, me une un sentimiento de amistad muy grande y a quienes admiro por su empeño y dedicación. Con Ana Pérez he pasado muchas horas de trabajo, en las cuales hemos compartido el mismo entusiasmo por nuestra labor. Su alegría y ganas de hacer las cosas han sido esenciales para motivarme y desarrollar valores de trabajo en conjunto.

Me gustaría también expresar mi agradecimiento a las personas y entidades que hicieron posible la ejecución de este trabajo. Deseo agradecer al Dr. Manuel Agustí Fonfría y a Amparo Martínez Fuentes del Laboratorio del Grupo de Citricultura y Fruticultura del Instituto Agroforestal Mediterráneo; a José María Soler de Bayer CropScience; a Fernando Alfaro y Francisco Cuenca del Servicio de Sanidad Vegetal de la Generalitat Valenciana, a Juan Bascón y Elena De la Roca del Servicio de Sanidad Vegetal de Huelva y a Carlos Zornoza de SAEAS Agraria SL, por el gran apoyo brindado en la ejecución material de este trabajo de investigación.

RESUMEN

Desde 2002 se ha detectado una enfermedad asociada a chancros en ramas de cítricos en las principales zonas citrícolas de España, afectando principalmente a clementinas y sus híbridos. A partir de una prospección de 132 parcelas se describió el síndrome y, a partir de los aislamientos realizados y ensayos de patogenicidad en invernadero y campo, se ha identificado a *Phytophthora citrophthora* como el agente causal de esta afección. Utilizando la técnica de los RAMS se encontró que la población de *P. citrophthora* estaba compuesta por 14 subgrupos. Alrededor del 90 % de los aislados estaba incluido en un único grupo poblacional y el 10 % restante en otros 13 grupos. No se ha encontrado evidencia de que esta variabilidad genética se deba a la reproducción sexual, pues ésta solo se encontró en un aislado de los 134 estudiados. Algunos aislados presentaron rangos elevados de insensibilidad a los fungicidas metalaxil y mefenoxam. En ensayos de inoculaciones de ramas en condiciones de campo llevados a cabo durante 27 meses se encontró que *P. citrophthora* fue más activa en los meses primaverales, seguida de las infecciones otoñales, estivales e invernales. Contrariamente, se concluyó que inoculaciones en varetas cortadas no representó una metodología fiable para la evaluación de la estacionalidad y agresividad de *P. citrophthora* y *P. parasitica*. Las regresiones efectuadas entre los promedios mensuales de área de lesión y las variables medioambientales y del hospedante indicaron que la temperatura y la humedad relativa medias de las máximas y el contenido relativo de agua de la corteza fueron los factores que más incidieron en el desarrollo de las lesiones. Se encontró evidencia de una diseminación vertical del patógeno desde el suelo hacia la copa de los árboles mediante el transporte por caracoles de la especie *Helix aspersa*, lo cual fue corroborado en experimentos bajo condiciones controladas. Este caracol fue capaz de transportar propágulos de *P. citrophthora* en su cuerpo y también en su tracto digestivo diseminando el inóculo del patógeno a través de las heces. En lo referente al control de la enfermedad se encontró que en árboles adultos y jóvenes en campo las aplicaciones curativas no resultaron efectivas. Aplicaciones preventivas vía pintado fueron más efectivas que las realizadas por aspersión foliar y éstas a su vez mejores que las aplicadas vía sistema de riego o inyección del producto al suelo. En plantas jóvenes en invernadero funcionaron mejor las aplicaciones foliares sin diferencias con las efectuadas vía pintado y por último las aplicaciones por riego. Tratamientos con dos aplicaciones distanciadas 20 ó 30 días no mejoraron significativamente la eficacia de los tratamientos comparada a una única aplicación.

RESUM

Des de l'any 2002 s'ha detectat una malaltia associada a xancre en branques de cítrics en les principals zones cítriques d'Espanya, afectant principalment clementines i els seus híbrids. A partir d'una prospecció de 132 parcel·les es va descriure la síndrome i, a partir dels aïllaments realitzats i assajos de patogenicitat en hivernacle i camp, s'ha identificat a *Phytophthora citrophthora* com l'agent causal d'esta afecció. Utilitzant la tècnica dels RAMS es va trobar que la població de *P. citrophthora* estava composta per 14 subgrups. Al voltant del 90 % dels aïllats estava inclòs en un únic grup poblacional i el 10 % restant en altres 13 grups. No s'ha trobat evidència que esta variabilitat genètica sigui deguda a la reproducció sexual, perquè esta només es va trobar en un aïllat dels 134 estudiats. Alguns aïllats van presentar rangs elevats d'insensibilitat als fungicides metalaxil i mefenoxam. En assajos d'inoculacions de branques en condicions de camp duts a terme durant 27 mesos es va trobar que *P. citrophthora* va ser més activa en els mesos primaverals, seguida de les infeccions tardorenques, estivals i hivernals. Contràriament, es va concloure que les inoculacions en varetes tallades no van representar una metodologia fiable per a l'avaluació de l'estacionalitat i agressivitat de *P. citrophthora* i *P. parasitica*. Les regressions efectuades entre les mitjanes mensuals d'àrea de lesió i les variables mediambientals i de l'hostatge van indicar que la temperatura i la HR mitjana de les màximes i el contingut relatiu d'aigua de la corfa van ser els factors que més van incidir en el desenvolupament de les lesions. Es va trobar evidència d'una disseminació vertical del patogen des del sòl cap a la copa dels arbres per mitjà del transport per caragols de l'espècie *Helix aspersa*, la qual cosa va ser corroborada en experiments baix condicions controlades. Aquest caragol va ser capaç de transportar propàguls de *P. citrophthora* en el seu cos i també en el seu tracte digestiu disseminant el inòcul del patogen a través dels excrements. Pel que fa al control de la malaltia, es va trobar que en arbres adults i joves en camp les aplicacions curatives no van resultar efectives. Aplicacions preventives via pintat van ser més efectives que les realitzades per aspersió foliar i estes també millors que les aplicades via sistema de reg o injecció del producte al sòl. En plantes joves en hivernacle, van funcionar millor les aplicacions foliars sense diferències amb les efectuades via pintat i finalment les aplicacions per reg. Tractaments amb dos aplicacions distanciades 20 o 30 dies no van millorar significativament l'eficàcia dels tractaments comparada a una única aplicació.

ABSTRACT

Since 2002 a disease associated to branch cankers in citrus trees has been detected in the major citrus-producing areas in Spain, affecting mainly Clementine mandarins and their hybrids. The syndrome was described and *Phytophthora citrophthora* was identified as the causal agent according to isolate frequencies from a 132 citrus orchards survey and pathogenicity tests under greenhouse and field conditions. Using RAMS markers to study the population structure of *P. citrophthora*, 14 population groups were found. Around 90 % of the isolates comprising a unique population group and the remaining 10 % were divided in 13 dissimilar groups. No evidence demonstrated that this population diversity was a consequence of sexual crosses because more than 99 % of the studied isolates were sexually sterile. Some isolates also displayed high levels of insensitivity to the fungicides metalaxyl and mefenoxam. Assays of branch inoculations under field conditions carried out during a period of 27-months showed that *P. citrophthora* was more active in the spring months, followed by autumn, summer and winter months. Conversely, it was concluded that inoculations on detached branches it was not a valuable methodology to determine the seasonality of the different citrus scions and the aggressiveness of *P. citrophthora* y *P. parasitica*. Regression analyses between environmental and host-linked variables showed that the monthly mean maximum temperature, the relative humidity and the relative water content in the bark were the most important factors associated with the lesion development. Evidences were found about a vertical dissemination of the pathogen from the soil toward the upper canopy by mean of snails of the species *Helix aspersa* that was corroborated in experiments under controlled conditions. *H. aspersa* was able to transport propagules of *P. citrophthora* in its body and also in its digestive tract disseminating pathogen inoculum through the feces. In reference to the disease control, it was found that in young and mature citrus trees under field conditions, post - infection applications were not effective. However, preventive treatments based on branch or trunk paints were more effective than applications as foliar spray, chemigation or injection to the soil. In young trees, the foliar sprays showed a good behaviour in greenhouse and no significant differences were found with treatments based on paint; however, drench applications showed a limited activity. Treatments that consisted of two consecutive applications (20 to 30 days between them) did not improve significantly the efficacy of the products compared with one application.

ÍNDICE GENERAL

Página

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Importancia del cultivo de los cítricos	3
1.2. Características generales del género <i>Phytophthora</i>	4
1.2.1. Ubicación taxonómica	4
1.2.2. Crecimiento miceliar	5
1.2.3. Reproducción	6
1.3. Enfermedades causadas por especies de <i>Phytophthora</i> en cítricos	8
1.3.1. Damping off	9
1.3.2. Podredumbre de las raíces absorbentes	9
1.3.3. Podredumbre de la corona y de las raíces estructurales	10
1.3.4. Gomosis o podredumbre del pie	10
1.3.5. Podredumbre marrón de los frutos o “aguado”	10
1.3.6. Ataques de <i>Phytophthora</i> a la parte vegetativa aérea de los árboles	11
1.4. Variabilidad patogénica de especies de <i>Phytophthora</i>	12
1.5. Fluctuación estacional de la susceptibilidad de plantas leñosas a <i>Phytophthora</i> spp.	13
1.6. Ecología de especies de <i>Phytophthora</i> en cítricos	15
1.7. Epidemiología	16
1.7.1. Mecanismos de dispersión de especies de <i>Phytophthora</i>	16
1.7.2. Influencia de los moluscos e insectos en la transmisión de <i>Phytophthora</i> spp.	18
1.7.3. Ciclo biológico y proceso infectivo de <i>Phytophthora</i> spp. en cítricos	18
1.8. Medidas de control frente a <i>Phytophthora</i> en cítricos	20
1.8.1. Control genético	20
1.8.2. Control mediante prácticas culturales	21
1.8.3. Control químico	22
1.9. OBJETIVOS	25

APARTADO I: ETIOLOGÍA

CAPÍTULO 2: PROSPECCIÓN DE LA ENFERMEDAD, TIPIFICACIÓN DEL SÍNDROME E IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL

2.1. INTRODUCCIÓN	29
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.2.1. Prospección de la enfermedad en diversas zonas citricolas españolas	30
2.2.2. Aislamiento de <i>Phytophthora</i> de árboles infectados y del suelo	30
2.2.3. Conservación de aislados	31
2.2.4. Identificación de los aislados de <i>Phytophthora</i>	31
2.2.5. Ensayos de patogenicidad	32
2.3. RESULTADOS	37
2.3.1. Síntomas de la enfermedad y cultivares afectados	37
2.3.2. Identificación de especies de <i>Phytophthora</i> en árboles afectados	42
2.3.3. Frecuencia de aislamiento de especies de <i>Phytophthora</i> en árboles afectados	43
2.3.4. Frecuencia de aislamiento de especies de <i>Phytophthora</i> en suelo de parcelas afectadas	43
2.3.5. Ensayos de patogenicidad	45
2.4. DISCUSIÓN	51

CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN ESPAÑOLA DE *Phytophthora citrophthora* EN CÍTRICOS

3.1. INTRODUCCIÓN	59
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.2.1. Estudio de la variabilidad fenotípica (morfológica y fisiológica) de aislados de <i>Phytophthora</i> en cítricos	61
3.2.2. Estudio de la variabilidad genotípica de aislados de <i>Phytophthora</i> en cítricos	67
3.2.3. Variabilidad patogénica de aislados representativos de las poblaciones de <i>P. citrophthora</i> ..	70
3.3. RESULTADOS	72
3.3.1. Estudio de la variabilidad fenotípica (morfológica y fisiológica) de aislados de <i>Phytophthora</i> en cítricos	72
3.3.2. Estudio de la variabilidad genotípica de aislados de <i>Phytophthora</i> de cítricos	83
3.3.3. Variabilidad patogénica de aislados representativos de las poblaciones de <i>P. citrophthora</i> ..	99
3.4. DISCUSIÓN	105

APARTADO II: EPIDEMIOLOGÍA

CAPÍTULO 4: DESARROLLO ESTACIONAL DE LESIONES E INFLUENCIA DE FACTORES MEDIOAMBIENTALES Y DEL HOSPEDANTE EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE CULTIVARES DE CITRICOS A INFECCIONES POR ESPECIES DE *Phytophthora*

4.1. INTRODUCCIÓN	117
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	118
4.2.1. Localización del experimento	118
4.2.2. Aislados	118
4.2.3. Registro de las variables medioambientales en campo	118
4.2.4. Ensayo de campo	119
4.2.5. Ensayo de laboratorio	119
4.2.6. Determinación del contenido relativo de agua en la corteza	120
4.2.7. Análisis estadístico	120
4.3. RESULTADOS	121
4.3.1. Fluctuación estacional de la susceptibilidad de los cítricos a especies de <i>Phytophthora</i>	121
4.3.2. Influencia de los factores ambientales en la susceptibilidad de los cítricos a <i>P. citrophthora</i> y <i>P. parasitica</i>	128
4.3.3. Influencia de algunos componentes del hospedante en la susceptibilidad de los cítricos a <i>P. citrophthora</i> y <i>P. parasitica</i>	137
4.4. DISCUSIÓN	143

CAPÍTULO 5: ESTUDIO DE LA DISPERSIÓN DE *Phytophthora* spp. POR VECTORES INVERTEBRADOS

5.1. INTRODUCCIÓN	153
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	154
5.2.1. Prospección de parcelas	154
5.2.2. Influencia de las hormigas en el transporte de inóculo de <i>P. citrophthora</i>	154
5.2.3. Influencia de los caracoles en el transporte de inóculo de <i>P. citrophthora</i>	155
5.3. RESULTADOS	159
5.3.1. Influencia de las hormigas en el transporte de inóculo de <i>P. citrophthora</i>	159
5.3.2. Influencia de los caracoles en el transporte de inóculo de <i>P. citrophthora</i>	160
5.4. DISCUSIÓN	165

APARTADO III: CONTROL

CAPÍTULO 6: EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE FUNGICIDAS SISTÉMICOS EN EL CONTROL DE *Phytophthora citrophthora* A RAMAS DE CÍTRICOS

6.1. INTRODUCCIÓN	171
6.2. Eficacia preventiva de fungicidas en condiciones de invernadero (Ensayo 1)	172
6.2.1. Introducción	172
6.2.2. Materiales y métodos	172
6.2.3. Resultados	174
6.3. Eficacia de fungicidas en aplicaciones preventivas y curativas en campo (Ensayo 2)	178
6.3.1. Introducción	178
6.3.2. Materiales y métodos	178
6.3.3. Resultados	185
6.4. Eficacia de fungicidas en aplicaciones preventivas en condiciones en campo (Ensayo 3)	193
6.4.1. Introducción	193
6.4.2. Materiales y métodos	193
6.4.3. Resultados	196
6.5. Eficacia de fungicidas en aplicaciones preventivas en condiciones de campo (Ensayo 4)	199
6.5.1. Introducción	199
6.5.2. Materiales y métodos	199
6.5.3. Resultados	202
6.6. DISCUSIÓN	204

CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN GENERAL	211
-------------------------------------	-----

CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES	217
--------------------------------	-----

LITERATURA CITADA	221
-------------------------	-----

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Ciclo de <i>Phytophthora</i> spp. en cítricos (Graham y Menge, 1999)	19
Figura 2.1. Inoculación de plántones de cítricos en invernadero con <i>P. citrophthora</i> (Ensayo 2)	35
Figura 2.2. Evaluación del área de la lesión	35
Figura 2.3. Sintomatología de la enfermedad en campo	38, 39
Figura 2.4. Distribución porcentual de grupos de cultivares de cítricos afectados por el síndrome de chancro en ramas y tronco	40
Figura 2.5. Distribución porcentual de cultivares de mandarina clementina y sus híbridos afectados por el síndrome de chancro en ramas y tronco	40
Figura 2.6. Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 2)	50
Figura 3.1. Patrones de crecimiento en medio PDA de aislados de <i>P. citrophthora</i> de cítricos	77
Figura 3.2. Patrones de crecimiento en medio PDA de aislados de <i>P. parasitica</i> de cítricos	78
Figura 3.3. Representación de los parámetros en función de los factores estudiados	82
Figura 3.4. Representación de los aislados en función de los dos factores estudiados	82
Figura 3.5. Productos de amplificación obtenidos con el iniciador GT para las especies de <i>Phytophthora</i> con la técnica de los RAMS	93
Figura 3.6. Productos de amplificación obtenidos con el iniciador CGA para la especie <i>P. citrophthora</i> con la técnica RAMS de aislados representativos de cada patrón	93
Figura 3.7. Dendrograma de aislados de <i>P. citrophthora</i> generado en base a RAMS – CGA	95
Figura 3.8. Productos de amplificación obtenidos con el iniciador CGA para la especie <i>P. parasitica</i> con la técnica RAMS de los aislados representativos de cada patrón	96
Figura 3.9. Dendrograma de aislados de especies de <i>Phytophthora</i> generado en base a RAMS – CGA ..	
Figura 4.1. Evolución mensual del tamaño de las lesiones (cm ²) en tres variedades de cítricos inoculadas en campo con dos especies de <i>Phytophthora</i>	122
Figura 4.2. Evolución mensual del tamaño de las lesiones (cm ²) en tres variedades de cítricos inoculadas en laboratorio con dos especies de <i>Phytophthora</i>	127
Figura 4.3. Fluctuación en los valores de los promedios del área de lesión en ensayos de campo en cultivares de cítricos inoculados con especies de <i>Phytophthora</i> y su relación con los factores medioambientales	130
Figura 4.4. Relación entre el promedio de temperaturas máximas mensuales (°C) y el área promedio de lesión mensual (cm ²) de los distintos cultivares en los intervalos de octubre a mayo de cada año en inoculaciones con <i>P. citrophthora</i>	134
Figura 4.5. Relación entre la temperatura máxima mensual y el área promedio de área de lesión mensual de tres cultivares de cítricos en 27 meses de inoculaciones con <i>P. parasitica</i>	136
Figura 4.6. Fluctuación en los promedios del área de lesión de cultivares de cítricos inoculados con <i>P. citrophthora</i> y <i>P. parasitica</i> en campo, y su relación con el contenido relativo de agua de estos cultivares	139
Figura 4.7. Relación entre el contenido relativo de agua de la corteza de tres cultivares de cítricos y el área promedio de área de lesión mensual en inoculaciones con <i>P. citrophthora</i>	141
Figura 4.8. Relación entre el contenido relativo de agua de la corteza de tres cultivares de cítricos y el área promedio de área de lesión mensual en inoculaciones con <i>P. parasitica</i>	142
Figura 5.1. Colección de caracoles de parcelas de cítricos	155
Figura 5.2. Especies de caracoles colectadas y proceso de infección de varetas de cítricos	157
Figura 5.3. Aislamiento de <i>Pythium</i> spp. a partir del cuerpo de las hormigas en medio selectivo	159
Figura 5.4. Aislamiento de oomicetos del cuerpo de los caracoles	160
Figura 5.5. Colonias de <i>P. citrophthora</i> desarrolladas a partir de excrementos de caracol en medio PARBPH	161
Figura 5.6. Manifestación de síntomas de infección por <i>P. citrophthora</i> transportada por caracoles en plantas de mandarina Fortune	162
Figura 5.7. Lesiones en ramas y gomosis ocasionada por <i>P. citrophthora</i> en el tercio superior de árboles de la variedad Fortune en ensayos en invernadero con caracoles	163
Figura 6.1. Esquema del ensayo de invernadero a plántones de cítricos	174
Figura 6.2. Porcentajes de control de los diferentes tratamientos en el ensayo de invernadero	176
Figura 6.3. Resultados de evaluaciones en invernadero de la relación entre aislado y tratamiento	177
Figura 6.4. Aplicación de fungicidas a árboles cítricos en campo	179
Figura 6.5. Esquema del ensayo de estrategias preventivas en campo (Ensayo 2004)	180
Figura 6.6. Esquema del ensayo de estrategias curativas en campo (Ensayo 2004)	181
Figura 6.7. Proceso de inoculación de ramas en campo	182
Figura 6.8. Proceso de extracción de estrías	183
Figura 6.9. Condiciones ambientales registradas durante el ensayo en Valencia	184

Figura 6.10. Estrategias preventivas. Porcentajes de control en el ensayo de inoculación en ramas en la parcela de Valencia	186
Figura 6.11. Estrategias preventivas. Porcentajes de control en el ensayo de inoculación en ramas en la parcela de Castellón	188
Figura 6.12. Fluctuación en la longitud promedio de las lesiones en ambas parcelas	190
Figura 6.13. Estrategias curativas. Porcentajes de control en el ensayo de inoculación de ramas en la parcela de Valencia	191
Figura 6.14. Estrategias curativas. Porcentajes de control en el ensayo de inoculación de ramas en la parcela de Castellón	193
Figura 6.15. Esquema del ensayo de estrategias preventivas en campo (Ensayo 2005)	195
Figura 6.16. Porcentajes de control según los tratamientos. Análisis 1, Montserrat 2005	197
Figura 6.17. Porcentajes de control según los tratamientos. Análisis 2, Montserrat 2005	199
Figura 6.18. Croquis de una parcela elemental	200
Figura 6.19. Porcentajes de control según tratamientos. Benifaio, 2006	203

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1.1. Producción mundial de cítricos en el año 2005 (FAO, 2006)	3
Tabla 1.2. Especies de <i>Phytophthora</i> patógenas de cítricos (Erwin y Ribeiro, 1996)	9
Tabla 1.3. Mecanismos potenciales de dispersión de especies de <i>Phytophthora</i> en campo y efectos de los mecanismos de dispersión sobre los componentes del desarrollo epidémico	17
Tabla 2.1. Lugares de colección y categorización de los chancros de acuerdo a su origen en el árbol	40
Tabla 2.2. Lugares de colección y cultivares de cítricos afectados por el síndrome de chancros en ramas y tronco	41
Tabla 2.3. Lugares de colección, especies de <i>Phytophthora</i> aisladas, y categorización de los chancros de acuerdo a su origen en el árbol	44
Tabla 2.4. Especies de <i>Phytophthora</i> aisladas de suelo de parcelas de cítricos	45
Tabla 2.5. Patogenicidad de aislados de <i>P. citrophthora</i> de diversos orígenes geográficos en frutos de naranja cv. Valencia Late inoculadas sin herida	46
Tabla 2.6. Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 1). Longitud media (cm) de las lesiones ocasionadas por aislados de <i>P. citrophthora</i> sobre diversos cultivares de cítricos	47
Tabla 2.7. Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 1). Susceptibilidad de cultivares frente al conjunto de aislados de <i>P. citrophthora</i> inoculados	48
Tabla 2.8. Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 1). Agresividad media de aislados de <i>P. citrophthora</i> sobre el conjunto de cultivares de cítricos estudiados	49
Tabla 2.9. Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 2): Susceptibilidad de patrones y variedades frente a aislados de <i>P. citrophthora</i>	50
Tabla 2.10. Ensayo de patogenicidad de árboles en campo: Susceptibilidad de Clementina var. Hernandina frente a dos aislados de <i>P. citrophthora</i>	51
Tabla 3.1. Aislados de especies de <i>Phytophthora</i> de cítricos en colección	62
Tabla 3.2. Aislados de referencia de especies de <i>Phytophthora</i> en colección	65
Tabla 3.3. Codificación de variables utilizada para el análisis estadístico	68
Tabla 3.4. Cebadores y sus secuencias utilizados en el análisis RAMS (Cohen <i>et al.</i> , 2003)	69
Tabla 3.5. Parcelas utilizadas en el ensayo de inoculación de genotipos de <i>P. citrophthora</i> . Primavera – verano de 2005	71
Tabla 3.6. Características de las estructuras de aislados de <i>Phytophthora</i> en estudio	73
Tabla 3.7. Cuadro resumen del diámetro de crecimiento semanal a diferentes temperaturas de aislados de <i>Phytophthora</i>	75
Tabla 3.8. Patrones de crecimiento y márgenes de colonia de aislados de <i>Phytophthora</i> utilizados en el estudio	79
Tabla 3.9. Valores propios y variabilidad explicada por cada uno de los factores obtenidos en el estudio	81
Tabla 3.10. Descripción de los factores analizados en el estudio estadístico	81
Tabla 3.11. Sensibilidad al metalaxil de aislados de <i>P. citrophthora</i> de cítricos	84
Tabla 3.12. Sensibilidad al mfenoxam de aislados de <i>P. citrophthora</i> de cítricos	86
Tabla 3.13. Valores de la concentración efectiva media (CE ₅₀) del metalaxil respecto a los aislados españoles de <i>P. citrophthora</i>	88
Tabla 3.14. Valores de la concentración efectiva media (CE ₅₀) del mfenoxam respecto a los aislados españoles de <i>P. citrophthora</i>	89
Tabla 3.15. Origen geográfico de aislados de <i>P. citrophthora</i> de cítricos con sensibilidad intermedia (I) o resistencia (R) al metalaxil y mfenoxam	90
Tabla 3.16. Sensibilidad al metalaxil y mfenoxam de aislados de <i>P. parasitica</i> de cítricos	91
Tabla 3.17. Valor de la concentración efectiva media (CE ₅₀) del metalaxil respecto a los aislados españoles de <i>P. parasitica</i>	91
Tabla 3.18. Valor de la concentración efectiva media (CE ₅₀) del mfenoxam respecto a los aislados españoles de <i>P. parasitica</i>	92
Tabla 3.19. Distribución de marcadores RAMS entre 132 aislados españoles de <i>P. citrophthora</i> de cítricos	94
Tabla 3.20. Distribución de marcadores RAMS entre 30 aislados españoles de <i>P. parasitica</i> de cítricos	96
Tabla 3.21. Características genotípicas de aislados de <i>P. citrophthora</i> y <i>P. parasitica</i>	97
Tabla 3.22. Análisis de regresión múltiple de la influencia de los factores genéticos del hospedante, del patógeno y de la localización de la parcela sobre el área de lesión en ramas de variedades de cítricos inoculadas con aislados de <i>P. citrophthora</i>	100

Tabla 3.23. Análisis de regresión múltiple de la influencia del cultivar de cítrico inoculado con <i>P. citrophthora</i> sobre el área de lesión en la zona de la variedad	100
Tabla 3.24. Análisis de regresión múltiple de la influencia del grupo de especies de cítricos inoculado con <i>P. citrophthora</i> sobre el área de lesión en la zona de la variedad	100
Tabla 3.25. Análisis de regresión múltiple de la influencia del patrón de cítricos inoculado con <i>P. citrophthora</i> sobre el área de lesión en la zona de la variedad	100
Tabla 3.26. Análisis de regresión múltiple de la influencia de la parcela de ensayo sobre el área de lesión ocasionada por <i>P. citrophthora</i> en la zona de la variedad	101
Tabla 3.27. Análisis de regresión múltiple de la influencia de la zona de ubicación de las parcelas de estudio sobre el área de lesión ocasionada por <i>P. citrophthora</i> en la zona de la variedad	101
Tabla 3.28. Análisis de regresión múltiple de la influencia del aislado de <i>P. citrophthora</i> utilizado sobre el área de lesión en la zona de la variedad	101
Tabla 3.29. Análisis de regresión múltiple de la influencia del grupo poblacional de aislados de <i>P. citrophthora</i> sobre el área de lesión en la zona de la variedad	101
Tabla 3.30. Análisis de regresión múltiple de la influencia de los factores genéticos del hospedante, del patógeno y de la localización de la parcela en relación al área de lesión en patrones de cítricos inoculadas con aislados de <i>P. citrophthora</i>	102
Tabla 3.31. Análisis de regresión múltiple de la influencia del cultivar de cítrico inoculado con <i>P. citrophthora</i> sobre el área de lesión en el patrón	103
Tabla 3.32. Análisis de regresión múltiple de la influencia del grupo de especies de cítricos inoculados con <i>P. citrophthora</i> sobre el área de lesión en el patrón	103
Tabla 3.33. Análisis de regresión múltiple de la influencia del patrón de cítricos inoculado sobre el área de lesión ocasionada por <i>P. citrophthora</i>	103
Tabla 3.34. Análisis de regresión múltiple de la influencia de la parcela de ensayo sobre el área de lesión en el patrón ocasionada por <i>P. citrophthora</i>	103
Tabla 3.35. Análisis de regresión múltiple de la zona de ubicación de las parcelas sobre el área de lesión sobre el patrón ocasionada por <i>P. citrophthora</i>	104
Tabla 3.36. Análisis de regresión múltiple del efecto del aislado utilizado sobre el área de lesión en el patrón ocasionada por <i>P. citrophthora</i>	104
Tabla 3.37. Análisis de regresión múltiple del efecto de la agresividad del grupo poblacional de aislados de <i>P. citrophthora</i> sobre el área de lesión en el patrón	104
Tabla 4.1. Promedios mensuales de área de lesión causada por especies de <i>Phytophthora</i> en cultivares de cítricos en ensayos de inoculaciones en campo	123
Tabla 4.2. Promedios estacionales de área de lesión causada por especies de <i>Phytophthora</i> en cultivares de cítricos en ensayos de inoculaciones en campo	125
Tabla 4.3. Promedios estacionales acumulados de área de lesión causada por especies de <i>Phytophthora</i> en cultivares de cítricos en inoculaciones de ramas <i>in vitro</i>	128
Tabla 4.4. Valores promedios mensuales de algunos factores ambientales registrados durante el estudio	129
Tabla 4.5. Significancia de la regresión múltiple de la relación entre variables meteorológicas y el área de lesión en ramas de variedades de cítricos inoculadas con <i>P. citrophthora</i> en 27 meses de inoculaciones	131
Tabla 4.6. Significancia de la regresión simple de la relación entre variables meteorológicas y el área de lesión en ramas de variedades de cítricos inoculadas con <i>P. citrophthora</i> en los intervalos de octubre a mayo de 2004 a 2005 y de septiembre a mayo de 2005 a 2006 ...	132
Tabla 4.7. Datos de regresión simple para la relación entre la temperatura (x) y área de lesión (y) de ramas en variedades de cítricos inoculadas con <i>P. citrophthora</i> en los intervalos de octubre a mayo de 2004 a 2005 y de 2005 a 2006	134
Tabla 4.8. Significancia de la regresión múltiple entre variables meteorológicas y el área de lesión en ramas de variedades de cítricos inoculadas con <i>P. parasitica</i> en 27 meses de inoculaciones	135
Tabla 4.9. Significancia de la regresión simple entre algunas variables meteorológicas y el área de lesión en ramas de variedades de cítricos inoculadas con <i>P. parasitica</i>	135
Tabla 4.10. Datos de regresión para la relación entre variables meteorológicas (x) y área de lesión (y) de ramas en variedades de cítricos inoculadas con <i>P. parasitica</i> en 27 meses de inoculaciones	136
Tabla 4.11. Valores promedios mensuales del contenido relativo de agua en cultivares de cítricos ..	138
Tabla 4.12. Análisis de regresión simple entre el contenido relativo de agua (CRA) y el área de lesión por <i>P. citrophthora</i> y <i>P. parasitica</i> en campo en 27 meses de inoculaciones	140

Tabla 4.13. Análisis de regresión simple del efecto del contenido relativo de agua (CRA) de los cultivares de cítricos en estudio y el área de lesión causadas por <i>P. citrophthora</i> y <i>P. parasitica</i> en laboratorio en 27 meses de inoculaciones	140
Tabla 4.14. Datos de regresión simple para la relación entre el contenido relativo de agua (x) y área de lesión (y) de ramas en variedades de cítricos inoculadas con <i>P. citrophthora</i> en los intervalos de octubre a mayo de 2004 a 2005 y de 2005 a 2006	141
Tabla 4.15. Datos de regresión para la relación entre el contenido relativo de agua (x) y el área de lesión (y) en ramas en variedades de cítricos inoculadas con <i>P. parasitica</i> en periodos anuales de octubre – septiembre	142
Tabla 5.1. Parcelas visitadas para la colección de caracoles y hormigas. Primavera – otoño, 2005 .	154
Tabla 5.2. Parcelas de cítricos de las cuales se aislaron especies de oomicetos a partir de caracoles y hormigas	159
Tabla 5.3. Incidencia de lesiones ocasionadas por <i>P. citrophthora</i> en el ensayo de liberación de caracoles sobre diversos cultivares de cítricos	163
Tabla 5.4. Incidencia de lesiones ocasionadas por <i>P. palmivora</i> en el ensayo de liberación de caracoles sobre diversos cultivares de cítricos	164
Tabla 6.1. Ensayo 1 (Invernadero): Productos y dosis empleadas	173
Tabla 6.2. Efecto residual de tratamientos fungicidas en árboles de 2 años de edad de la var. Fortune, inoculados con dos aislados de <i>P. citrophthora</i> bajo condiciones de invernadero	175
Tabla 6.3. Ensayo 2 (Campo): Productos y dosis empleadas	178
Tabla 6.4. Ensayo 2: Evaluación del control en estrategias preventivas. Ensayo de inoculación de ramas en la parcela de Valencia	186
Tabla 6.5. Ensayo 2: Evaluación del control en estrategias preventivas. Ensayo de inoculación de ramas en la parcela de Castellón	187
Tabla 6.6. Ensayo 2: Estrategias preventivas. Longitud de lesión en estrías inoculadas en la parcela de Valencia	189
Tabla 6.7. Ensayo 2: Estrategias preventivas. Longitud de lesión en estrías inoculadas en la parcela de Castellón	189
Tabla 6.8. Ensayo 2: Evaluación del control en estrategias curativas. Ensayo de inoculación de ramas en la parcela de Valencia	191
Tabla 6.9. Ensayo 2: Evaluación del control en estrategias curativas. Ensayo de inoculación de ramas en la parcela de de Castellón	192
Tabla 6.10. Ensayo 3 (campo): Productos y dosis empleadas	194
Tabla 6.11. Ensayo 3 (campo): Intervalos de aplicación de las distintas materias activas	196
Tabla 6.12. Ensayo 3: Porcentaje de control según tratamiento	197
Tabla 6.13. Ensayo 3: Porcentajes de control según los tratamientos	198
Tabla 6.14. Ensayo 4 (campo). Productos y dosis empleadas	201
Tabla 6.15. Ensayo 4. Porcentaje de control según tratamiento. Parcela Benifaio 2006	203

Capítulo 1

Introducción y objetivos

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CÍTRICOS

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. Son árboles de hoja perenne cuyo cultivo se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales comprendidas entre los paralelos 44° N y 41° S (Agustí, 2000).

El factor limitante más importante para estos árboles es la temperatura mínima, ya que no toleran las inferiores a -3 °C (a 3 - 5 °C bajo cero la planta muere). En cuanto a las necesidades hídricas, los cítricos requieren entre 7500 y 12000 m³ ha⁻¹ año⁻¹ y necesitan un medio húmedo tanto en el suelo como en la atmósfera. Son plantas ávidas de luz para los procesos de floración y fructificación y muy sensibles al viento. Necesitan suelos permeables y poco calizos y se recomienda que sean profundos para garantizar el anclaje del árbol, una amplia exploración para una buena nutrición y un crecimiento adecuado. No toleran la salinidad y son sensibles a la asfixia radicular.

Los cítricos se cultivan por sus frutos, que se consumen preferentemente en fresco, aunque también se comercializan como IV Gama y en forma de zumo (concentrado, fresco, pasteurizado, etc.), mermeladas o jaleas. En la actualidad son los frutos de mayor producción en el mundo (Agustí, 2000). Durante los últimos 20 años, la producción se ha incrementado en un 50%, sobrepasando hoy en día los 108 millones de toneladas. En la **Tabla 1.1** aparecen los datos de la producción mundial de cítricos del año 2005 para los principales países productores (FAO, 2006). Los principales países productores del mundo son Brasil, Estados Unidos y China. En la cuenca mediterránea, España es el principal país productor con 6 206 800 t, que ocupan una superficie de 305 808 ha. (FAO, 2005).

Tabla 1.1. Producción mundial de cítricos en el año 2005 (FAO, 2006).

Principales países productores de cítricos	Producción año 2005 (t)
Brasil	20 594 000
Estados Unidos	14 907 660
China	14 654 875
México	6 475 411
España	6 206 800
India	4 750 000
Rep. Islámica de Irán	3 825 000
Nigeria	3 250 000
Italia	3 233 739
Argentina	2 690 000

Dentro de España, la provincia de mayor superficie cultivada es Valencia (105 530 ha), le siguen Murcia (45 574 ha), Alicante (36 792 ha), Castellón (36 461 ha.), Sevilla (23 599 ha), Huelva (12 567 ha) y Tarragona (11 369 ha) (MAPA, 2005).

El cultivo de los cítricos no está exento de serios problemas, como, por ejemplo, las afecciones fúngicas, que pueden causar una importante merma en la producción, y por lo tanto, importantes pérdidas económicas. Dentro de éstas, las causadas por *Phytophthora* spp. constituyen un grave problema a nivel nacional y mundial.

1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *Phytophthora*

1.2.1. Ubicación taxonómica

Alexopoulos, 1979	Gunderson <i>et al.</i> , 1987; Paquin <i>et al.</i> , 1997	Birch y Whisson, 2001
División: Eumycota	Reino: Chromista	Reino: Stramenopila
Subdivisión: Phycomycotina	Phylum: Oomycota	Phylum: Oomycota
Clase: Oomycetes	Clase: Oomycetes	Clase: Oomycetes
Orden: Peronosporales	Orden: Peronosporales	Orden: Peronosporales
Subfamilia: Pythiae	Familia: Pythiaceae	Familia: Pythiaceae
Género: <i>Phytophthora</i>	Género: <i>Phytophthora</i>	Género: <i>Phytophthora</i>

El género *Phytophthora* (del griego Phyton: planta; phtora: destructor) fue creado por de Bary en 1876 con *P. infestans* de Bary como especie tipo. Este investigador reconoció a dicho hongo como causante del “late blight” de la patata en Europa (1840) (Waterhouse, 1963).

Actualmente existe mucha controversia en lo referente a la ubicación taxonómica de *Phytophthora*. Aunque este género y el de otros oomicetos han estado siempre incluidos dentro de los hongos, actualmente han sido reubicados en dos reinos diferentes, Chromista (Gunderson, *et al.*, 1987; Paquin *et al.*, 1997) y Stramenopila (Birch y Whisson, 2001). Sin embargo, en los últimos años la mayoría de investigadores en este grupo de organismos han aceptado la clasificación de Birch y Whisson (2001). No obstante, en la literatura fitopatológica todavía se les cita como hongos (*sensu amplo*).

Los organismos del reino Stramenopila poseen características nutricionales, ecológicas y morfológicas similares al ciclo de vida de los hongos. Por esta razón y debido a que hasta hace relativamente poco tiempo se consideraban hongos, son estudiados por micólogos (Bartnicki-García, 1996; Dick, 1997). En este reino están incluidos los Oomycetes, Hyphochytriomycetes y Labyrinthulomycetes. Dentro de los Oomycetes, el género *Phytophthora* pertenece al orden Peronosporales y a la familia Pythiaceae.

1.2.2. Crecimiento miceliar

Todas las especies del género poseen un micelio hialino, de grosor uniforme o irregular, donde pueden observarse abundantes gotas oleaginosas. Existen algunas especies en las cuales, bajo ciertas condiciones de cultivo, el micelio se presenta toruloso, con protuberancias y vesículas. El micelio es cenocítico, observándose raramente la presencia de algunos tabiques que normalmente se encuentran separando las partes viejas carentes de protoplasma (Waterhouse, 1963; Boccas y Laville, 1976).

En los medios de cultivo el micelio se presenta aéreo, y puede ser marcadamente radiado o ligeramente estrellado, presentándose los bordes de la colonia redondeados o sinuosos y sumergido en el medio, siendo precisamente en este último en el que pueden diferenciarse las protuberancias y engrosamientos (Tuset, 1977). El micelio es capaz de vivir de forma saprófita sobre las partículas de materia orgánica del suelo en ausencia del hospedante. Sin embargo, según otros autores (Zentmyer *et al.*, 1974) existe una invasión muy pobre de la materia orgánica por parte del micelio, y el movimiento de éste a través del suelo es muy pequeño o nulo.

En el cultivo *in vitro* se pueden originar variaciones del aspecto del micelio en algún sector de la colonia, las cuales pueden ser relevantes tanto macroscópica como microscópicamente en cuanto a la morfología, así como desde el punto de vista fisiológico y parasitario, debido a la posibilidad de producirse nuevas razas más agresivas (Boccas y Laville, 1976). Cuando las especies del género *Pythophthora* son cultivadas *in vitro*, el desarrollo del micelio se ve condicionado por varios factores tales como la composición del medio, la temperatura, los nutrientes, la tensión de oxígeno y de CO₂, el pH y, en menor escala, la luz (Tuset, 1977; Erwin *et al.*, 1983). El tipo de medio ejerce una influencia muy importante en la velocidad de crecimiento, y se ve favorecida en aquéllos ricos en hidratos de carbono.

Es importante resaltar el papel que ocupa la temperatura entre los factores que limitan el crecimiento vegetativo, razones por las cuales constituye un parámetro de elevada relevancia en la taxonomía. El margen de temperatura compatible con el desarrollo del micelio va desde 1 a 37 °C, situándose entre los 20 - 28 °C la temperatura óptima para la mayoría de las especies, teniendo en cuenta que este valor es específico para cada una de ellas (Erwin y Ribeiro, 1996).

En el caso del pH, el rango permisible para el cultivo *in vitro* de estas especies se encuentra entre 3,5 y 10, encontrándose en un rango entre 4,5 y 5,5 el crecimiento óptimo específico para la mayoría de las especies. Generalmente, los valores de pH que permiten el mejor desarrollo del micelio, también son favorables para la producción de esporangios, clamidosporas y oosporas (Boccas y Laville, 1976).

1.2.3. Reproducción

Las especies de *Phytophthora* presentan dos tipos de reproducción: asexual (con la formación de clamidosporas y esporangios, que contienen las zoosporas) y sexual (mediante la formación de oosporas).

Reproducción asexual

El esporangióforo no se diferencia normalmente de las hifas, aunque en algunas ocasiones puede ser más ancho o delgado que éstas y puede presentar hinchamientos. Todas las especies del género presentan esporangios, que son incoloros o amarillo tenue y generalmente se insertan terminalmente en el esporangióforo, aunque también pueden estar intercalados. El esporangio a veces presenta vacuolas y al microscopio se observa un aspecto granuloso en su interior.

Existen características del esporangio que son muy importantes para la taxonomía de las especies como su forma y tamaño, la presencia o no de papila y sus dimensiones, la manera en que éstos se producen, así como la mayor o menor facilidad para desprenderse del esporangióforo (esta última característica permite clasificarlos como: caducos, si se desprenden fácilmente del esporangióforo y no caducos, si se desprenden difícilmente). Desde un punto de vista taxonómico es también importante la longitud del pedicelo al desprenderse del esporangióforo (Zentmyer y Mitchell, 1986). Existen factores que afectan a la producción y el desarrollo de los esporangios como son la humedad, la tensión de oxígeno, la luz, la temperatura y la nutrición. La presencia de humedad es fundamental para la formación de esporangios, aunque la cantidad necesaria de la misma varía para cada especie.

En la mayoría de las especies los esporangios son más abundantes en presencia de luz, aunque su efecto es muy variable, llegando a inhibir su producción en algunos casos. El factor temperatura ejerce una gran influencia en el desarrollo vegetativo del hongo y en el desarrollo y formación de esporangios. La temperatura óptima para la producción de esporangios es diferente y específica para cada especie, por lo que juega un papel destacado en la taxonomía, estando comprendida generalmente entre 20 y 28 °C (Zentmyer y Mitchell, 1986).

Las zoosporas se forman dentro del esporangio y para su liberación es necesaria la presencia de agua libre. Su formación puede estimularse *in vitro* incubando un cultivo con esporangios durante pocos minutos a temperaturas entre 5 y 10 °C. La exposición más prolongada a estas temperaturas (10 - 15 minutos) provoca que las zoosporas sean liberadas, lo cual constituye la forma de germinación indirecta de los esporangios (Erwin *et al.*, 1983).

Algunas especies de este género presentan además una forma de germinación directa, en la cual el tubo germinativo se origina, principalmente, a partir de la papila del esporangio. Éste a su vez puede dar lugar rápidamente al micelio o producir un nuevo esporangio, dependiendo de las condiciones del medio de cultivo (Boccal y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986).

Las zoosporas son las estructuras primarias que causan una nueva infección de las raíces. Estas esporas pueden nadar cortas distancias en el suelo con elevada humedad, así como también pueden ser transportadas a grandes distancias en el agua de irrigación o por las lluvias. Además de esta forma de dispersión, las especies de *Phytophthora* pueden dispersarse por el aire o ser transportadas por la actividad humana o por invertebrados (Ristaino y Gumpertz, 2000).

Los miembros de este género pueden producir además clamidosporas, que constituyen un órgano de conservación y supervivencia (Erwin y Ribeiro, 1996). Generalmente son de forma redondeada con una pared bien definida (más de 2 μ de espesor), siendo comúnmente intercalares aunque también pueden encontrarse en el extremo terminal de la hifa. Al principio, las clamidosporas son hialinas, tornándose de un color amarillo o ligeramente marrón con la edad. Es importante señalar que no se forman en todas las especies, por lo cual su presencia es importante para la taxonomía de las mismas (Boccas y Laville, 1976; Tuset, 1977).

Las clamidosporas pueden germinar dando lugar a numerosos tubos germinativos o a la producción de esporangios, lo cual dependerá de la cantidad de nutrientes presentes en el medio de cultivo. Un rango de temperatura entre 18 - 30 °C es el óptimo para que se produzca su germinación. El pH óptimo para que ocurra este proceso está comprendido entre 5 y 7, aunque a valores de pH de 3 y 9 también se ha producido germinación (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986). Las clamidosporas que persisten en el suelo constituyen también unidades infectivas.

Reproducción sexual

Los órganos sexuales constituyen el elemento taxonómico más importante. No todas las especies los producen o se muestran inconstantes en cuanto a su formación, por lo que en algunos casos se requieren medios de cultivo especiales. Existen casos, como por ejemplo *P. citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian, donde no se ha observado la producción de estos órganos de reproducción (Boccas y Laville, 1976; Stamps *et al.*, 1990).

Anteridio (órgano sexual masculino)

Presenta una forma variable: puede ser esférico, oval, en forma de clavo o cilíndrico. De manera habitual es solitario, hialino y con una pared externa delgada. Su disposición respecto al oogonio puede ser anfigino o paragino, o ambas a la vez, siendo importante tener en cuenta esta disposición para realizar la clasificación taxonómica de las especies (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986, Erwin y Ribeiro, 1996).

Oogonio (órgano sexual femenino)

Es de forma esférica o ligeramente ahusada; usualmente se encuentra en el ápice de una hifa, aunque también puede aparecer intercalado, separado del resto de la hifa por un grueso tabique. En cultivos jóvenes es hialino pero posteriormente, con el envejecimiento, se torna amarillo o ligeramente marrón. En la mayoría de las especies es liso, aunque puede presentar ligeras protuberancias o verrugas en algunos casos (Boccas y Laville, 1976; Zentmyer y Mitchell, 1986).

Oospora

Siempre se presenta de manera individual, ocupando relativamente toda la cavidad del oogonio. Es de forma esférica, lisa o moderadamente verrugosa, y su coloración puede ser hialina o ligeramente amarillo - oscura. El medio de cultivo ejerce una influencia considerable en la formación de la oospora: los medios naturales ricos, tales como el maíz y la avena son los más favorables, no produciéndose en medios líquidos. Existen ciertas sustancias que favorecen su formación, como son los extractos de plantas, ciertas vitaminas y algunos esteroides. Entre otros factores que pueden influir en su formación se pueden citar la tensión de oxígeno y CO₂, la presencia de luz, la temperatura (cuyo óptimo está entre 20 - 22 °C), así como también los cultivos asociados de diferentes especies que facilitan la producción de oosporas entre las especies heterotálicas (“mating types”). La formación de la oospora es el resultado de la fertilización de un oogonio uninucleado, lo cual tiene lugar de diferentes formas según la posición del anteridio. Una vez que se ha formado la oospora, entra en un período de reposo en el cual se distinguen dos estados: latencia constitutiva y latencia exógena. Una vez terminado este período la oospora germina dando lugar a un tubo germinativo, que a su vez deriva en la formación de un esporangio, o con la formación del talo micelial (Boccas y Laville, 1976; Tuset, 1977).

1.3. ENFERMEDADES CAUSADAS POR ESPECIES DE *Phytophthora* EN CÍTRICOS

El decaimiento progresivo de árboles es uno de los principales problemas fitosanitarios que presentan los cítricos a nivel mundial (Timmer *et al.*, 2003). Este problema se asocia a hongos fitopatógenos del suelo que afectan al sistema radicular, impidiendo el buen funcionamiento de las raíces y generando la muerte parcial o total de los árboles (Dandurand y Menge, 1993). Dentro de los hongos fitopatógenos *sensu amplo*, especies de *Phytophthora* causan la caída de plántulas en viveros o “damping off”, podredumbre de las raíces absorbentes, podredumbre del cuello y de las raíces estructurales, pudrición del pie o gomosis y el “aguado” de frutos (Erwin y Ribeiro, 1996). Dos especies de *Phytophthora* se asocian principalmente a enfermedades en campos de cítricos: *P. parasitica* Dastur (sin. *P. nicotianae* Breda de Haan) y *P. citrophthora*.

Ambas especies se encuentran ampliamente distribuidas en las zonas de producción cítrica (Zitko *et al.*, 1991). Sin embargo, a nivel mundial han sido descritas al menos 10 especies de *Phytophthora* afectando cítricos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Especies de *Phytophthora* patógenas de cítricos (Erwin y Ribeiro, 1996).

Especies	Parte infectada de la planta	Referencia
<i>P. boehmeriae</i> Sawada	Frutos	Frezzi (1941, 1950)
<i>P. cactorum</i> (Leb. & Cohn) Schröeter	Raíces, corona, tronco y frutos	Fawcett (1920)
<i>P. cinnamomi</i> Rands	Frutos	Fawcett y Bitancourt (1940)
<i>P. citricola</i> Sawada	Frutos; raíces	Boccas y Lavelle (1976)
<i>P. citrophthora</i> (Sm. & Sm.) Leonian	Raíces, corona y tronco; hojas; frutos y ramas	Smith y Smith (1906); Fawcett (1936); Boccas y Lavelle (1976); Graham y Menge (1996)
<i>P. drechsleri</i> Tucker	Raíces	Fawcett (1936)
<i>P. hibernalis</i> Carne	Frutos; hojas	Fawcett (1936); Boccas y Lavelle (1976)
<i>P. megasperma</i> Drechsler	Raíces, corona y tronco	Fawcett (1936); Gondell (1946)
<i>P. palmivora</i> (Butler) Butler	Raíces, corona y tronco; frutos y ramas	Fawcett (1936); Boccas y Lavelle (1976); Graham y Menge (1996)
<i>P. parasitica</i> (= <i>P. nicotianae</i>) Dastur	Raíces, corona y tronco; frutos	Fawcett (1936); Boccas y Lavelle (1976);

Los principales síndromes ocasionados por *Phytophthora* spp. en cítricos son:

1.3.1. Damping-off

Plántulas de cítricos pueden sufrir un colapso cuando el patógeno infecta y rodea el tallo en el entorno de la línea del suelo. Las plántulas infectadas mueren rápidamente cuando la humedad del suelo es abundante y las temperaturas son favorables para el crecimiento del hongo. Las plantas normalmente se vuelven resistentes al “damping-off” una vez las hojas verdaderas han emergido y el tejido del tallo se ha lignificado (Graham y Menge, 1999).

1.3.2. Podredumbre de las raíces absorbentes

Diversas especies de *Phytophthora* pueden infectar la corteza de las raíces absorbentes que se vuelve blanda, descolorida y de aspecto húmedo, causando su descomposición. Al perderse dicha corteza queda en el extremo de cada raicilla un hilo blanco de tejido vascular. La pudrición de las raíces en árboles pequeños puede producir la muerte del árbol. En árboles con patrones tolerantes a tristeza, el patógeno raramente mata al árbol, pero se produce una pérdida de vigor del mismo y un descenso en la producción (Graham y Menge, 1999).

1.3.3. Podredumbre de la corona y de las raíces estructurales

El síndrome denominado “pudrición de la corona”, indica que el daño se produce en el patrón, bajo la línea de suelo. En las raíces estructurales, pueden ocurrir lesiones llamadas “frog-eye” u “ojo de rana” (Graham y Menge, 1999). La podredumbre del cuello de la raíz y parte basal del tronco produce la deshidratación y muerte de la corteza, sin exudado gomoso, que frecuentemente es visible junto a la superficie del suelo. En este caso, unos pocos centímetros bajo el nivel del suelo aparece podrida la corteza del cuello y las raíces principales. El desarrollo del oomiceto generalmente está restringido a la zona de la corteza afectada, provocando un chancro.

1.3.4. Gomosis o podredumbre del pie

La podredumbre del pie es el resultado de una infección del portainjerto o de las zonas de la variedad que se encuentran cerca del nivel del suelo. La “gomosis” afecta principalmente a la base del tronco (zonas próximas al injerto), pero puede presentarse también a lo largo del mismo (Graham y Menge, 1999). El principal síntoma es la abundante formación de goma sobre la superficie de la corteza, mientras que los tejidos corticales mueren sin afectar al leño. Los árboles afectados presentan hojas de color verde pálido debido a problemas de traslocación en los tejidos conductores. Si las lesiones dejan de expandirse o el hongo muere, se forman callos alrededor del área afectada. La producción de goma depende de la especie, del tipo de suelo y de las condiciones climáticas. En el área mediterránea, donde el ambiente es normalmente seco, las exudaciones gomosas son escasas, estacionales y no siempre observables.

1.3.5. Podredumbre marrón de los frutos o “aguado”

Los frutos afectados por *Phytophthora* spp. comienzan a perder el color verde o naranja (según el estado de madurez) a los pocos días de la penetración del patógeno en los tejidos epidérmicos, apareciendo zonas redondeadas de diversos tamaños y de color gris oscuro, que, rápidamente, cambian a un marrón bien definido. La podredumbre que se origina es firme y consistente, nunca blanda. En la parte superficial de estas zonas afectadas, cuando la humedad es elevada, se desarrolla conjuntamente la parte vegetativa (micelio) y la de reproducción asexual (esporangióforos y esporangios) en forma de eflorescencia más o menos densa de color blanquecino (Tuset y Sánchez, 1988; Graham y Menge, 1999). A nivel mundial han sido 3 las especies de *Phytophthora* comúnmente citadas por su asociación con ésta enfermedad: *P. parasitica*, *P. palmivora* y *P. citrophthora*.

1.3.6. Ataques de *Phytophthora* a la parte vegetativa aérea de los árboles

Las afecciones ocasionadas por especies de *Phytophthora* en las partes aéreas de árboles cítricos (parte superior del tronco y ramas principales o secundarias) han sido citadas pocas veces y generalmente se producen cuando existe un componente genético como variedades altamente susceptibles relacionado con condiciones de alta humedad. Graham y Menge (1999) mencionan que pueden formarse grandes chancros en las ramas de árboles de limonero provocando su muerte al estrangularlas cuando las condiciones de lluvias son elevadas. Por otro lado, Gutiérrez (2003) menciona que árboles cítricos que han sido totalmente cubiertos por el agua durante alguna inundación presentan pudrición y gomosis a nivel de las ramas principales de la copa de los árboles.

En otros casos, las afecciones en la parte aérea de la planta están relacionadas con la progresión de la infección a partir de lesiones en la parte baja del árbol. Fawcett (1936) observó infecciones de *P. citrophthora* atacando todas las partes del árbol, desde las raíces hasta las ramas secundarias en la provincia de Western Cape (Sudáfrica) y, también en Egipto. Normalmente, las especies de *Phytophthora* en cítricos son patógenas a nivel de suelo; sin embargo, los mecanismos mediante los cuales se producen infecciones directas sobre las ramas de los árboles no han sido estudiados profundamente debido a su rara naturaleza.

En el “aguado” de los frutos, los propágulos de especies de *Phytophthora* son dispersados hacia el fruto por salpicaduras de lluvia o por el viento (Fawcett, 1936). En algunos casos, frutos afectados por el aguado se encontraron a 1 m del suelo, y ocasionalmente, *P. hibernalis* se aisló de frutos enfermos a una altura de 3 m en el árbol (Fawcett, 1936). En la pudrición de frutos de manzana causada por *P. syringae*, la infección ocurre dentro de los 0,5 m del suelo; sin embargo, hay observaciones de infecciones de frutos a alturas de más de 1 m del suelo (Upstone, 1978).

Reilly *et al.* (1998) encontraron que la pudrición de racimos fruteros de la pecana (*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch), fue causada por *P. citricola*. La infección de los frutos se observó en la copa de árboles de 18 a 24 m de altura. El modelo del desarrollo de la enfermedad indicó que la infección inicial se produjo en unos pocos racimos fruteros y a partir de estos puntos se diseminaron a otros puntos del árbol durante los períodos de lluvia. El medio por el cual el patógeno llegó hacia las zonas altas del árbol y se diseminó a partir de los primeros puntos de infección hacia otras zonas es desconocido; no obstante, se sospecha de la participación de los insectos en la transmisión de esta enfermedad.

Browne y Viveros (1999) encontraron que la enfermedad denominada “chancro letal” que afecta las ramas principales de almendro era ocasionada por *P. citricola*. Se concluyó que el inóculo era transportado hacia las zonas aéreas del árbol durante la cosecha a través de los desechos infectados con el patógeno.

1.4. VARIABILIDAD PATOGENICA DE ESPECIES DE *Phytophthora*

Hüberli *et al.* (2001) estudiaron la variabilidad poblacional de setenta y tres cepas de *P. cinnamomi* aisladas de árboles enfermos de *Eucalyptus marginata* y de *Corymbia calophylla* procedentes de dos comunidades forestales del sudoeste de Australia. Se demostró que la variación morfológica y patogénica entre las dos poblaciones de la línea clonal era amplia y continua. Entre los rasgos fenotípicos estudiados se incluyeron ratios de crecimiento y morfología de la colonia en Patata Dextrosa Agar (PDA) a diferentes temperaturas. Asimismo, durante el experimento se estudió la morfología de esporangios y gametangios, y la capacidad de ocasionar lesiones en “varetas” cortadas y en plantas de eucalipto en invernadero. El estudio determinó una gran variabilidad de agresividad dentro de la población.

Robin y Desprez-Loustau (1998), estudiando la variabilidad patogénica de aislados de *P. cinnamomi* procedentes de diferentes plantas hospedantes de Francia y otros enclaves, demostraron que todos los aislados fueron patogénicos en todas las especies vegetales incluidas en el estudio, pero con diferente nivel de agresividad. Los aislados con niveles consistentes de agresividad se estudiaron e identificaron en estudios adicionales de interacciones entre aislados de *P. cinnamomi* y las diferentes plantas hospedantes. Aunque se encontraron diferencias significativas en cuanto a la longitud de la lesión, estas interacciones no se pudieron correlacionar con el hospedante de origen del aislado de *P. cinnamomi*. Finalmente, no se encontraron relaciones entre la variabilidad en la agresividad y las características fenotípicas de los aislados.

Appiah *et al.* (2003) encontraron que existe una considerable variabilidad tanto intraespecífica como interespecífica dentro de la población de aislados de *Phytophthora* procedente de cacao, responsables de la enfermedad “vaina negra”. Utilizando una valoración de la variación morfométrica interespecífica e intraespecífica de la población y un estudio del patrón de crecimiento o ratio de crecimiento en agar jugo V8 de los aislados, encontraron una variabilidad significativa en los caracteres de los esporangios procedentes de idénticos y diferentes orígenes. Estos resultados ponen de relieve las dificultades en realizar una identificación depurada basada en datos morfológicos en bruto. Los ratios longitud:anchura de los esporangios y la longitud del pedicelo de los mismos fueron los caracteres que diferenciaron los diferentes grupos.

Hansen *et al.* (1989) estudiaron la mortandad del cedro blanco (*Chamaecyparis lawsoniana*) en Washington, Oregón y el noroeste de California, encontrando que dos especies de *Phytophthora*, *P. cinnamomi* y *P. lateralis*, estaban asociadas a esta enfermedad. Sus estudios demostraron que hubo un componente de la especie y la raza de los aislados de *Phytophthora* en la resistencia varietal de los cedros.

1.5. FLUCTUACIÓN ESTACIONAL DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE PLANTAS LEÑOSAS A *Phytophthora* spp.

A nivel mundial existen diversos estudios sobre los cambios estacionales en la susceptibilidad de diversos hospedantes leñosos (frutales, forestales y cítricos) a especies de *Phytophthora*. Jeffers y Aldwinckle (1986) estudiaron la variación estacional en la extensión de las lesiones de cinco especies de *Phytophthora* en dos patrones de manzano en New York. Tras 25 meses de inoculaciones en intervalos de un mes con las especies *P. cactorum*, *P. megasperma*, *P. cryptogea*, *P. cambivora* y *Phytophthora* sp., observaron una interacción entre aislado y patrón manifestada en una diferencia de agresividad de estos aislados con los dos patrones. Las cinco especies de *Phytophthora* se separaron en dos grupos dependiendo de la época en que alcanzaban el nivel máximo de colonización: *P. cactorum* y *P. cambivora* presentaron un máximo entre finales de primavera y verano, mientras que *P. megasperma*, *P. cryptogea* y *Phytophthora* sp. presentaron dos picos máximos, el primero durante el verano, y el segundo durante el invierno.

Un estudio similar llevaron a cabo Browne y Mircetich (1995) evaluando mensualmente las lesiones provocadas por *P. cactorum*, *P. cambivora* y *P. cryptogea* en patrones de manzano en California. En inoculaciones a la raíz de árboles en campo e inoculaciones mensuales en “varetas” en laboratorio, encontraron una menor incidencia de la enfermedad con *P. cactorum* y *P. cambivora* durante la latencia de la planta (diciembre-febrero) y durante el crecimiento vegetativo (marzo). El aumento de la necrosis de raíz de árboles en campo y en las varetas se observó durante las inoculaciones primaverales (mayo). El tamaño máximo de lesión en la raíz se observó en agosto, a partir del cual se produjo un declive en el desarrollo de la enfermedad hasta octubre. Sin embargo, en el experimento en varetas observaron que el tamaño máximo de lesión se obtuvo en mayo, a partir del cual se produjo una disminución en el desarrollo de las lesiones hasta agosto. Los autores concluyeron que era necesario prolongar el tiempo de duración del ensayo en campo, debido a que tras 13 meses de inoculaciones no obtuvieron una predicción fiable de la severidad de la enfermedad.

El-Hamalawi y Menge (1995) estudiaron las fluctuaciones estacionales en la extensión de la colonización de *P. citricola* en aguacate en California. Mediante inoculaciones mensuales de ramas en campo observaron dos picos máximos en el tamaño de la lesión; el primero, después del primer periodo vegetativo (mayo-junio); y el segundo, después del segundo periodo vegetativo (noviembre-diciembre). Estos cambios estacionales en el desarrollo de la lesión presentaron una correlación altamente positiva con la cantidad de aminoácidos libres y una baja correlación con la cantidad de carbohidratos. Asimismo, encontraron que las plantas eran relativamente resistentes a la enfermedad durante los dos periodos de crecimiento vegetativo.

Matheron y Mircetich (1985) estudiaron la variación estacional en la susceptibilidad de dos patrones de nogal (*Juglans hindsii* y ‘Paradox’) a *P. citricola* en California. Bajo condiciones

controladas, realizaron inundaciones durante 48 horas en suelo infestado artificialmente con el patógeno. La severidad de la enfermedad se evaluó 14 días después de la inundación, observándose en el patrón *J. hindsii* un mayor tamaño de lesión de la corona en los ensayos de junio, con un 60% de árboles afectados y un menor tamaño en enero, con sólo el 3% de árboles afectados. Asimismo, para el patrón 'Paradox', observaron un 50% de árboles afectados en los ensayos de junio mientras que en los inoculados en octubre-noviembre y enero-mayo no se encontraron árboles afectados. En este estudio también realizaron inoculaciones directas en tallos y varetas, mostrando resultados similares a los obtenidos con el suelo infestado.

Dentro de las plantas forestales, Robin *et al.* (1994) estudiaron los cambios estacionales en la susceptibilidad del roble rojo (*Quercus rubra*) a *P. cinnamomi* en Francia. Mediante inoculaciones mensuales al tronco, observaron un mayor tamaño de la lesión en junio, mientras que en el periodo diciembre-febrero no se observaron síntomas de la enfermedad. Al mismo tiempo, fragmentos de corteza se separaron e inocularon en laboratorio, observando un desarrollo mínimo de la enfermedad en el periodo octubre-enero, y un aumento de la misma a partir de mayo. Los promedios del área de lesión no mostraron correlación con las fluctuaciones de los parámetros ambientales a lo largo del ensayo. Asimismo, midieron el contenido relativo de agua en la corteza, observando que los tejidos extraídos del cuello del árbol presentaron un mayor contenido relativo en agua y una mayor resistencia a la enfermedad que los tejidos extraídos a dos metros de altura. Además, encontraron diferencias en la severidad de la enfermedad entre árboles con diferente fenología, observando una relación significativa y positiva en infecciones en primavera, donde la corteza fue más susceptible a la colonización del patógeno, siendo mayor el desarrollo de la infección al inicio de la brotación primaveral.

Por su parte, Luque *et al.* (2002) estudiaron los cambios estacionales en la susceptibilidad del alcornoque (*Quercus suber*) a *P. cinnamomi* en España. El mayor pico en el tamaño de la lesión se observó en plántulas inoculadas entre abril y octubre. Los cambios estacionales se relacionaron con los parámetros ambientales y con el contenido relativo de agua en la planta, observándose que temperaturas mínimas medias diarias dentro del rango de 5-12 °C, inhibieron el desarrollo de la lesión. Asimismo, observaron que las lesiones causadas por *P. cinnamomi* no estaban relacionadas significativamente con ningún cambio estacional en el contenido relativo de agua en la planta.

En cítricos, Matheron y Matejka (1989) estudiaron los cambios estacionales en la susceptibilidad de cuatro patrones (*Citrus macrophylla*, *C. jambhiri*, *C. aurantium* y *C. volkameriana*) y dos variedades comerciales (*C. limon* 'Lisbon' y *C. reticulata* x *C. paradisi* [tangelo 'Orlando']) a *P. citrophthora* y *P. parasitica* en Arizona. Mediante inoculaciones de 'varetas' en laboratorio, observaron que los patrones *C. jambhiri*, *C. aurantium* y *C. volkameriana* desarrollaron menor tamaño de lesión frente a ambos hongos durante diciembre-febrero y un mayor tamaño durante junio-agosto. Para el patrón *C. macrophylla* inoculado con *P. citrophthora* observaron resultados similares. Este mismo patrón inoculado con *P. parasitica* presentó un

tamaño máximo de lesión durante marzo-mayo. Para la inoculación de las variedades comerciales, utilizaron varetas y tiras de corteza, observando que durante el periodo noviembre-diciembre se produjo un desarrollo mínimo de lesiones.

Posteriormente, en un experimento desarrollado igualmente en Arizona, Matheron y Matejka (1993) estudiaron los cambios estacionales en la susceptibilidad de *Citrus limon* 'Lisbon' injertado sobre tres patrones diferentes, *C. jambhiri*, *C. aurantium* y *C. volkameriana*, a *P. citrophthora* y *P. parasitica*. Mediante inoculaciones mensuales de raíces en laboratorio con *P. citrophthora*, observaron una mayor longitud de lesión durante julio-octubre y una menor longitud durante enero-febrero. Mediante inoculaciones de fragmentos de raíz, observaron que el patrón *C. aurantium* desarrolló mayor tamaño de lesión frente a ambos hongos que los otros dos patrones. Mediante inoculaciones mensuales de "varetas" en laboratorio con el aislado de *P. parasitica*, observaron una mayor longitud de lesión en *C. aurantium* durante julio-diciembre y una menor longitud durante enero-febrero. El tamaño medio anual de la lesión no varió en ninguno de los tres patrones inoculados con el mismo patógeno. En este estudio, observaron una relación inversamente proporcional entre el número de días en diciembre y enero con una temperatura media por debajo de 10 °C y la longitud de las lesiones desarrolladas en raíces de *C. aurantium* durante este periodo.

Dirac *et al.* (2003) compararon estacionalmente la susceptibilidad de *Citrus sinensis* cv. Valencia y *Poncirus trifoliata* a *P. citrophthora* y *P. parasitica* en California. Mediante inoculaciones en laboratorio de fragmentos de raíz, observaron que *P. parasitica* desarrolló un mayor tamaño de lesión en el periodo mayo-septiembre, y menor en noviembre y enero. En ambas especies observaron una disminución en el tamaño de la lesión en marzo, cuando los niveles de carbohidratos en las raíces eran mínimos. Sin embargo, a lo largo del periodo de ensayo, la temperatura y el nivel de carbohidratos no se correlacionaron de forma positiva con el tamaño de la lesión. La infección de *P. citrophthora* a 16 °C redujo el contenido en almidón de la raíz, pero no el de glucosa comparado con la infección por *P. parasitica*; asimismo, la infección de *P. parasitica* a 30 °C redujo el contenido de glucosa en la raíz pero no el de almidón comparado con la infección por *P. citrophthora*.

1.6. ECOLOGÍA DE ESPECIES DE *Phytophthora* EN CÍTRICOS

Dentro de los problemas fitosanitarios que pueden presentar los cítricos destacan las enfermedades producidas por especies de *Phytophthora* (Tabla 1.2). Estas especies presentan una gran distribución mundial y son responsables de una disminución considerable del rendimiento de los árboles con pérdidas económicas estimadas en millones de dólares anuales en parcelas sobre patrones susceptibles (Martins *et al.*, 2001; Dirac *et al.*, 2003; Timmer *et al.*, 2003). Sin embargo, en parcelas sobre patrones resistentes estas pérdidas son más reducidas (Matheron *et al.*, 1998).

El desarrollo de la pudrición del pie y de raíces se favorece con alta humedad del suelo, expresado como potencial mátrico (ψ), con valores entre 0 bar (saturación) a -30 bar (Erwin *et al.*, 1983; Feld *et al.*, 1990). La temperatura del suelo favorable (15 - 30 °C a 10 cm de profundidad), varía dependiendo de la especie. Los daños se ven agravados por la presencia de heridas y otras lesiones y por la susceptibilidad del patrón frente al patógeno (Matheron y Matejka, 1993). La infección ocurre principalmente por zoosporas, que son liberadas desde los esporangios en presencia de agua libre (Matheron y Matejka, 1993).

Muchas especies de *Phytophthora* requieren condiciones de saturación, o cercanas a ésta para liberar las zoosporas (ψ entre -0,05 a - 3,5 bar) (Erwin *et al.*, 1983; Feld *et al.*, 1990). Por ello, la humedad es un factor clave en el desarrollo de la enfermedad. En el suelo, las poblaciones de *Phytophthora* spp. varían con la temperatura y la humedad. En cítricos, estos factores temporales y climáticos determinan la distribución relativa e influencia de las especies de *Phytophthora* en las diferentes áreas de producción (Matheron *et al.*, 1997). *P. nicotianae* y *P. palmivora* son los agentes principales de enfermedades en cítricos en las zonas tropicales, mientras que *P. citrophthora* predomina en las zonas mediterráneas (como los países mediterráneos, California y China) (Ricci *et al.*, 1990; Graham *et al.*, 1998).

P. citrophthora se aísla con facilidad durante el invierno, debido a que crece entre 7 - 31°C, con un óptimo de 26 °C, en cambio, *P. parasitica* se aísla preferentemente durante el verano, ya que la temperatura de crecimiento es superior, creciendo entre los 9 – 36 °C, con un óptimo de 31 °C (Dirac *et al.*, 2003). La mayoría de las especies de *Phytophthora* permanecen latentes cuando las temperaturas son menores de 12 °C, período que coincide también con la detención del crecimiento de las raíces (Dirac *et al.*, 2003).

1.7. EPIDEMIOLOGÍA

1.7.1. Mecanismos de dispersión de especies de *Phytophthora*

Ristaino y Gumpertz (2000) consideran que las especies de *Phytophthora* pueden ser dispersadas mediante diversos mecanismos (**Tabla 1.3**).

Los procesos de dispersión de raíz a raíz en el suelo pueden implicar el crecimiento de las raíces hacia el inóculo, el movimiento del inóculo hacia las raíces, o el contacto entre raíces (mecanismo I). Por tal motivo, el principal cambio en el modelo espacial ocurriría dentro de los surcos, la presencia de nuevos focos puede ser rara, y el grado de agregación de la enfermedad cambiaría poco con el tiempo. Sin embargo, el movimiento del inóculo contenido en los surcos con el agua superficial de lluvias o irrigación por gravedad (mecanismo II) resultaría en el incremento de la tasa de la enfermedad y la diseminación podría ser detectada en muchos surcos a larga distancia en una dirección similar (Neher y Duniway, 1992).

Tabla 1.3. Mecanismos potenciales de dispersión de especies de *Phytophthora* en campo y efectos de los mecanismos de dispersión sobre los componentes del desarrollo epidémico (Ristaino y Gumpertz, 2000).

Mecanismo de dispersión	Modo de dispersión de inóculo	Efectos sobre el modelo espacial y tasa de incremento de la enfermedad (r)
Mecanismo I	Dentro del suelo a. Crecimiento de la raíz hacia el inóculo b. Movimiento del inóculo hacia las raíces c. Contacto entre raíces	Diseminación limitada entre surcos Formación rara de nuevos focos Desarrollo lento de rodales Tasa (r) baja
Mecanismo II	Inóculo dispersado por aguas superficiales	Diseminación dentro y entre filas. Desarrollo de nuevos focos locales o distantes. Expansión rápida de rodales. Tasa (r) alta
Mecanismo III	Dispersión por salpicaduras desde el suelo a las hojas, tallos y frutos	Diseminación dentro y a través de las filas. Desarrollo de nuevos focos locales Expansión moderada de rodales. Tasa (r) moderada.
Mecanismo IV	Dispersión aérea a partir de lesiones esporuladas sobre hojas, tallos o frutos a otras partes aéreas de la planta	Diseminación a larga distancia. Los nuevos focos se solapan rápidamente. Expansión rápida de rodales. Tasa (r) alta
Mecanismo V	Dispersión por humanos o invertebrados, incluyendo movimiento de suelo, plantas o propágulos.	Diseminación a larga distancia, local o globalmente dentro de los campos. Nuevos focos locales o distantes en áreas previamente no infestadas.

Las tasas de incremento de la enfermedad serían rápidas si la dispersión por salpicaduras del inóculo desde el suelo a las partes aéreas de la planta ocurren con lluvia o eventos de riegos tecnificados (mecanismo III). Puede haber una expansión bi-dimensional de los focos de enfermedad tanto dentro como a través de los surcos y se presentarían nuevos focos en el campo cerca de los ya existentes (Reynolds *et al.*, 1986).

La diseminación aérea del inóculo a partir de lesiones esporuladas sobre hojas, tallos, o frutos a otras partes aéreas de las plantas dentro y entre los surcos es un mecanismo básico de dispersión de especies de *Phytophthora* que infectan principalmente partes aéreas de las plantas (mecanismo IV). La tasa de incremento de la enfermedad sería muy rápida y el grado de agregación de la enfermedad disminuiría rápidamente conforme se presenta la expansión focal. Nuevos focos se desarrollan y se solapan dentro y a través de muchas filas o campos (Zwankhuizen *et al.*, 1998). Especies de *Phytophthora* también pueden ser diseminadas por actividades humanas o de invertebrados (mecanismo V) incluyendo el movimiento de equipos con suelo infestado, movimiento de material vegetal conteniendo al patógeno, o por insectos o animales vectores (Hamalawi y Menge, 1996; Konam y Guest, 2004). Este mecanismo de dispersión puede resultar en la diseminación a grandes distancias incluyendo escalas locales o globales (Hamalawi y Menge, 1996).

1.7.2. Influencia de los moluscos e insectos en la transmisión de *Phytophthora* spp.

A nivel mundial, no existen muchos estudios sobre las posibles vías de transmisión de *Phytophthora* spp. por invertebrados. Kueh y Khew (1982) encontraron propágulos viables de *P. palmivora* en excrementos del caracol *Achatina fulica*, y observaron que los esporangios sobrevivieron y permanecieron infectivos después de atravesar el canal alimentario de dos especies de caracoles: *A. fulica* y *Hemiplecta crossei*.

El-Hamalawi *et al.* (1996) estudiaron el rol de los caracoles (*Helix aspersa*) y hormigas (*Iridomyrmex humilis*) en la transmisión de *P. citricola* en plantas de aguacate (*Persea americana*). Los resultados mostraron que los excrementos de caracoles alimentados con tejidos infectados, contenían propágulos viables. Posteriormente, realizaron heridas en tejido sano, y observaron que estos excrementos tenían la capacidad de inducir chancros. Por otra parte, observaron que las hormigas, al ser atraídas por el exudado azucarado liberado por las lesiones de *P. citricola*, podían transmitir propágulos infecciosos a cualquier herida localizada en la planta.

Konam y Guest (2004) estudiaron el rol de los escarabajos (Coleópteros: Escolítidos y Nitidulidos) en la transmisión de *P. palmivora* en plantas de cacao (*Theobroma cacao*). Los autores concluyeron que los escarabajos eran atraídos por las lesiones producidas por el patógeno, y rápidamente podían generar y diseminar inóculo secundario de la enfermedad. La transmisión de *Phytophthora* spp. por algunos insectos ha sido citada por diversos autores en numerosas ocasiones, como por ejemplo en *Drosophila* (Hunter y Buddenhagen, 1969), gorgojos (*Scyphophorus interstitialis*) y hormigas (Turner, 1972; Taylor y Griffin, 1981; McGregor y Moxon, 1985).

1.7.3. Ciclo biológico y proceso infeccioso de *Phytophthora* spp. en cítricos

Las especies de *Phytophthora* están presentes en los campos de cítricos de todo el mundo. El ciclo de la enfermedad se muestra en la **Figura 1.1**.

Las poblaciones en el suelo se mantienen mediante repetidas infecciones en las raíces absorbentes. Bajo condiciones favorables de alta humedad y temperaturas suaves, las raíces infectadas producen esporangios, los cuales liberan zoosporas. Estas zoosporas son atraídas a la zona de elongación de las nuevas raíces por los nutrientes que se exudan naturalmente de esta zona radical. En contacto con las raíces, las zoosporas germinan y entonces infectan a la zona de crecimiento de las mismas. Cuando el hongo entra dentro del tejido de la raíz, la infección puede avanzar por la corteza, produciendo podredumbre. El ciclo puede repetirse tantas veces como las condiciones sean favorables y los tejidos susceptibles (Graham y Menge, 1999).

P. citrophthora normalmente no produce clamidosporas ni oosporas, siendo su mecanismo de supervivencia incierto; sin embargo, persiste en raíces infectadas como micelio o como esporangios (Graham y Menge, 1999).

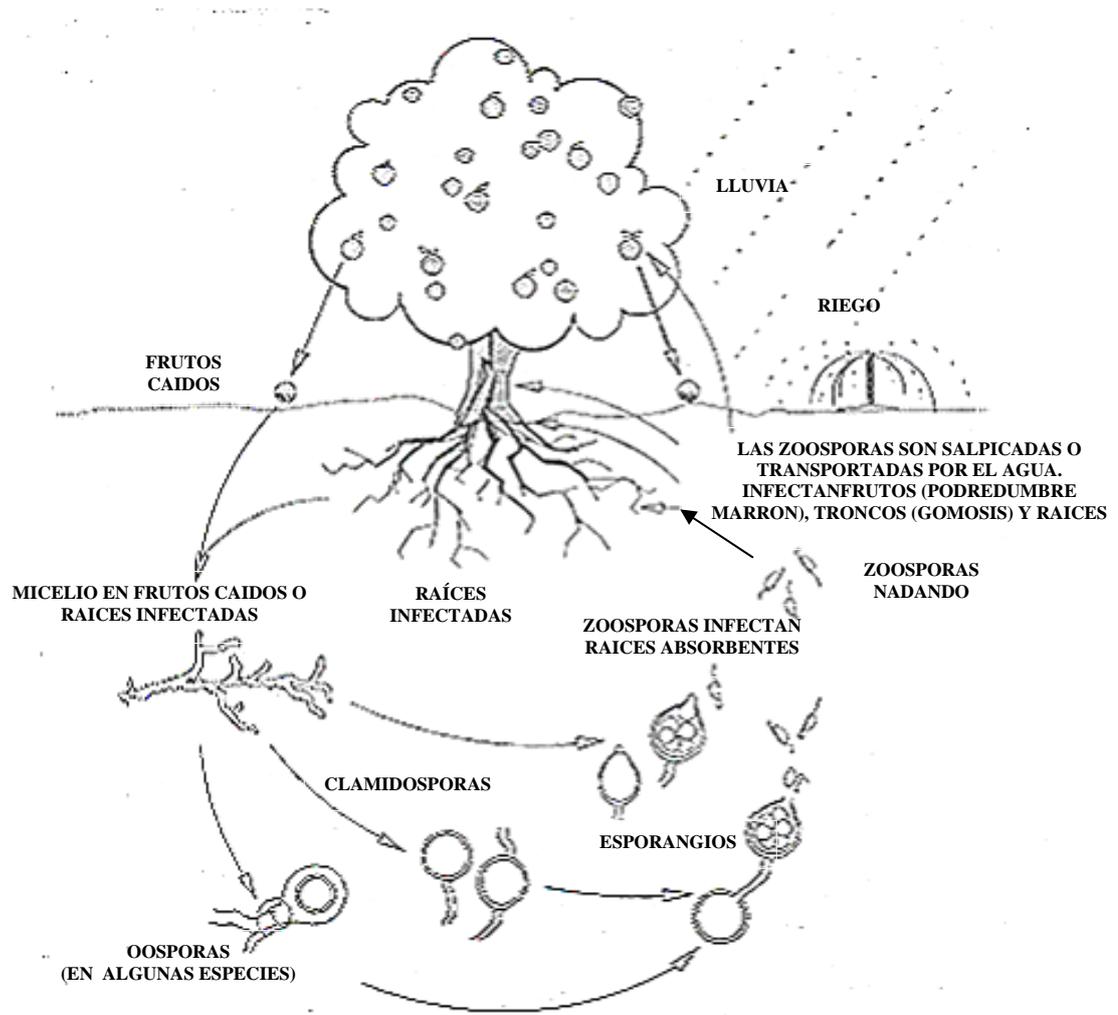


Figura 1.1. Ciclo de *Phytophthora* spp. en cítricos (Graham y Menge, 1999).

La podredumbre del cuello o gomosis se da cuando las zoosporas u otros propágulos llegan al tronco por encima de la unión con el patrón por salpicaduras de lluvia. Las infecciones se producen a través de las heridas o grietas naturales en la corteza cuando hay humedad. El cambium expuesto en una herida es susceptible a la infección durante más de 14 días. Las lesiones de las partes estructurales del árbol normalmente no producen inóculo para infecciones siguientes, y por ello no son importantes epidemiológicamente (Graham y Menge, 1999).

Cuando las condiciones son favorables, los frutos y las hojas jóvenes pueden ser infectados por propágulos transportados por salpicaduras desde el suelo. Las infecciones secundarias son causadas por estas partes afectadas y su dispersión ocurre también por salpicaduras de lluvia o por el viento (Graham y Menge, 1999).

1.8. MEDIDAS DE CONTROL FRENTE A *Phytophthora* EN CÍTRICOS

Un tratamiento eficaz de los árboles infectados con *Phytophthora* spp. requiere un diagnóstico precoz, lo cual es difícil de conseguir. Por ello, su control depende principalmente de medidas preventivas como el uso de material vegetal resistente, realización de prácticas culturales adecuadas y métodos de control químico.

1.8.1. Control genético

Una de las medidas de control para las enfermedades radiculares y del tronco producidas por *Phytophthora*, es el uso de patrones resistentes (Afek *et al.*, 1990; Matheron *et al.*, 1998). Numerosos estudios se han realizado para evaluar la resistencia o susceptibilidad del patrón; en la mayoría de estos trabajos se ha utilizado *P. citrophthora* y *P. parasitica*, especies citadas como los agentes causales más frecuentes en campos de cítricos en el mundo (Feld *et al.*, 1990; Zitko *et al.*, 1991; Matheron y Matejka, 1993; Matheron *et al.*, 1998; Dirac *et al.*, 2003).

Graham (1990) se refirió a los patrones como tolerantes más que resistentes, debido a que las raíces fibrosas de estos patrones se infectan bajo inoculaciones artificiales y en viveros y suelos de parcelas infestadas. El daño a raíces fibrosas en árboles adultos causa su debilitamiento y pérdida de rendimiento (Sandler *et al.*, 1989). El árbol es incapaz de mantener una adecuada asimilación de agua y minerales, y los nutrientes de reserva en las raíces son destruidos por ataques continuos de hongos, resultando en una muerte regresiva del árbol y pérdidas de producción.

La información existente respecto al comportamiento de los patrones de cítricos frente a *Phytophthora* spp. es contradictoria, ya que existen diferencias en su categorización como tolerantes o susceptibles (Matheron y Matejka, 1989). Estudios realizados con *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. y algunos de sus híbridos, como Swingle citrumelo (*P. trifoliata* (L.) x *Citrus paradisi* Macf.), y la serie de los citrangeros (*C. sinensis* (L.) Osbeck x *P. trifoliata* (L.) Raf.), como los patrones Troyer y Carrizo, demostraron que son uno de los grupos de patrones más resistentes a la pudrición de raíces (Graham, 1995; Widmer *et al.*, 1998).

Según Widmer *et al.* (1998) el naranjo amargo (*C. aurantium* L.) es susceptible a la pudrición de raíces y *P. trifoliata* es resistente, mientras que Afek *et al.* (1990) clasificaron al naranjo amargo como moderadamente resistente y similar a citrange Troyer. Timmer y Menge (1988) mostraron que el naranjo amargo es altamente resistente a la infección por *Phytophthora*. La resistencia o susceptibilidad hacia la gomosis es con frecuencia aplicada incorrectamente a resistencia a la pudrición radicular. La resistencia de patrones de cítricos a una especie de *Phytophthora* no es similar a la respuesta contra una especie diferente.

Situación similar ocurre con citrange Carrizo, que ha sido clasificado como tolerante a enfermedades del cuello, pero muy susceptible a pudrición de raíces (Martins *et al.*, 2001);

resistente a pudrición de raíces y gomosis producido por *P. citrophthora* y *P. parasitica* (Matheron *et al.*, 1998); resistencia o tolerancia moderada (Ferguson *et al.*, 1990); susceptible, debido a la incapacidad de formar nuevas raíces en presencia de *P. parasitica* (Graham, 1990, 1995). Erwin y Ribeiro (1996) manifiestan que citrange Carrizo no ha sido tolerante en ensayos de invernadero, pero sí en estudios en campo. Estas aparentes contradicciones se pueden deber a las distintas especies de *Phytophthora* ensayadas y asociadas a variables propias del hospedante, como son la edad, estado nutritivo, vigor; y a características propias del suelo y del ambiente donde se hayan realizado las evaluaciones (Zitko *et al.*, 1991, Matheron *et al.*, 1998).

Para Graham y Menge (1999) los limoneros (*Citrus limon*) y el pomelo (*C. paradisi*) son muy sensibles a *Phytophthora*; el naranjo dulce (*C. sinensis*) es más sensible que los mandarinos (*C. reticulata*) y sus híbridos; los citranges, Troyer y Carrizo, y el mandarino Cleopatra presentan cierta resistencia; el naranjo amargo (*C. aurantium*), *P. trifoliata*, el citrumelo, *C. macrophylla* y el kumquat (*Fortunella* spp.) son resistentes. La elección del patrón supone, por tanto, un aspecto importante en la lucha contra esta enfermedad (Agustí, 2000).

1.8.2. Control mediante prácticas culturales

Las prácticas culturales deben emplearse siempre, y están dirigidas a disminuir o prevenir el ataque de *Phytophthora* spp. (Tuset, 2000). Muchos de los problemas en las plantaciones de cítricos a causa de *Phytophthora* spp. pueden evitarse plantando material de vivero libre de la enfermedad (Graham y Menge, 1999). El tratamiento de las semillas antes de plantarlas en el invernadero (sometiéndolas a 50 °C durante 10 minutos) así como el uso de un sustrato esterilizado consigue en gran medida que el material vegetal obtenido en vivero esté libre de las distintas especies de *Phytophthora*.

Otro método cultural consiste en injertar las especies y cultivares comerciales, que en general son susceptibles, a 20 - 30 centímetros del suelo evitando así el contacto de la herida del injerto con el suelo infestado (Tuset, 2000).

Un adecuado drenaje del suelo es esencial porque las inundaciones y encharcamientos prolongados promueven el crecimiento de las poblaciones del patógeno en el suelo, lo que consecuentemente incrementa el riesgo de infección de la corteza (Graham y Menge, 1999). Por ello cuando el riego es localizado se deben separar los goteros del tronco para evitar una excesiva humedad en el mismo. Cuando el riego es por inundación se pueden rodear los troncos con tierra o formar alcorques de tal manera que se evite el contacto directo con el agua (Agustí, 2000). Se debe evitar asimismo producir lesiones en la base del tronco y en las raíces porque proporcionan puntos de entrada para los patógenos. Es conveniente también trabajar la tierra para evitar suelos compactos, reducir la dosis de abono nitrogenado, y evitar el contacto directo con los troncos de la materia orgánica que se aporte (Agustí, 2000).

En el caso de los frutos, se utilizan medidas culturales como el enyerbado de las parcelas y el levantamiento de las ramas con frutos próximas al suelo para evitar las salpicaduras de tierra que son portadoras de inóculo (Tuset, 2000).

1.8.3. Control químico

Aunque el uso de patrones resistentes o tolerantes es de gran valor en el control de enfermedades ocasionadas por *Phytophthora*, en la mayoría de los casos el control químico es estrictamente necesario. El control de la enfermedad se llevó a cabo en un inicio por fungicidas de amplio espectro, y más tarde, a partir de los últimos años de la década de los setenta, el control recayó mayoritariamente sobre los fungicidas sistémicos y selectivos recién desarrollados y de uso específico contra los oomicetos patógenos.

Fungicidas de contacto

Los fungicidas de contacto (derivados del cobre, ditiocarbamatos) basan su acción fungitóxica en el bloqueo de la germinación de los esporangios y zoosporas (Tuset, 2000). Su aplicación es localizada al tronco del árbol, de forma superficial, siguiendo una de las técnicas siguientes: a) Aplicación directa, pulverizando o pintando la base de los troncos con una suspensión concentrada de uno o varios de ellos. b) Eliminación de los tejidos afectados de la corteza, posterior pulverización o pintado con fungicida y aplicación posterior de una capa de pintura o emulsión asfáltica protectora de la herida efectuada (Agustí, 2000). Los tratamientos deben realizarse cuando se prevean fuertes lluvias, se vislumbren los primeros exudados gomosos o los tejidos corticales empiecen a ennegrecerse (Tuset, 2000).

Fungicidas sistémicos

Entre los fungicidas activos contra los Oomicetos se encuentran el grupo de las fenilamidas y el de los etil fosfonatos. Las fenilamidas fueron introducidas en 1977 y, al contrario que otros fungicidas sistémicos, estos compuestos actúan contra los oomicetos patógenos. Son altamente específicos en este aspecto, no teniendo efecto alguno en otras clases de hongos (Brent, 1995).

Entre las fenilamidas hay compuestos como el metalaxil, una acilalanina cuya sustancia es una de las más estudiadas dentro de este grupo de fungicidas. El metalaxil es un fungicida sistémico monodiana que actúa casi exclusivamente contra el orden Peronosporales. Se transloca rápidamente en el xilema y muestra acción preventiva y curativa, pero no se recomienda usarlo de esta última forma. Su modo de acción consiste en interferir con el complejo RNA-polimerasa de los hongos sensibles, inhibiendo la síntesis del RNA ribosómico (Griffith *et al.*, 1992).

Debido a su específico modo de acción (monodiana) no es sorprendente que se desarrollara resistencia con relativa facilidad, a éste y a otros fungicidas de la familia de las fenilamidas, ya que tanto la diploidía del micelio cenocítico de los Oomicetos como la recombinación somática les permiten acumular mutaciones dentro de su genoma. Una mutación o alteración en la RNA-polimerasa impide que el metalaxil se le una, y por lo tanto se da lugar a una resistencia, ya que no se detiene la síntesis de DNA ribosómico.

La facilidad con que los oomicetos han desarrollado resistencia a las fenilamidas ha dado lugar a importantes restricciones en su uso, al igual que se han diseñado estrategias para reducir la presión de selección en el patógeno y para detener el crecimiento de resistencias dentro de su población (Griffith *et al.*, 1992).

Los etil fosfonatos son las sales o ésteres del ácido fosfónico. Su principal compuesto es el fosetil-Al. En 1977 el fosetil-Al fue presentado por Rhone-Poulenc para el control de los Oomicetos, principalmente para usarlo contra *Plasmopara viticola* y contra las especies de *Phytophthora* responsables de una amplia gama de enfermedades en cultivos de climas templados y tropicales (Griffith *et al.*, 1992).

El fosetil-Al es un fungicida sistémico que puede ser absorbido tanto por el sistema radicular como por las hojas, vehiculizándose en el interior de la planta por el floema (sistemía basipétala o simplástica) y por el xilema (movimiento acropétalo o apoplástico). Esta ambimovilidad, única entre los fungicidas, le permite llegar a cualquier órgano de la planta e impedir la entrada del patógeno (Soler *et al.*, 1997).

El modo de acción del fosetil-Al ha sido ampliamente estudiado, y consiste en la combinación de un efecto directo sobre el patógeno y otro indirecto a través de la planta. El efecto indirecto se realiza a través de la planta induciendo variaciones fisiológicas y estimulando en ésta la producción de sustancias que impiden el desarrollo del hongo. Esas sustancias llamadas “elicitores” convierten a las plantas tratadas en plantas “resistentes” al ataque de hongos ya que éstas adquieren unos mecanismos de hipersensibilidad y de micronecrosis celulares idénticos a los de las variedades genéticamente resistentes (Guest, 1984).

El efecto directo muestra una acción como fungicida clásico, comprobándose la existencia de varias “dianas” bioquímicas afectadas, entre ellas los sistemas de transporte y penetración en la pared celular y el metabolismo energético: disminución de la respiración y de la producción de ATP, que afecta a la inhibición de las esporas, de las hifas, y la penetración del parásito en caso de tratamientos preventivos. En tratamientos curativos bloquea el desarrollo del micelio y su esporulación, inhibiendo la formación de esporangios, oosporas o clamidosporas, según los casos. Sin embargo, esta acción directa no es suficiente la mayoría de veces (Guest, 1986).

A pesar de los múltiples sitios de acción del fosetil-Al, desde 1998 se han detectado cepas resistentes a este fungicida: la primera referencia de insensibilidad fue en cepas del mildiu de la lechuga (*Bremia lactucae* Regel) en California (Brown *et al.*, 2004). Estos autores indican que la

aparición de resistencias se debe a la aplicación de suplementos foliares de crecimiento a la planta conteniendo ácido fosforoso (H_3PO_3), principal metabolito activo del fosetil-Al. El amplio uso de estos suplementos nutricionales pudo haber contribuido al desarrollo de resistencias a este fungicida.

Fosetil-Al y metalaxil se pueden aplicar a cítricos tanto vía pulverización foliar, pintado al tronco o vía riego. El tratamiento más efectivo para controlar infecciones de *Phytophthora* al tronco de cítricos es el pintado con metalaxil (Matheron y Porchas, 2002). La aplicación de estos productos debe coincidir con las épocas de brotación de los árboles. Davis (1982) estudió el control con fungicidas sistémicos de la podredumbre de la raíz y del pie de cítricos causada por *Phytophthora*. Sus resultados mostraron que tanto las pulverizaciones foliares con fosetil-Al, como el pintado a tronco o el riego con metalaxil detuvieron significativamente el desarrollo de la lesión producida por el patógeno en troncos de árboles de 2 años. El tratamiento más efectivo para controlar lesiones en el tronco fue la técnica del pintado con metalaxil, siendo además el único tratamiento que controló *P. parasitica* en troncos de árboles de cinco años.

Timmer y Castle (1985) investigaron la efectividad de fosetil-Al y metalaxil contra *P. parasitica* en naranjo dulce, obteniendo que metalaxil aplicado vía riego o pintado al tronco fue muy efectivo en el control de *Phytophthora* en cítricos. Respecto a fosetil-Al, en algunos casos se observaron reducciones significativas del área de la colonia de *P. parasitica*.

Matheron y Matejka (1988) estudiaron la persistencia de la actividad sistémica de varios fungicidas en cítricos para controlar la “gomosis” causada por *Phytophthora*. Los resultados de su experimento revelaron que metalaxil aplicado como una pintura al tronco fue muy efectivo en el control de la enfermedad. Asimismo, fosetil-Al y H_3PO_3 aplicados al tronco fueron tan efectivos como metalaxil para controlar la enfermedad en tangelos y limoneros. Fungicidas tales como oxidixil, benalaxil y propamocarb dieron resultados inconsistentes.

Thomidis y Elena (2001) investigaron el efecto de cuatro fungicidas contra *P. cactorum* en melocotoneros, obteniendo que metalaxil pintado al tronco y aplicado al riego fue efectivo en la prevención de la enfermedad. Fosetil-Al fue también efectivo aplicado en riego y pintado al tronco. Sin embargo, su capacidad para controlar la enfermedad fue inconsistente. El dimetomorf y el cimoxanilo aplicados vía pintado al tronco o en el riego no fueron efectivos para el control de *Phytophthora* en melocotoneros. En ensayos de estrías de corteza, metalaxil suprimió el desarrollo de la enfermedad, y fosetil-Al, aunque redujo la colonización del patógeno, fue menos efectivo.

Matheron y Porchas (2002) compararon la capacidad de seis fungicidas en inhibir la “gomosis” de los cítricos causada por *Phytophthora*. Los resultados de su trabajo mostraron que metalaxil aplicado vía pintado al tronco fue altamente efectivo en el control de la enfermedad en troncos de cítricos. Fosetil-Al aplicado pintado al tronco era tan efectivo como metalaxil. En estrías de corteza, dimetomorf, fosetil-Al y metalaxil tuvieron altos niveles de supresión de la lesión causada por la enfermedad.

Browne y Viveros (2005) en ensayos de control para el manejo de chancros perennes causados por *P. cactorum* y *P. citricola* sobre almendro, encontraron que la longitud media de los chancros se reducía en un 22 – 98 % en árboles tratados con fosfonato antes de la inoculación respecto a los controles sin tratar. Tratamientos tópicos de fosetil-Al ó mefenoxam (el enantiómero R del metalaxil) sobre los chancros causados por ambas especies de *Phytophthora* redujeron la expansión de las lesiones en 36 al 88 %.

1.9. OBJETIVOS

Desde 2002, se ha observado en España una severa afección de árboles cítricos caracterizada por la formación de extensos chancros con exudaciones de goma sobre ramas y troncos de la variedad, ocasionando frecuentemente la muerte del árbol. Este síndrome se observó inicialmente en la provincia de Huelva afectando diversos cultivares de cítricos, principalmente del grupo de las mandarinas tales como Clemenules y Nour, híbridos como Nova y Fortune, y naranjas como Salustiana y Navelina. Posteriormente, esta enfermedad se ha observado en la Comunidad Valenciana afectando originalmente al cultivar Hernandina y, posteriormente a Clemenules, Marisol, Clemenpons, Fortune y Navelina.

A nivel mundial, son escasas y relativamente recientes las citas sobre afecciones en cítricos de similar sintomatología a la recientemente encontrada en España. Por tal motivo, se pretende abordar diferentes ensayos que permitan estudiar la etiología de la enfermedad, realizar estudios epidemiológicos y, ensayos de control de esta nueva enfermedad para alcanzar los siguientes objetivos:

Etiología

- Realizar una prospección en las principales zonas productoras de cítricos del país con miras a describir el síndrome, identificar al agente causal y comprobar su patogenicidad y agresividad en cultivares de cítricos.
- Buscar evidencias de un cambio poblacional en el patógeno estudiando las características morfológicas, fisiológicas y patogénicas de los aislados, la insensibilidad al metalaxil y al mefenoxam y la diversidad poblacional mediante herramientas moleculares.

Epidemiología

- Estudiar los cambios estacionales en la susceptibilidad de cultivares de cítricos a especies de *Phytophthora* *in vitro* e *in vivo* y establecer la influencia de los factores ambientales o del hospedante en el desarrollo de las infecciones.

- Establecer el papel que desempeñan los caracoles y las hormigas en el transporte y dispersión de inóculo de especies de *Phytophthora* desde el suelo hacia la parte aérea de los árboles.

Control

- Evaluar la eficacia preventiva y curativa de fosetil-Al, metalaxil (mefenoxam) y fungicidas antioomicetos de nueva generación contra las infecciones por *P. citrophthora* en ramas y seleccionar la técnica de aplicación más apropiada para el control de la enfermedad.
- Mejorar el control de las infecciones ocasionadas por *P. citrophthora* mediante una secuencia de aplicación de fungicidas.

Apartado I

Etiología

Capítulo 2

**Prospección de la enfermedad, tipificación del
síndrome e identificación del agente causal**

CAPÍTULO 2: PROSPECCIÓN DE LA ENFERMEDAD, TIPIFICACIÓN DEL SÍNDROME E IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL

2.1. INTRODUCCION

España produce aproximadamente 5,7 millones de toneladas de cítricos anualmente en un área aproximada de 300 000 ha; asimismo, es el primer país productor de la Unión Europea y el mayor exportador mundial para consumo en fresco (F.A.O., 2006). Las áreas de cultivo de cítricos en España están localizadas a lo largo de las zonas costeras del sur y este de la península siendo la Comunidad Valenciana la mayor zona productora del país.

Desde 2002, una inusual mortandad de árboles cítricos se ha detectado en la mayoría de las zonas productoras de España. La enfermedad se caracteriza por presentar chancros con exudaciones de goma en las ramas principales y secundarias del árbol y en el tronco. Estos chancros afectan a los tejidos de las ramas y el tronco pudiendo afectar a toda su circunferencia, produciendo finalmente la muerte del árbol. Las lesiones observadas en las ramas frecuentemente no están conectadas con infecciones en la parte inferior del árbol. En algunos casos los chancros son muy evidentes, y en otros, es necesario quitar la epidermis para descubrir las lesiones.

Varios factores abióticos y bióticos han sido descritos asociados a afecciones en ramas y troncos de árboles cítricos y producción de gomas. Los daños por heladas, el quemado solar o estrés hídrico pueden inducir este tipo de síntomas; en otros casos, las heridas producidas por estos fenómenos son aprovechadas por hongos ascomicetos o basidiomicetos para causar pudrición de la madera (Fawcett, 1936; Oren *et al.*, 2001). Sin embargo, estas pudriciones afectan principalmente al leño y no se asocian frecuentemente con la formación de goma. Por otro lado, la enfermedad “Rio Grande gummosis” ha sido citada afectando a corteza y madera de grandes ramas en diferentes zonas productoras de cítricos en los Estados Unidos. Los árboles afectados muestran resquebrajamientos de la corteza que liberan una goma color amarillo-pálida. Aunque un complejo de hongos ha sido asociado a esta enfermedad, su etiología es todavía incierta (Sonoda, 2000).

Adicionalmente, algunas enfermedades ocasionadas por virus o viroides, tales como psoriasis, exocortis y caquexia, se caracterizan también por la producción de gomas a través de rupturas de la corteza de árboles cítricos (Wallace, 1978).

Ante la aparición de este nuevo síndrome, en el presente apartado se propone abordar los siguientes objetivos: (i) ejecutar una amplia prospección de las principales zonas productoras de cítricos del país para establecer la presencia y distribución de esta enfermedad, (ii) describir el síndrome, (iii) identificar al agente causal, y (iv) determinar el rango de cultivares de cítricos afectados por la enfermedad.

2.2. MATERIALES Y METODOS

2.2.1. Prospección de la enfermedad en diversas zonas citrícolas españolas

Desde marzo de 2003 a diciembre de 2004 se prospectaron un total de 132 parcelas de diversos cultivares de cítricos en las principales zonas productoras del país. En unos casos, se acudió a la parcela para estudiar la enfermedad *in situ*, mientras que en otros, las muestras fueron enviadas al laboratorio por agricultores, técnicos de cooperativas o de los Servicios de Sanidad Vegetal para ser estudiadas.

En cada parcela, al menos cinco árboles cítricos se examinaron cuidadosamente. Un árbol se definió como afectado cuando presentó alguno de los siguientes síntomas: oscurecimiento de la corteza, exudación de gomas y/o necrosis interna de los tejidos afectados.

Los chancros se categorizaron de acuerdo a su presencia sobre el patrón, sobre la variedad, o en ambas zonas. Eventualmente, también se incluyeron muestras de raíces cuando se sospechó de daños en el sistema radicular. Los chancros observados en la zona de la variedad se clasificaron de acuerdo a su origen sobre el árbol: (i), infecciones iniciadas en el tronco, (ii), infecciones iniciadas sobre las ramas, e (iii), infecciones de origen no determinado (cuando las lesiones no pudieron asignarse a ninguna de las categorías anteriores debido a su avanzado estado de desarrollo).

2.2.2. Aislamiento de *Phytophthora* de árboles infectados y del suelo

Un total de 299 muestras se procesaron a partir de la prospección de las 132 parcelas visitadas. Zonas afectadas de las plantas incluyendo la zona límite de la lesión se seleccionaron para su análisis en laboratorio.

Una vez en el laboratorio, las muestras se lavaron con agua de grifo y se desinfectaron mediante una inmersión en etanol al 70% por espacio de 5 – 10 segundos y secadas sobre papel de filtro. Se seleccionaron tejidos afectados de 2 a 4 mm de ancho del frente de avance de la lesión y se sembraron sobre el medio selectivo PARBPH compuesto por medio CMA (agar harina de maíz) como medio base con 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de pimaricina, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de rifampicina, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de pentacloronitrobenzenu (PCNB), 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de benomilo y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de himexazol (Jeffers y Martin, 1986). Las placas se incubaron en estufa a 24 °C en oscuridad durante 2 a 3 días. De las colonias desarrolladas en este medio se extrajeron ápices hifales, los cuales se transfirieron a medio de cultivo PDA (patata dextrosa agar) y agar jugo V8 (2g CaCO_3 , 200 mL de jugo V8 y 15 g de agar en 800 mL de agua destilada).

Un total de 67 muestras de suelo se obtuvieron de las parcelas que presentaron mayor incidencia de la enfermedad. Estas muestras se tomaron en diferentes estaciones y se procesaron mediante la metodología descrita por Hendrix y Campbell (1970). Muestras de suelo (alrededor de

500 cm³) se extrajeron de cuatro cuadrantes bajo la línea de goteo de los árboles afectados a una profundidad de 10 - 20 cm. Dos a tres árboles por parcela se muestrearon de esta manera. La muestra total por parcela se mezcló y una pequeña porción se colocó en una manzana con 4 agujeros de 10 mm de diámetro y 15 mm de profundidad tapándose a continuación cada agujero con la parte superior de la zona extraída. Se utilizaron dos manzanas por parcela. Las manzanas procesadas se incubaron en oscuridad a 24 °C por espacio de 4 días. Tras la incubación, al desarrollarse podredumbre en la pulpa, se extrajeron pequeños fragmentos de la zona límite de la afección y se colocaron sobre medio PARBPH. El crecimiento miceliar resultante se transfirió a medio PDA y agar jugo V8 para su identificación.

2.2.3. Conservación de aislados

Cultivos puros de todos los aislados obtenidos a partir de ápices hifales se guardaron en colección. Se extrajeron alrededor de 15 discos de agar + micelio de cada cepa del margen de la colonia mediante un sacabocados de 5 mm previamente esterilizado. Los discos se colocaron en viales de vidrio de 12 cm³ conteniendo solución de extracto de suelo estéril para su conservación a 7 °C y 20 °C.

La solución de extracto de suelo estéril se preparó colocando en un erlenmeyer 100 gramos de suelo agrícola disuelto en 900 ml de agua destilada. La solución se agitó y se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente. Del sobrenadante se cogieron alícuotas de 50 ml para agregarse a 950 ml de agua destilada para completar un litro. La solución se distribuyó en viales de vidrio y se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

2.2.4. Identificación de los aislados de *Phytophthora*

Previo a los estudios de identificación, cada aislado mantenido en conservación se sembró en medio PDA. Para ello, en condiciones estériles se extrajo de 2 a 3 discos de inóculo de cada vial y se sembraron en el medio de cultivo. Las placas sembradas se incubaron por 3 días a 24 °C en oscuridad.

Los aislados de *Phytophthora* obtenidos se identificaron de acuerdo con la morfología de la colonia, características del micelio, temperaturas cardinales de crecimiento y producción, morfología y dimensiones de esporangios, oogonios y anteridios (Erwin y Ribeiro, 1996). Para los estudios de morfología de la colonia y temperaturas de crecimiento, se extrajeron discos de micelio de 5 mm de diámetro a partir del margen de crecimiento de la colonia obtenida, y se sembraron en placas conteniendo medio PDA. Las placas se incubaron a 5, 24 y 35 °C en oscuridad durante 7 días.

Los esporangios se obtuvieron extrayendo discos de 5 mm de diámetro de colonias de *Phytophthora* crecidas en medio agar jugo V8 durante tres días. Diez a doce discos se sumergieron en placas conteniendo 10 ml de 1,5% de solución de extracto de suelo estéril durante tres a cinco días a 24 °C con un fotoperíodo de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz blanca + ultravioleta cercana. Los aislados que no produjeron estructuras sexuales se aparearon en medio agar jugo V8 con aislados de referencia de los grupos de apareamiento A1 y A2 de *P. citrophthora* y *P. parasitica* (= *P. nicotianae*) (Erwin y Ribeiro, 1996), proporcionados por F. Panabières (INRA, Francia) y A. Ippolito (Universidad de Bari, Italia). La producción de órganos sexuales se estudió tras dos a seis semanas de incubación a 24 °C en oscuridad.

Doce aislados de *Phytophthora*, seleccionados en función de sus zonas geográficas, zona de aislamiento del árbol y cultivar de procedencia, se utilizaron para secuenciación (**Tabla 2.5**). La extracción del DNA se realizó a partir del micelio producido por cada aislado crecido en medio PDA, mediante el “kit” de extracción EZNA (Omega Bio-tek) siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Para amplificar por PCR el DNA ribosómico de las cepas de *Phytophthora* se utilizaron los oligonucleótidos *its5* e *its4* (White *et al.*, 1990). Estos cebadores amplifican una región (5.8S-ITS) del DNA ribosómico que contiene los espaciadores internos ITS1 e ITS2 y el gen que codifica el RNA ribosómico 5.8S. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) consistiendo en 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C. En cada reacción se utilizó una unidad de enzima DNA polimerasa termoestable (Netzyme, N.E.E.D. S.L), dNTPs a una concentración de 100 µM y los oligonucleótidos a una concentración de 0.2 µM, todo ello en el tampón de reacción suministrado por el proveedor.

La purificación de los fragmentos amplificados por PCR se realizó con el “kit” “High Pure PCR Product Purification” (Roche), siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Los fragmentos purificados se secuenciaron directamente, utilizando los cebadores *its5* e *its4* y el “kit” ABI PRISM TM, que utiliza terminadores marcados y la enzima Amplitaq DNA polimerasa (Perkin Elmer). El trabajo se realizó con el secuenciador automático ABI 373 DNA Sequencer. Las secuencias se alinearon con el programa CLUSTAL X y se compararon con las secuencias de *Phytophthora* existentes en la base de datos EMBL/GenBank.

2.2.5. Ensayos de patogenicidad

Ensayo de patogenicidad en frutos

Se realizó un ensayo preliminar para determinar la patogenicidad y agresividad de los aislados de *Phytophthora* sobre frutos. Para ello, se seleccionaron 28 aislados representativos en función de sus zonas de procedencia y cultivar de aislamiento (**Tabla 2.5**).

Previo a la inoculación se desinfectaron los frutos con alcohol etílico al 96 % y luego se colocaron dos discos de micelio del mismo aislado sobre cada fruto. Uno de los discos se colocó directamente sobre el fruto y el segundo sobre una herida incisa de aproximadamente 3 mm de longitud y 2 mm de profundidad realizada con bisturí.

Se realizaron cinco repeticiones (frutos maduros de naranja variedad Valencia Late) para cada aislado. Tras la inoculación, los frutos se incubaron en cámaras húmedas con un fotoperiodo de 12 horas de luz – 12 horas de oscuridad a 24 °C durante 7 días. Para la evaluación de los resultados de las inoculaciones se diseñó una escala basada en el porcentaje de superficie del fruto afectada por el patógeno con respecto al área total del mismo: 0 = Sin síntomas; 1 = 1-5%; 2 = 6-25%; 3 = 26-50%; 4 = 51-75% y 5 = 76-100%.

El procesamiento de datos se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de los promedios de índice de daño. La significación del experimento se realizó empleando el test de la Mínima Diferencia Significativa de Fisher-LSD (Least Significant Difference). Los datos fueron procesados utilizando el software estadístico Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics. Inc. Rockville - Maryland, USA).

Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 1)

En este ensayo se evaluó la susceptibilidad de diversos cultivares de cítricos frente al patógeno y la agresividad de los aislados seleccionados frente a los cultivares de cítricos utilizados. Para esta prueba se eligieron los ocho aislados que resultaron más agresivos en el ensayo anterior, cuatro de ellos de la Comunidad Valenciana y cuatro de la provincia de Huelva (**Tabla 2.6**).

El ensayo se llevó a cabo con plantas de cítricos de dos años de edad contenidas en macetas de 30 cm de diámetro de las variedades siguientes: mandarina Clementina (*C. clementina* Hort. ex Tan.) cvs. Clemenules, Hernandina y Nour; híbridos de clementina cvs. Fortune (*Citrus clementina* × *Citrus reticulata* Blanco) y Nova [*Citrus clementina* x (*C. paradisi* Macf. x *C. tangerina* Hort. ex Tan)]; y naranjo dulce cv. Navelina [*C. sinensis* (L.) Osbeck] injertados sobre citrange Carrizo [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *C. sinensis* (L.) Osbeck]. Las plantas se mantuvieron en invernadero a una temperatura entre 26 ± 2 °C y humedad relativa de alrededor del 90% durante todo el ensayo. El experimento se realizó mediante un diseño aleatorizado con 54 tratamientos (8 aislados + 1 testigo x 6 cultivares de cítricos) y 5 repeticiones (plantones) por tratamiento.

Para la inoculación, se emplearon cultivos de cinco días de crecimiento de cada aislado en medio PDA. A partir de la zona de avance de la colonia, con un sacabocados se extrajeron discos de agar de 5 mm de diámetro. Mediante el uso de un injertador se realizaron heridas longitudinales de aproximadamente 15 x 10 mm en la zona de la variedad de cada planta con la finalidad de separar la corteza de la madera pero manteniéndola unida por uno de los lados. Una vez realizada la herida, se levantó la corteza y se introdujo en el interior un disco de agar con micelio de cada

aislado. La herida se tapó con la corteza, se selló con parafilm y el conjunto se cubrió con papel de aluminio para evitar la desecación del inóculo. Los controles fueron inoculados utilizando discos de PDA estéril.

A los 60, 90 y 120 días después de la inoculación se midió la longitud de la lesión desarrollada externamente a partir del punto de inoculación; a este valor se le restó la longitud de la herida inicial de inoculación. Tras la última evaluación, se procedió al reaislamiento del patógeno en laboratorio a partir de una de las plantas de cada combinación mediante siembra de fragmentos del frente de avance de las lesiones en medio selectivo PARBPH.

Para el procesamiento de datos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de los valores de las longitudes de las lesiones de las tres evaluaciones. La significación del experimento se realizó empleando la prueba LSD. Los datos se procesaron mediante el software Statgraphics Plus 5.1.

Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 2)

En este ensayo se evaluó la susceptibilidad de diversas variedades y patrones comerciales de cítricos frente al patógeno y la agresividad de los aislados seleccionados frente a estos hospedantes.

Este ensayo se realizó en invernadero sobre árboles cítricos de tres años de edad crecidos en macetas de plástico (20 cm de diámetro x 25 cm de profundidad) conteniendo una mezcla de 75% de turba y 25 % de arena (vol/vol.). Los patrones citrange Carrizo y naranjo amargo (*C. aurantium* L.) y las variedades mandarina Clementina cv. Hernandina y naranjo dulce cv. Navelate, ambas injertadas sobre citrange Carrizo, se utilizaron como material vegetal. Las plantas se inocularon con cuatro aislados de *P. citrophthora* aislados de chancros en ramas y tronco de árboles cítricos seleccionados aleatoriamente en función del cultivar de aislamiento y localización geográfica. De la provincia de Huelva se utilizaron los aislados Phy 028 (aislado de la var. Nour) y Phy 033 (var. Nova), y de la provincia de Valencia el Phy 051 (var. Hernandina), y el Phy 075 (var. Fortune). Dos experimentos de similares características se llevaron a cabo en la primavera de 2005.

El proceso de inoculación de plantas se muestra en la **Figura 2.1**. La corteza del tallo de cada planta se desinfectó superficialmente con alcohol etílico 96 %. De esta zona se extrajo un disco de corteza mediante un sacabocados estéril de 5 mm de diámetro. En la herida se colocó, en contacto directo con el cambium expuesto, un disco de PDA de similar diámetro colonizado con el micelio del aislado respectivo, y la herida se tapó con el disco de corteza extraído. La zona de inoculación se humedeció con unas gotas de agua estéril, se envolvió con una cinta de parafilm y se cubrió el conjunto con papel de aluminio para proteger la zona inoculada de la desecación.

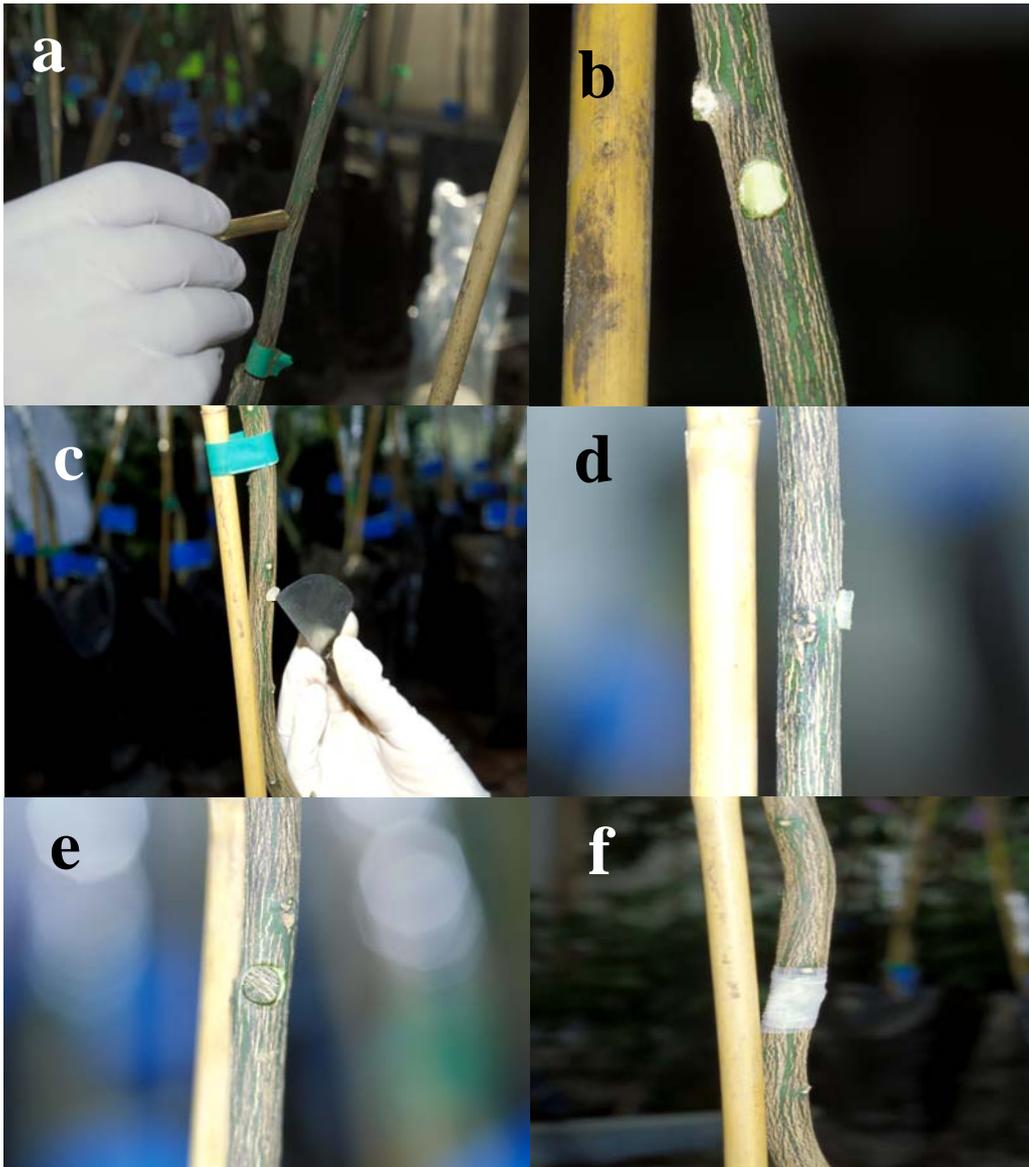


Figura 2.1. Inoculación de plántones de cítricos en invernadero con *P. citrophthora* (Ensayo 2). a. Extracción del disco de corteza, b. Herida tras la extracción del disco, c y d. Colocación de un disco de agar con inóculo sobre la herida, e. Disco de corteza sobre el inóculo, f. Cubrimiento con parafilm.

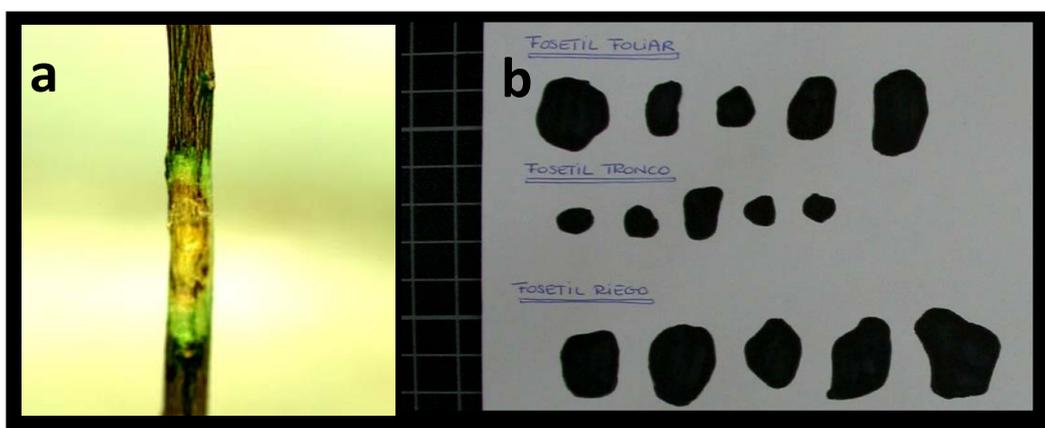


Figura 2.2. Evaluación del área de la lesión a. Área de la lesión. b. Área de las lesiones sobre papel.

Para cada combinación variedad - aislado se utilizaron 5 plantas. El control estuvo compuesto de cinco plantas adicionales de cada especie de cítrico, las cuales se inocularon con discos de PDA estéril. Las plantas inoculadas se distribuyeron al azar en el invernadero a 24 °C y alrededor del 100 % de humedad relativa. Las plantas se regaron y fertilizaron cuando fue necesario.

Tres semanas después de la inoculación se eliminó la corteza de cada planta inoculada alrededor de la zona de la herida. El área de la lesión resultante se delineó sobre una lámina de plástico transparente, se transfirió a una hoja de papel en blanco, y se digitalizó (**Figura 2.2**). Mediante el programa Assess (American Phytopathological Society, St. Paul MN), se cuantificó el área de la lesión de cada tratamiento mediante el análisis de imagen. El tamaño del área de la herida de inoculación se sustrajo del área total obtenida para calcular el tamaño real de la lesión. Para confirmar que las lesiones eran causadas por *P. citrophthora*, se hicieron siembras de los tejidos afectados en medio PARBPH de al menos dos plantas de cada combinación variedad - aislado.

El análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó para estudiar el efecto del cultivar, del aislado y su interacción sobre el área de la lesión. Las medias se separaron de acuerdo a la prueba LSD a $P < 0,05$ usando Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics. Inc. Rockville – Maryland, USA).

Ensayo de patogenicidad de árboles en campo

Este ensayo se llevó a cabo en dos fincas comerciales de mandarina Clementina cv. Hernandina injertadas sobre citrange Carrizo en El Puig (Valencia) y Castellón respectivamente, en la primavera de 2004. Los árboles tenían 7 años de edad en El Puig y 17 en Castellón. Los aislados de *P. citrophthora* Phy 033 y Phy 051 se usaron en este estudio.

Se inocularon cuatro ramas de alrededor de 25 mm de diámetro por árbol siguiendo el procedimiento de inoculación descrito en el ensayo anterior. Cada aislado se inoculó en cuatro árboles enmarcados en un diseño completamente al azar. El tratamiento control consistió en cuatro árboles inoculados con discos de PDA estéril. El promedio del área de la lesión para cada árbol se evaluó cuatro semanas después de la inoculación, y se siguió un proceso de evaluación similar al descrito en el ensayo anterior. Se realizaron reaislamientos en medio PARBPH a partir de las lesiones desarrolladas en ramas en, al menos, dos repeticiones de cada tratamiento para confirmar la presencia de *P. citrophthora*.

El análisis de la varianza (ANOVA) se usó para estudiar el efecto de cada aislado sobre el área de la lesión en cada parcela experimental utilizando el software Statgraphics Plus 5.1.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Síntomas de la enfermedad y cultivares afectados

La sintomatología observada en campo fue similar en todas las parcelas prospectadas. Los árboles afectados mostraban delgadas grietas y chancros en la corteza, acompañadas de necrosis del tejido interno (**Figura 2.3a**), a partir de la cual comúnmente se producía una exudación gomosa de color amarillo - pálido a marrón - rojizo (**Figura 2.3b**). Frecuentemente, estos chancros tenían como punto de origen la zona de inserción de las ramas (**Figura 2.3c**), a partir de las cuales la lesión se expandía hacia otras zonas de la copa del árbol (**Figuras 2.3d y 2.3e**). En sentido descendente, las lesiones afectaban al tronco, progresando la infección hacia las zonas más bajas del árbol (**Figura 2.3f**). Con cierta frecuencia se observaba una evidente línea de separación entre los tejidos sanos del patrón, en donde comúnmente no progresó la infección, y los tejidos necróticos de la variedad donde la infección fue más evidente y la destrucción de tejidos más rápida (**Figura 2.3g**). Algunos de los árboles afectados mostraban una flacidez generalizada de hojas (**Figura 2.3h**), la cual en algunos casos llegaba a afectar solamente a alguna de las ramas, pero manteniendo en todos los casos sus hojas y frutos. A partir del punto de infección, la necrosis progresaba hasta rodear completamente las ramas afectadas, o el tronco del árbol, ocasionando finalmente su muerte (**Figuras 2.3i y 2.3j**). En algunas parcelas la mortandad de árboles era muy alta (**Figura 2.3k**). La alta incidencia y severidad de esta enfermedad en algunas zonas cítricas ha ocasionado el arranque de plantaciones enteras por su baja rentabilidad (**Figura 2.3l**).

Los resultados obtenidos de la prospección de campos (**Tabla 2.1**), mostraron que los chancros fueron más frecuentes sobre la variedad que sobre el patrón (88,6 % y 7,6 % de los campos muestreados, respectivamente). En los chancros encontrados sobre la variedad predominaron los de origen en las ramas en 59,1 % de los casos, mientras que los encontrados en el tronco estuvieron en 29,5 % de los campos muestreados. En el 3,8 % de los campos prospectados el origen de las lesiones no pudo ser determinado debido al avanzado estado de desarrollo de las lesiones.

En la **Tabla 2.2** y **Figura 2.4** se muestra el rango de cultivares de cítricos afectados por la enfermedad. Mandarinas del grupo de las Clementinas y sus híbridos fueron los cultivares más afectados, agrupando el 63,3 % y 25,4 % respectivamente del total de los campos muestreados. Dentro del grupo de las clementinas, Hernandina fue el cultivar más afectado por la enfermedad, habiéndose detectado en el 51% de los campos muestreados, seguido por Clemenules y Nour con 21 y 18 % de campos afectados respectivamente (**Figura 2.5**). El número de campos afectados fue más bajo sobre naranjos y otras especies de cítricos.



Figura 2.3. Síntomatología de la enfermedad en campo. a, b, c, d y e. Ruptura de epidermis, exudación de gomas y lesiones sobre ramas primarias y secundarias; f. Progresión descendente de las lesiones hacia el patrón; g. Detención del desarrollo de lesión al entrar en contacto con el patrón.



Figura 2.3 (Continuación...). Síntomatología de la enfermedad en campo. **h.** Flacidez generalizada de hojas; **i.** Muerte de ramas primarias en el árbol; **j.** Muerte del árbol; **k.** Alta mortandad de árboles en las parcelas; **l.** Eliminación de plantaciones de cítricos por las altas mortandades de los árboles.

Tabla 2.1. Lugares de colección y categorización de los chancros de acuerdo a su origen en el árbol.

Provincias	Patrón	Número de campos		
		Variedad		
		Tronco	Ramas	No determinado ^Y
Alicante	1	2	3	-
Castellón	1	5	10	-
Valencia	4	16	29	3
Huelva	3	11	32	2
Murcia	-	3	4	-
Tarragona	1	2	-	-
Total	10	39	78	5
%^Z	7.6	29.5	59.1	3.8

^Y Lugar de infección no determinado, la lesión no pudo ser asignada a ninguna categoría debido a su avanzado estado de desarrollo.

^Z Respecto a 132 campos prospectados.

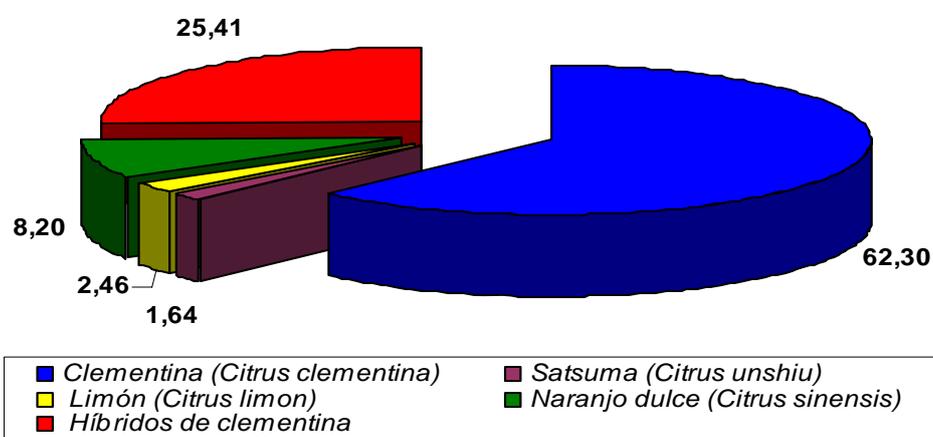


Figura 2.4. Distribución porcentual de grupos de cultivares de cítricos afectados por el síndrome de chancro en ramas y tronco.

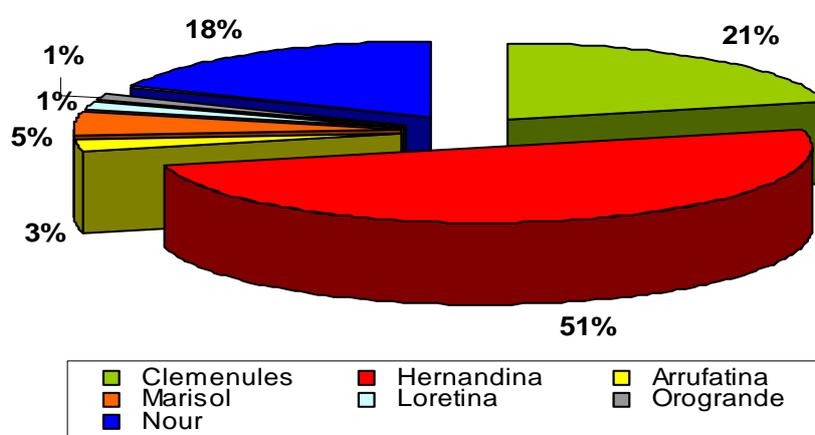


Figura 2.5. Distribución porcentual de cultivares de mandarina clementina y sus híbridos afectados por el síndrome de chancro en ramas y tronco.

Tabla 2.2. Lugares de colección y cultivares de cítricos afectados por el síndrome de chancros en ramas y tronco.

Variedades de cítricos afectadas		Provincias						Total
Variedad	Patrón	Alicante	Castellón	Valencia	Murcia	Huelva	Tarragona	
Clementina								76
Clemenules	Citrango Carrizo	-	-	5 ^Z	-	6	-	16
	Citrango Troyer	-	-	-	-	1	-	
	Naranja amargo	-	-	-	-	4	-	
Hernandina	Citrango Carrizo	1	4	20	-	4	-	38
	Citrumelo swingle	-	5	-	-	-	-	
	Cleopatra mandarin	-	4	-	-	-	-	
Arrufatina	Citrango Carrizo	-	-	2	-	-	-	2
Marisol	Citrango Carrizo	-	-	4	-	-	-	4
Loretina	Citrango Carrizo	-	-	1	-	-	-	1
Orogrande	Citrango Carrizo	-	-	-	-	1	-	1
Nour	Citrango Carrizo	-	-	-	-	14	-	14
Satsuma								
Okitsu	Citrango Troyer	-	-	-	2	-	-	2
Limón								
Verna	Naranja amargo	-	-	-	3	-	-	3
Naranja dulce								10
Navelina	Citrango Carrizo	-	-	5	-	-	-	6
	Citrango Troyer	-	-	1	-	-	-	
Navel-late	Citrango Carrizo	-	-	-	-	1	-	2
	LimónVolkameriana	-	-	-	-	1	-	
Newhall	Naranja amargo	-	-	-	2	-	-	2
Híbridos								31
Nova	Citrango Carrizo	-	-	-	-	5	-	5
Fortune	Citrango Carrizo	1	-	9	-	5	-	26
	Citrumelo swingle	-	-	-	-	-	2	
	Mandarino Cleopatra	3	2	1	-	-	-	
	LimónVolkameriana	-	-	-	-	3	-	
Patrones de cítricos afectados		Provincias						Total
Patrones	Variedades	Alicante	Castellón	Valencia	Murcia	Huelva	Tarragona	
Citrango Carrizo	Hernandina	-	1	2	-	-	-	10
	Clemenules	-	-	-	-	2	-	
	Fortune	1	-	1	-	1	1	
	Navelina	-	-	1	-	-	-	
Total de campos de cítricos		6	16	52	7	48	3	132

^Z Los valores representan el número de campos de las provincias y cultivares correspondientes en los que se detectó el síndrome de chancro en ramas y tronco.

2.3.2. Identificación de especies de *Phytophthora* en árboles afectados

Dos especies de *Phytophthora* se aislaron de las 132 parcelas prospectadas. Cepas de *Phytophthora* pertenecientes a un primer grupo fueron aisladas de puntos de infección en las ramas y del tronco, tanto de la zona de la variedad como del patrón. Este primer grupo de aislados mostraron un patrón de crecimiento tipo petaloide a 24 °C sobre PDA y carentes de micelio aéreo, apreciándose además diferencias en las tasas de crecimiento de los aislados. Morfológicamente, los esporangios fueron papilados o semipapilados con una o dos papilas, no caducos, no proliferantes y con simpodios de 2 a 3 esporangios frecuentemente unidos lateralmente al esporangióforo. El tamaño de los esporangios fue de (34,5-) 40,8 (-94,3) x (19,3-) 29,5 (-58,6) μm . El ratio Longitud/Anchura (L:A), fue de (1,2:1-) 1,4:1 (-1,8:1). La forma dominante de los esporangios fue obpiriforme; no obstante, se encontraron otras formas de esporangio. Algunos aislados produjeron clamidosporas, las cuales fueron terminales o intercalares y promediaron un diámetro de 29,6 μm ; sin embargo, otros aislados no presentaron estas estructuras. En las pruebas de temperatura todos los aislados llegaron a crecer a 5 °C, pero ninguno lo hizo a 35 °C. El apareamiento de estos aislados con las cepas de referencia A1 y A2 de *P. citrophthora* y *P. parasitica* no indujo la formación de estructuras sexuales. Basándose en las características culturales, morfológicas y fisiológicas estudiadas, todos los aislados de este grupo se identificaron como *P. citrophthora* (Erwin y Ribeiro, 1996).

Un segundo grupo de aislados de *Phytophthora* se obtuvo a partir de lesiones en tronco tanto de la zona de la variedad como del patrón. Estos aislados presentaron un micelio algodonoso, aéreo, ligeramente estriado y de crecimiento más lento que los aislados del grupo anterior. Ninguno de los aislados de este grupo creció a 5 °C, pero lograron crecer a 35 °C. Los esporangios fueron papilados, predominantemente ovoides u obpiriformes (34,7-) 40,2 (-51,4) x (25,9-) 30,6 (-35,7) μm con un ratio L:A de (1,3:1-) 1,4:1 (-1,5:1). En todos los aislados estudiados se formaron clamidosporas. Todos los aislados de este grupo formaron estructuras sexuales cuando se aparearon con el grupo de apareamiento opuesto A1 ó A2. Éstos tuvieron oogonios esféricos y lisos (27,0-) 30,2 (-32,2) μm de diámetro, anteridio anfígeno, y oosporas apleróticas de 27,5 a 28,8 μm de diámetro. Todas estas características llevaron a clasificar estos aislados dentro de *P. parasitica* (Erwin y Ribeiro, 1996).

Los resultados anteriores se confirmaron con la identificación molecular, para lo cual se utilizó la secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del DNA ribosómico nuclear. Los productos de PCR obtenidos con los cebadores *its4* e *its5* tuvieron un tamaño aproximado de 850 pb y se secuenciaron en las dos cadenas. Las secuencias resultantes se compararon con las depositadas en la base de datos del GenBank, utilizando el programa BLAST (National Center for Biotechnology Information, USA). Los resultados de este análisis confirmaron la identificación de las especies de *Phytophthora* mencionadas.

De las 12 cepas utilizadas para secuenciación, diez de ellas pertenecientes al primer grupo, mostraron homologías del 100% con las secuencias de los números de acceso siguientes: AY228566 (4 aislados); AY228567 (1 aislado); AY228570 (1 aislado); AY228571 (2 aislados) y AY228577 (2 aislados) todas ellas identificadas como *P. citrophthora* y procedentes de cítricos de Córcega, Francia. Las dos cepas restantes, pertenecientes al segundo grupo, se identificaron como *P. parasitica* y mostraron 100 % de homología con el número de acceso EC912127 de secuencias depositadas de *P. parasitica*.

Los aislados de *P. citrophthora* no produjeron oosporas aún después de una prolongada incubación, siendo considerados por tal motivo como estériles. En contraste, el 62% de los aislados de *P. parasitica* fueron del grupo de apareamiento A1 y el restante 38% fueron A2.

2.3.3. Frecuencia de aislamiento de especies de *Phytophthora* en árboles afectados

Los resultados obtenidos mostraron que el 5,3% (7/132) de las parcelas muestreadas presentaron mayoritariamente lesiones en la zona del patrón. El 24,2% (33/132) de las parcelas presentaron chancros localizados principalmente en el tronco, y 59,1% (78/132) presentaron lesiones en ramas (**Tabla 2.3**).

P. citrophthora se aisló de 123 parcelas (**Tabla 2.3**), de las cuales, en 114 de ellas (86,4% del total de campos) fue la única especie recuperada de todas las zonas de muestreo; 109 campos tuvieron infecciones en la variedad y 5 campos tuvieron infecciones en el patrón. Chancros causados en la variedad por esta especie tuvieron su origen sobre las ramas en 59,1% de los campos muestreados, 19,7% en el tronco, y 3,8% no pudo ser incluido en ninguna de estas categorías.

P. parasitica se aisló de 18 parcelas (**Tabla 2.3**) y en 9 de ellas fue la única especie recuperada (6,8% del total de campos). Siete parcelas presentaron chancros en tronco (5,3% del total de campos), y dos de ellas presentaron lesiones en el patrón (1,5% del total de campos). En ningún caso se aisló *P. parasitica* de chancros en ramas. Coinfecciones entre *P. citrophthora* y *P. parasitica* se observaron en nueve campos, seis con chancros en el tronco y tres con chancros en el patrón.

2.3.4. Frecuencia de aislamiento de especies de *Phytophthora* en suelo de parcelas afectadas

Este estudio se llevó a cabo en 67 de las parcelas muestreadas. *Phytophthora* spp. se recuperaron del 82,1% de las muestras de suelo analizadas (**Tabla 2.4**). *P. citrophthora* y *P. parasitica* se identificaron en 55,2% y 26,8% de los campos muestreados, respectivamente. *P. citrophthora* se aisló del suelo de campos de cítricos en todas las provincias estudiadas. *P. parasitica* se aisló también de todas las provincias excepto Murcia.

Tabla 2.3. Lugares de colección, especies de *Phytophthora* aisladas, y categorización de los chancros de acuerdo a su origen en el árbol.

Provincias	Número de parcelas							
	<i>P. citrophthora</i>				<i>P. parasitica</i>			
	Variedad		No		Variedad		No	
	Patrones	Tronco	Ramas determinado ^y	Patrones	Tronco	Ramas determinado	Patrones	Tronco
Alicante	1	2	3	-	-	-	-	-
Castellón	-	3	10	-	1	-	-	-
Valencia	2	11	29	3	4	-	1	1
Huelva	2	7	32	2	1	-	1	1
Murcia	-	3	4	-	-	-	1	3
Tarragona	-	-	-	-	1	-	-	-
Total	5	26	78	5	2	7	-	1
%^z	3.8	19.7	59.1	3.8	1.5	5.3	-	3
								2.3
								4.5

^y Lugar de infección no determinado, la lesión no pudo ser asignada a ninguna categoría debido a su avanzado estado de desarrollo.

^z Los valores son el % de los 132 campos prospectados.

Tabla 2.4. Especies de *Phytophthora* aisladas de suelo de parcelas de cítricos.

Provincias	Número de parcelas	Número de parcelas con aislamientos exitosos a partir del suelo	
		<i>P. citrophthora</i>	<i>P. parasitica</i>
Alicante	6	4	2
Castellón	15	8	4
Valencia	26	16	5
Huelva	8	2	1
Murcia	7	4	-
Tarragona	5	3	6
Total	67	37	18
% ^z		55.2	26.8

^z Los valores son el % de 67 parcelas prospectadas.

2.3.5. Ensayos de patogenicidad

Ensayo de patogenicidad en frutos

En frutos cítricos inoculados mediante herida no pudo realizarse un análisis de la agresividad de las cepas debido a las extensas lesiones en la zona de inoculación, sin diferencia aparente entre los diversos aislados. Por tal motivo, la evaluación de la agresividad de los aislados se realizó en función de las lesiones producidas en las inoculaciones sin herida. El índice de daño (ID) osciló entre 0,2 y 3,0. El análisis de datos de este ensayo mostró diferencias estadísticas significativas de agresividad entre los aislados ensayados de acuerdo a la prueba de significación LSD (**Tabla 2.5**). No se observó influencia de la zona geográfica de procedencia de las cepas respecto a su agresividad.

Dentro de las categorías convencionales de agresividad, ocho de los aislados fueron limitadamente agresivos (Índice de daño, I.D. $\leq 0,5$), diez tuvieron una agresividad intermedia (I.D.: 0,5 - 1,9) y los diez restantes fueron altamente agresivos (I.D.: $\geq 2,0$). Ocho de los aislados más agresivos de este ensayo y que no mostraron entre sí diferencias estadísticas significativas, cuatro de la Comunidad Valenciana (Phy 005, Phy 051, Phy 053 y Phy 058) y cuatro de la provincia de Huelva (Phy 027, Phy 030, Phy 033 y Phy 009), se seleccionaron para el ensayo de inoculación de plantones.

Tabla 2.5. Patogenicidad de aislados de *P. citrophthora* de diversos orígenes geográficos en frutos de naranja cv. Valencia Late inoculadas sin herida.

Aislado	ID ^x	LSD	Localidad	Provincia	Zona de aislamiento	Procedencia
Phy 031 ^w	0,2	a ^y	Gibraleón	Huelva	Ramas	Nour/Carrizo ^z
Phy 032	0,2	a	Silla	Valencia	Ramas	Fortune/Carrizo
Phy 013	0,3	a	Cartaya	Huelva	Ramas	Fortune/Volkameriana
Phy 057 ^w	0,4	a	Ribaroja	Valencia	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 003 ^w	0,4	a	Onda	Castellón	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 004	0,4	a	Onda	Castellón	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 065 ^w	0,5	a	Isla Cristina	Huelva	Ramas	Fortune/Volkameriana
Phy 008	0,5	a	Zalamea	Huelva	Ramas	Fortune/Volkameriana
Phy 041	0,6	ab	Nerva	Huelva	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 064 ^w	0,8	abc	Nerva	Huelva	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 056	0,8	abc	Ribaroja	Valencia	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 049 ^w	1,0	abcd	Villareal	Castellón	Ramas	Hernandina/Citrumelo
Phy 017	1,0	abcd	Zalamea	Huelva	Ramas	Clemenules/amargo
Phy 059	1,0	abcd	Ribaroja	Huelva	Ramas	Clemenules/Carrizo
Phy 001	1,0	abcd	Onda	Castellón	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 055	1,4	bcdef	Burriana	Castellón	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 044 ^w	1,6	bcdef	Alquerías	Castellón	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 054 ^w	1,8	cdefg	Burriana	Castellón	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 026	2,0	efgh	Nerva	Huelva	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 020	2,2	efghi	Zalamea	Huelva	Ramas	Clemenules/amargo
Phy 058 ^w	2,2	efghi	Ribaroja	Valencia	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 009 ^w	2,2	efghi	Cartaya	Huelva	Ramas	Fortune/Volkameriana
Phy 030	2,2	efghi	Gibraleón	Huelva	Ramas	Nour/Carrizo
Phy 027	2,4	fghi	Zalamea	Huelva	Ramas	Clemenules/amargo
Phy 005	2,6	ghi	Onda	Castellón	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 033 ^w	2,8	hi	El Campillo	Huelva	Ramas	Nova/Carrizo
Phy 053	2,8	hi	Burriana	Castellón	Ramas	Hernandina/Carrizo
Phy 051 ^w	3,0	i	Alquerías	Castellón	Ramas	Hernandina/Citrumelo

^w Aislados secuenciados

^x I.D. Índice de daño en una escala de 0 (sin síntomas) a 5 (76-100 % de superficie del fruto afectado) a los 7 días de la inoculación.

^y En la misma columna, números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de significación LSD (P<0,05).

^z Variedad/Patrón.

Tabla 2.6. Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 1). Longitud media (cm) de las lesiones ocasionadas por aislados de *P. citrophthora* sobre diversos cultivares de cítricos.

Aislado	Cultivares																	
	Clemenules			Fortune			Hernandina			Navelina			Nour			Nova		
	1 ^a eval. ^w	2 ^a eval. ^x	3 ^a eval. ^y	1 ^a eval.	2 ^a eval.	3 ^a eval.	1 ^a eval.	2 ^a eval.	3 ^a eval.	1 ^a eval.	2 ^a eval.	3 ^a eval.	1 ^a eval.	2 ^a eval.	3 ^a eval.	1 ^a eval.	2 ^a eval.	3 ^a eval.
Phy 005	1,10 ^z	1,95	4,00	0,82	1,85	3,78	1,94	2,50	3,50	0,78	1,63	3,10	0,46	2,75	4,00	1,86	2,50	4,90
Phy 009	1,42	2,43	3,48	1,18	1,43	3,65	0,84	2,18	4,18	0,98	1,00	3,73	0,46	0,90	5,30	1,16	2,03	5,80
Phy 027	1,70	2,98	3,30	1,50	1,20	3,65	1,88	1,88	4,20	1,64	2,77	4,33	1,42	2,15	2,95	1,08	1,16	3,45
Phy 030	1,24	1,80	3,55	0,82	2,10	3,02	1,24	1,68	3,65	1,04	1,48	3,28	0,78	0,78	3,80	2,68	3,05	4,80
Phy 033	1,74	1,93	4,03	1,16	1,23	3,71	1,88	2,18	3,85	1,54	1,61	3,67	4,48	4,48	4,48	0,88	3,87	6,13
Phy 051	3,02	3,10	4,55	1,06	2,10	3,43	2,86	3,00	4,50	1,17	1,23	3,47	5,34	5,34	5,34	2,66	7,84	9,30
Phy 053	0,64	1,8	3,70	1,02	1,55	3,53	0,60	2,43	3,37	0,24	0,58	3,00	0,20	2,10	4,20	2,74	1,68	3,58
Phy 058	1,02	2,50	3,11	0,94	2,35	3,38	1,2	1,35	3,93	0,58	1,83	3,73	0,78	1,45	4,80	0,90	2,50	2,95
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^w Observaciones a los 60 días de la inoculación

^x Observaciones a los 90 días de la inoculación

^y Observaciones a los 120 días de la inoculación

^z Cada dato es la media de 5 repeticiones.

Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 1)

En la **Tabla 2.6** se muestran los resultados obtenidos en este experimento. El estudio de susceptibilidad entre cultivares de cítricos detectó diferencias estadísticas significativas entre los cultivares estudiados de acuerdo a la prueba de significación LSD (**Tabla 2.7**). Los datos de las medias de longitud de lesión muestran un aumento de las lesiones en función de las fechas de evaluación.

En la primera evaluación (60 días después de la inoculación, ddi), los cultivares más susceptibles fueron Nova, Nour, Hernandina y Clemenules sin diferencias estadísticas significativas entre ellos. Nova y Nour (los cultivares más susceptibles a la infección) fueron los únicos que difirieron significativamente de Navelina y Fortune (los cultivares menos susceptibles a la infección). En la segunda evaluación (90 ddi), el cultivar Nova obtuvo los promedios de área de lesión más altos y sólo fue estadísticamente diferente a Navelina y Fortune, con las demás variedades no se encontró diferencias significativas. En la tercera evaluación (120 ddi) no se encontró diferencias estadísticas entre Nova y Nour; sin embargo, Nova siendo el cultivar más susceptible a la infección fue el único que resultó estadísticamente diferente a los cultivares Clemenules, Fortune, Hernandina y Navelina.

Tabla 2.7. Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 1): Susceptibilidad de cultivares frente al conjunto de aislados de *P. citrophthora* inoculados.

Cultivar	Días después de la inoculación (ddi)		
	Longitud de lesión (cm)		
	1ª evaluación (60 ddi)	2ª evaluación (90 ddi)	3ª evaluación (120 ddi)
Clemenules	1,49 ^Y ab ^Z	2,31 ab	3,71 a
Fortune	1,06 a	1,73 a	3,52 a
Hernandina	1,56 ab	2,15 ab	3,90 a
Navelina	1,00 a	1,52 a	3,54 a
Nour	1,74 b	2,49 ab	4,36 ab
Nova	1,75 b	3,08 b	5,08 b

^Y Cada dato es media de 40 repeticiones.

^Z En la misma columna, números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de significación LSD ($P < 0,05$).

En la **Tabla 2.8**, se muestra los valores de longitud de lesión de los aislados de *P. citrophthora* utilizados sobre el conjunto de cultivares de cítricos. La prueba de significación LSD mostró diferencias significativas entre aislados, siendo Phy 051 de Alquerías (Castellón) y Phy 033 de El Campillo (Huelva) los que mostraron mayores promedios de longitud de lesión en todas las evaluaciones. A excepción de la primera evaluación, en el resto de evaluaciones todos los aislados fueron estadísticamente superiores al tratamiento control.

Tabla 2.8. Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 1): Agresividad media de aislados de *P. citrophthora* sobre el conjunto de cultivares de cítricos estudiados.

Aislado	Días después de la inoculación (ddi)					
	Longitud de lesión (cm)					
	1ª evaluación		2ª evaluación		3ª evaluación	
Phv 005	1,16 ^Y	ab ^Z	2,20	bc	3,88	b
Phy 009	1,01	ab	1,66	b	4,31	bc
Phy 027	1,54	bc	2,02	bc	3,65	b
Phy 030	1,30	b	1,82	bc	3,68	b
Phy 033	1,95	bc	2,55	c	4,32	bc
Phy 051	2,69	c	3,77	d	5,10	c
Phy 053	0,91	ab	1,69	b	3,56	b
Phy 058	0,90	ab	1,98	bc	3,65	b
Control	0,00	a	0,00	a	0,00	a

^Y Cada dato es media de las respectivas longitudes de lesión de 6 cultivares.

^Z En la misma columna, números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de significación LSD ($P < 0,05$).

Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 2)

La **Tabla 2.9** muestra el análisis ANOVA de los dos experimentos de inoculación sobre plantones de cítricos. No se detectaron diferencias en cuanto a la significación de los factores estudiados y sus respectivas interacciones en las dos pruebas realizadas ($P > 0,05$); por esta razón, los datos de las medias obtenidas de los dos ensayos se combinaron. En ambos experimentos el efecto de los factores “material vegetal” (patrones y variedades) y “aislado”, fue estadísticamente significativo en el análisis ANOVA ($P < 0,05$) (**Tabla 2.9**); sin embargo, su interacción no resultó significativa ($P > 0,05$).

El promedio del área de lesiones fue menor en patrones que en variedades (**Figura 2.6**). Las áreas de lesión en los patrones variaron de 0,06 cm² en citrange Carrizo inoculado con Phy 028 a 0,88 cm² en naranjo amargo inoculado con Phy 033. Las variedades mostraron promedios de área de lesión más altos, variando de 1,19 cm² en naranjo dulce cv. Navel Late inoculado con Phy 028 a 16,18 cm² en mandarina Clementina cv. Hernandina inoculado con Phy 051. Ningún síntoma se observó en las plantas control.

Ensayo de patogenicidad de árboles en campo

El análisis ANOVA muestra que hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (aislados de *Phytophthora* y el control) en ambas parcelas de estudio ($P < 0,05$) (**Tabla 2.10**). Sin embargo, no se registraron diferencias estadísticas significativas de agresividad entre los aislados utilizados. El promedio de las áreas de lesión varió de 17,2 cm² en el campo de El Puig con el aislado Phy 051, a 23,1 cm² en el campo de Castellón con el aislado Phy 033. No se registraron lesiones en los tratamientos control (**Tabla 2.10**).

Tabla 2.9. Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 2): Susceptibilidad de patrones y variedades frente a aislados de *P. citrophthora*.

Fuente	Valor de P	
	Experimentos	
	1	2
Ef. principales		
A : Material vegetal	0,0099	0,0003
B : Aislado	0,0105	0,0056
Interacción		
A x B	0,0799	0,0981

Aislado	Patrones		Cultivares		Media del aislado
	Citrango carrizo	Naranja amargo	Hernandina	Navel-Late	
Phy 075	1,45 ^Y	0,74	8,85	3,94	3,75 bc ^Z
Phy 051	1,15	0,84	16,18	4,89	5,77 c
Phy 033	0,86	0,88	1,18	7,39	2,58 b
Phy 028	0,06	0,19	1,08	1,19	0,63 a
Control	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 a
Media del material vegetal	0,88 a ^Z	0,66 a	6,82 b	4,35 b	

^Y Área de lesión en cm² a los 21 días de la inoculación. Cada dato es media de 5 repeticiones.

^Z Números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de significación LSD ($P < 0,05$).

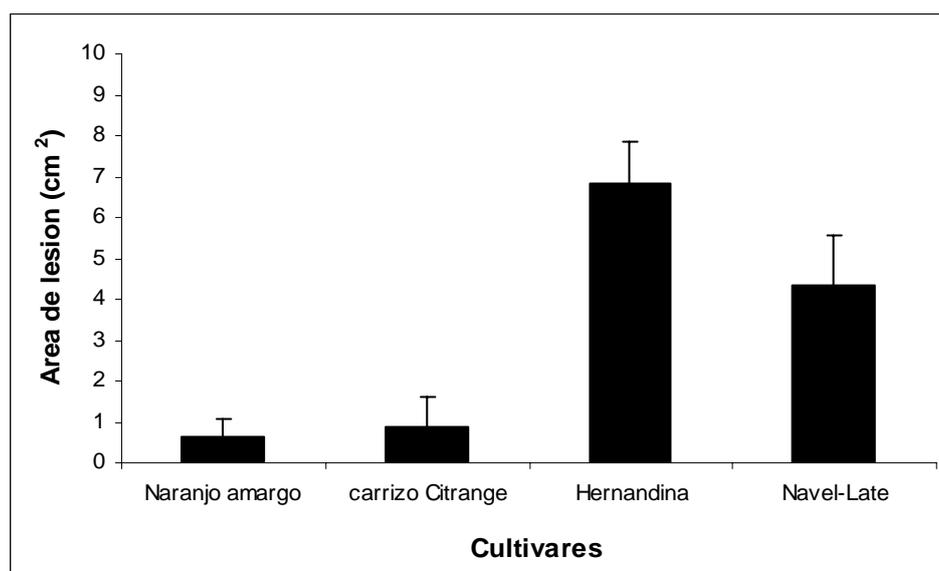


Figura 2.6. Ensayo de patogenicidad de plantas en invernadero (Ensayo 2). Área media de lesión en variedades y patrones frente al conjunto de aislados de *P. citrophthora*.

Tabla 2.10. Ensayo de patogenicidad de árboles en campo: Susceptibilidad de Clementina var. Hernandina frente a dos aislados de *P. citrophthora*.

Fuente	Valor de P	
	Castellón (Castellón)	El Puig (Valencia)
Tratamientos	0,0017	0,0034

Aislado	Parcela	
	Castellón	El Puig
Phy 033	23,1 ^Y b ^Z	18,1 b
Phy 051	18,6 b	17,2 b
Control	0,0 a	0,0 a

^Y Área de lesión en cm². Cada dato es media de 5 repeticiones.

^Z Números seguidos de la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes según la prueba LSD (P<0,05)

2.4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que *P. citrophthora* es el agente causal de esta nueva enfermedad en cítricos en España. La prospección de campos realizada en este estudio es el primer trabajo a amplia escala conducido en el país para establecer la etiología y la magnitud de esta enfermedad.

Tradicionalmente, las especies de *Phytophthora* han sido uno de los agentes patógenos de mayor importancia en las zonas cítricas a nivel mundial. Diez especies han sido citadas como patógenas en cítricos, pudiendo afectar a todas las partes del árbol: raíces, tronco, ramas, frutos y brotes (Erwin y Ribeiro, 1996). De ellas, la pudrición de raíces, la pudrición del pie y la “gomosis” son los síndromes más comúnmente observados en cítricos a nivel mundial, que se inician en las raíces, o en la base del tronco y se presentan cuando los propágulos de *Phytophthora* se diseminan alrededor del tronco cerca del nivel del suelo, infectando heridas o grietas de crecimiento produciendo lesiones que pueden extenderse a la zona de unión con el patrón. Los árboles más afectados detienen su crecimiento y puede producirse defoliación y seca de brotes.

Si la enfermedad es severa, el árbol puede morir, siendo los árboles jóvenes frecuentemente más afectados que los adultos (Fawcett, 1936; Sandler *et al.*, 1989; Graham y Menge, 1999). En España, las especies *P. parasitica* y *P. citrophthora* están ampliamente distribuidas en todas las plantaciones cítricas del país como los agentes causales de la “gomosis”, “podredumbre del cuello” y “aguado de los frutos” (Tuset, 1977 y 1983; Tuset *et al.*, 1990).

Sin embargo, existen escasas citas de afecciones de ramas en cítricos ocasionadas por este grupo de patógenos. Fawcett (1936) describió daños causados por *Phytophthora* en todas las partes del árbol, desde las raíces hasta las zonas más altas de la copa en pomelos en la provincia del Cabo (Sudáfrica). Este autor observó un caso similar en Egipto, donde las lesiones e árboles afectados por *Phytophthora* comenzaron en el tronco a nivel del suelo, progresando hacia las ramas.

Graham y Menge (1999), en referencia a la “seca de la copa” de los cítricos, indicaron que en zonas lluviosas podrían formarse chancros en ramas en especies susceptibles como el limonero. En Belice, en árboles que han quedado totalmente cubiertos por el agua durante inundaciones, *Phytophthora* causó lesiones con gomosis sobre las ramas principales (Gutiérrez, 2003).

El estudio de la sintomatología de esta enfermedad en España permitió concluir que el punto de infección más común son las ramas, sin conexión con infecciones en la parte inferior del árbol, permaneciendo comúnmente los patrones sanos. Los mecanismos mediante los cuales se produce la dispersión de *P. citrophthora* hacia las ramas es desconocido.

En Córcega (Francia), en los últimos años se han observado fuertes ataques de *P. citrophthora* asociados a gomosis en la zona de la variedad de árboles cítricos (Cohen *et al.*, 2003). Sus investigaciones evidenciaron la existencia de cuatro grupos poblacionales dentro de *P. citrophthora* en esta zona citrícola. El grupo 1 fue el mayoritario y estuvo compuesto por aislados sexualmente estériles y catalogado como el grupo poblacional residente o más antiguo. Por el contrario, el grupo 2 estuvo conformado por aislados heterotálicos del grupo de apareamiento A2. Los grupos 3 y 4 fueron grupos minoritarios dentro de la población y semejantes molecularmente al grupo 1. Patogénicamente, aislados del grupo 1 fueron más agresivos sobre patrones que sobre variedades; contrariamente, aislados del grupo 2 fueron más agresivos a variedades que sobre patrones (Vernière *et al.*, 2004). Estos autores afirman que se han producido modificaciones importantes en la estructura poblacional de *P. citrophthora* en esta zona citrícola a través del tiempo.

Schutte (2006) observó en cítricos de Sudáfrica un caso similar al observado en España y estrechamente ligado a las clementinas. Esta enfermedad, denominada “dieback” de las clementinas es ocasionada por *P. citrophthora* y se extiende a lo largo de la línea costera de Sudáfrica. Los estudios actuales sobre esta grave enfermedad se centran en medidas de control químico. Recientemente este síndrome ha sido detectado también en algunas zonas citrícolas de América del Sur como Argentina, afectando a árboles de limonero (C.G. Schutte, comunicación personal) y de Brasil sobre árboles de Tangerina cv. Ponkan (J. A. Ventura, comunicación personal). En ambos casos la enfermedad es ocasionada por *P. citrophthora*.

En España, las clementinas y sus híbridos son los cultivares más afectados por esta enfermedad, constituyendo el 83,6% del total de campos afectados estudiados. Los ensayos de patogenicidad realizados tanto en campo como de invernadero, muestran que las clementinas y sus híbridos son muy susceptibles a esta enfermedad. A nivel de campo, dentro de los cultivares de clementina estudiados, Hernandina presentó la mayor incidencia y severidad de la enfermedad en la Comunidad Valenciana. Sin embargo, a nivel experimental los resultados obtenidos no son consistentes con esta observación, lo cual es evidente en el primer ensayo de patogenicidad en donde al inocularse Clementinas e híbridos, Hernandina no resultó ser uno de los cultivares más afectados.

Ello podría deberse a que con el método de inoculación utilizado (alojamiento directo del patógeno en el interior de la corteza) se están obviando los pasos de reconocimiento y penetración en el hospedante, etapas claves en el proceso de infección y en las que, bajo condiciones naturales, *Hernandina* aparentemente es más susceptible. Sin embargo, en relación a otros grupos de cítricos como por ejemplo, las naranjas, si se ha observado una mayor susceptibilidad de las Clementinas a la infección, como se muestra en los dos ensayos de patogenicidad en invernadero. Los resultados de las prospecciones y de los ensayos de patogenicidad indicarían que existe un componente genético que incidiría en una mayor susceptibilidad de las clementinas e híbridos frente a las infecciones por *Phytophthora*.

Enfermedades ocasionadas por *Phytophthora* en cítricos son conocidas en España desde el siglo XIX. Aunque el agente causal no fue correctamente identificado debido al desconocimiento de la biología y metodologías de diagnóstico de especies de *Phytophthora*, una severa epidemia de pudrición de raíces y del cuello de la planta de árboles cítricos se citó a finales del siglo XIX en las islas Baleares y en la provincia de Castellón (Bou, 1879; Rullán, 1896). En aquel tiempo, se utilizaban patrones susceptibles tales como naranjo dulce, limón (*C. limon* L.) y cidra (*C. medica* L.). Los síntomas descritos de esta epidemia consistieron en gomos y lesiones iniciadas en las raíces, progresando hacia el tronco. En respuesta a este problema, los agricultores introdujeron el patrón naranjo amargo debido a su alta tolerancia a la enfermedad. Su importancia se incrementó progresivamente durante las siguientes décadas, siendo prácticamente el único patrón utilizado en la citricultura española hasta la aparición del virus de la tristeza de los cítricos (*citrus tristeza closterovirus*, CTV) en 1957 (Cambra *et al.*, 2000). Durante los siguientes 40 años, un total de 40 millones de árboles injertados sobre naranjo amargo se remplazaron progresivamente por patrones tolerantes a CTV. Actualmente, citrange Carrizo representa alrededor del 75% de los patrones utilizados en España (Agustí, 2000). Durante la década de 1970s y 1980s, algunas citas de pudrición de la corona y del cuello de árboles cítricos se asociaron principalmente con *P. parasitica* en áreas con poco drenaje o inapropiadamente irrigadas (Tuset, 1983). Durante las últimas décadas, el “aguado de los frutos” ha sido la enfermedad ocasionada por *Phytophthora* de mayor importancia económica en el país. La principal especie asociada con el “aguado del fruto” ha sido *P. citrophthora*; sin embargo, otras especies tales como *P. parasitica* y *P. hibernalis* Carne han sido también citadas (Tuset, 1977; Tuset *et al.*, 1990).

La reemergencia de *Phytophthora* en las zonas citrícolas españolas y la manifestación de este nuevo síndrome podría estar relacionada con el uso de cultivares más susceptibles o bien a un incremento de la agresividad de la población de *P. citrophthora*. Esto podría tener su origen en los cambios de patrón realizados o en la introducción de nuevos cultivares de cítricos. La producción de mandarinas del grupo de las Clementinas en España ha experimentado un importante incremento durante los últimos 30 años, aumentando de 8 000 ha en 1965 a más de 100 000 ha en 2005 (González-Sicilia, 1968; F.A.O, 2006).

Los resultados de la prospección muestran que el cambio de patrones a partir del naranjo amargo a citrange Carrizo y otros patrones parece irrelevante en la manifestación de este síndrome, ya que esta enfermedad se caracteriza por afectar principalmente a la variedad. Este hecho se hace evidente en las pruebas de patogenicidad en invernadero donde los patrones resultaron altamente resistentes a la infección. Sin embargo, es necesario más trabajo de investigación para entender la influencia de citrange Carrizo sobre la susceptibilidad de la variedad y su efecto sobre la población de *P. citrophthora* en el suelo.

Estudios de Cohen *et al.* (2003) en Córcega indican la existencia de una nueva población de *P. citrophthora* perteneciente al grupo de apareamiento A2. Esta nueva población ha resultado ser más agresiva sobre la variedad de árboles cítricos que la habitual población de individuos estériles, más agresiva sobre patrones (Vernière *et al.*, 2004). En nuestros ensayos de patogenicidad realizados con *P. citrophthora* en invernadero y en campo, se observó diferencias de agresividad entre aislados. No obstante, sería necesario realizar ensayos en campo sobre patrones y variedades de cítricos con diferentes aislados del patógeno para establecer si esta enfermedad es consecuencia de una evolución en agresividad de la población del patógeno.

Otros aspectos a considerar en la reemergencia de esta enfermedad podrían ser la variación en las condiciones medioambientales y cambios en las prácticas culturales de los cítricos. Recientes estudios indican la existencia de un incremento en la precipitación de verano en la zona costera del mediterráneo (Millán *et al.*, 2005), zona en la cual se concentra las principales áreas de cultivo de cítricos. Inusuales lluvias durante la estación seca podrían estar induciendo cambios en la biología de *P. citrophthora*, sin embargo, se necesita más investigación para demostrar esta hipótesis. Brasier *et al.* (1993) observaron que la pérdida de raíces del roble ibérico debido al ataque de *P. cinnamomi* podría estar relacionado con recientes e inusuales características climáticas de las zonas de ataque de este patógeno caracterizadas por sequías en invierno y abundantes lluvias en verano.

En años recientes, en España se ha producido un importante cambio de los sistemas de irrigación, del riego a manta al riego por goteo. Alrededor del 95% de los campos muestreados se regaban mediante el sistema de riego por goteo. La cada vez más alta y continua humedad del suelo durante el periodo seco de julio a septiembre por efectos del riego localizado, podría incrementar la supervivencia y dispersión del patógeno. Este hecho ha sido observado previamente en otros patosistemas: Reilly *et al.* (1998) observaron que infecciones de frutos de árboles de pecana por *P. citricola* fueron más evidentes en parcelas con riego por goteo.

Adicionalmente, como consecuencia de la introducción de mandarinas del grupo de las clementinas y sus híbridos en España, el anillado de ramas es extensivamente utilizado para mejorar el tamaño del fruto (Agustí, 2000). Las heridas producidas durante este proceso podrían hacer posible las infecciones de *P. citrophthora* sobre las ramas sea cual fuese el mecanismo que transporte el inóculo a las partes aéreas del árbol. Este hecho ha sido descrito para otras enfermedades ocasionadas por *Phytophthora*. Doster y Bostock (1988) observaron que los

principales puntos de infección por *P. syringae* en parcelas de almendro se encontraron en las heridas de poda. Asimismo, Zaiger y Zentmyer (1965) encontraron que las herramientas de poda podían diseminar a *P. palmivora* en parcelas de cacao.

En general, las especies de *Phytophthora* que se diseminan de forma aérea tienen esporangios caducos; sin embargo, *P. citrophthora* presenta esporangios no caducos (Erwin y Ribeiro, 1996). El tipo de diseminación aérea sólo es posible cuando se producen salpicaduras de lluvia, haciendo que los esporangios sean transportados por microgotas de la salpicadura hacia las partes aéreas de la planta (Fawcett, 1936; Graham *et al.*, 1998; Graham y Menge, 1999).

En Florida (USA), *P. parasitica* afecta solamente a los frutos más cercanos al suelo produciendo “aguado de frutos”, sin embargo, frutos afectados por la especie *P. palmivora* se encuentran frecuentemente a alturas superiores a 1 m del suelo (Graham *et al.*, 1998). A diferencia de *P. parasitica*, *P. palmivora* es capaz de producir abundante cantidad de esporangios sobre frutos afectados lo que involucra una importante fuente de inóculo en epidemias de “aguado de fruto” (Timmer *et al.*, 2000). El “aguado de frutos” en España se asocia principalmente con *P. citrophthora* y existen varias citas de su esporulación sobre frutos afectados en el árbol (Tuset, 1977 y 1983; Tuset *et al.*, 1990). No obstante, se necesita más investigación para establecer la relación entre la esporulación del fruto y las infecciones de ramas.

La prospección de suelos de cítricos mostró una dominancia de *P. citrophthora* en las parcelas de cítricos. Este hecho coincide con trabajos previos sobre especies de *Phytophthora* en suelos de cítricos en el Mediterráneo (Ricci *et al.*, 1990). *P. parasitica* se aisló en un 26,8% de las muestras y exclusivamente de patrones y tronco. Esta especie ha sido descrita previamente en España asociada a pudriciones de la corona y el pie (Tuset, 1977; 1983 a y b).

Las áreas citrícolas españolas se caracterizan por presentar un clima típicamente mediterráneo, con veranos secos y cálidos e inviernos húmedos y suaves. La posición dominante de *P. citrophthora* sobre otras especies de *Phytophthora* en cítricos es favorecida por esta clase de condiciones medioambientales (Tuset, 1977; Ricci *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996).

P. citrophthora es una especie activa a temperaturas moderadas (menos de 30 °C) durante el otoño, invierno y primavera, pero no durante el verano. Por el contrario, *P. parasitica* es una especie más activa durante el verano, a altas temperaturas (sobre los 30 °C) y es la especie predominante en zonas citrícolas tropicales (Ricci *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996).

Tradicionalmente, en la citricultura española las medidas de control para enfermedades ocasionadas por *Phytophthora* en cítricos están establecidas para el manejo de las pudriciones de raíces y cuello de la planta y “aguado de frutos”. La tolerancia a *Phytophthora* se considera sólo en programas de mejoramiento de patrones y, debido a que esta enfermedad actualmente afecta fundamentalmente a las variedades, la susceptibilidad de los nuevos genotipos varietales debería ser contemplada también en los programas de mejora.

Debido al creciente interés en las mandarinas clementinas en el mercado mundial, más del 40% de la fruta que exporta España se basa en estos cultivares (F.A.O, 2006). Debido a que las clementinas y sus híbridos son los cultivares más afectados, la reemergencia de *Phytophthora* debe ser considerada como una amenaza significativa para el sector citrícola español.

Capítulo 3

**Estudio de la estructura de la población española
de *Phytophthora citrophthora* en cítricos**

CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN ESPAÑOLA DE *Phytophthora citrophthora* EN CÍTRICOS

3.1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la epidemiología y evolución de las poblaciones de un patógeno es esencial para comprender la emergencia de nuevas enfermedades (Dobrowolski *et al.*, 2003). Uno de los motivos que podría explicar el brote epidémico del síndrome de chancros en ramas de árboles cítricos y la asociación de su agente causal, *P. citrophthora* a un nuevo nicho (Capítulo 2), podría ser un cambio en la población del patógeno. La determinación de la variabilidad genética y de la estructura de una población proporcionaría evidencias de un supuesto proceso evolutivo del patógeno, hecho que es fundamental para el diseño de medidas apropiadas de manejo de una enfermedad.

La estructura poblacional de *P. citrophthora* afectando a cítricos en zonas del Mediterráneo ha sido estudiada recientemente en Córcega, Francia (Cohen *et al.*, 2003). Estos autores caracterizaron aislados de *P. citrophthora* utilizando la técnica de los microsátélites amplificados al azar (Random Amplified Microsatellites-RAMS). Este estudio separó genéticamente cuatro grupos poblacionales de una colección de 112 aislados identificados morfológicamente como *P. citrophthora*.

La agresividad de aislados representativos de estos grupos poblacionales se evaluó sobre diversos cultivares y patrones de cítricos. Los resultados mostraron una especificidad en la agresividad de las cepas en función del grupo poblacional hacia patrones o variedades de cítricos (Vernière *et al.*, 2004). Los autores atribuyeron que esta variabilidad en la estructura poblacional de *P. citrophthora* en ésta zona cítrica pudo producirse como consecuencia de cambios en la abundancia relativa de varias especies de *Phytophthora*, una introducción de nuevas poblaciones, o cruces interespecíficos.

Para elucidar el hipotético cambio poblacional de *P. citrophthora* en las áreas cítricas españolas y que éste fuese un carácter que pudiera asociarse a la aparición del nuevo síndrome, se planteó estudiar la colección de cepas de *Phytophthora* aisladas a partir de las prospecciones realizadas al inicio del estudio del síndrome.

La principal hipótesis planteada implicó el apareamiento sexual de *P. citrophthora*. La aparición de este síndrome pone de manifiesto la interrogante de si nuevos genotipos pudieran haber aparecido a través de la reproducción sexual en la población del patógeno. Aunque *P. citrophthora* ha sido frecuentemente descrita como estéril (Stamps *et al.*, 1990, Erwin y Ribeiro, 1996), Cohen *et al.* (2003) citaron la existencia de los grupos de apareamiento A1 y A2 en las áreas productoras de cítricos en Córcega.

Estudios previos de Tuset (1979 y 1983a), indican que la especie *P. citrophthora* no produce órganos sexuales tanto en cultivos individuales como en mixtos con otras *Phytophthoras*. Ningún estudio adicional al respecto ha sido posteriormente conducido en España sobre este tema. Este estudio busca la evidencia de si una población sexual pudiera haberse establecido o evolucionado en detrimento de una población estéril.

Actualmente poco se conoce sobre la población y complejidad genética de *P. citrophthora* en España o sobre el origen y diseminación del patógeno: por ejemplo, si ha surgido como un solo linaje en una zona en concreto, o si lo ha hecho independientemente en varias zonas geográficamente distantes. En España, las líneas de investigación para el manejo de enfermedades ocasionadas por *Phytophthora* en cítricos se han centrado en programas de mejoramiento de patrones con resistencia a la pudrición radicular y del pie. Sin embargo, este nuevo síndrome afectando ramas, altera la situación de las enfermedades ocasionadas por *Phytophthora* en el país. En tal sentido, es necesario poner mayor esfuerzo en evaluar la resistencia de las variedades hacia el patógeno además de reevaluar las actuales estrategias de control de *Phytophthora* en cítricos.

Los problemas encontrados por los fitomejoradores buscando resistencia en cultivares, en parte resulta de un conocimiento limitado de la estructura de la población del patógeno. En tal sentido, averiguar si la distribución de los genotipos de *P. citrophthora* está cambiando a través del tiempo permitiría evaluar si las actuales medidas fitosanitarias pueden ser efectivas o no. Adicionalmente, el conocimiento de su estructura poblacional proporcionaría información para estimar el potencial evolutivo de este patógeno (McDonald y Linde, 2002).

En el presente capítulo se aborda el estudio de la complejidad genética y la estructura poblacional de *P. citrophthora* de cítricos. El primer objetivo planteado fue examinar los caracteres fenotípicos de aislados de *P. citrophthora* ligados a este nuevo síndrome. Con fines de comparación entre especies de *Phytophthora*, en este apartado también se estudiaron aislados de *P. parasitica*, la segunda especie más importante encontrada en las zonas cítricas del país. El segundo objetivo pretendió encontrar evidencias de variabilidad poblacional de *P. citrophthora* en función de su sensibilidad a fungicidas acilalaninas y mediante técnicas moleculares, y si esta variabilidad poblacional está relacionada a un carácter fenotípico de los aislados. Se pretende determinar si la utilización de la técnica de los RAMS podría diferenciar patotipos de *P. citrophthora* que ocasionan chancros en ramas de otras enfermedades comúnmente producidas por *Phytophthora* en cítricos (pudrición de la raíz y el cuello, gomosis y el aguado de frutos) y su distribución en las zonas cítricas españolas. Un tercer objetivo implicó la evaluación de la agresividad de un grupo de aislados de *P. citrophthora* sobre patrones y variedades de cítricos a nivel de campo.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD FENOTÍPICA (MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA) DE AISLADOS DE *Phytophthora* DE CÍTRICOS

3.2.1.1. Aislados fúngicos

De marzo de 2003 a diciembre de 2004, un total de 132 parcelas de cítricos ubicadas en las seis principales provincias productoras del país (capítulo 2) se evaluaron para identificar la especie de *Phytophthora* causante de chancros en ramas.

En total se obtuvieron 217 aislados de *Phytophthora* y 166 de ellos se seleccionaron para su estudio (**Tabla 3.1**). Adicionalmente a los aislados procedentes de cítricos, se contó con cepas de referencia de especies de *Phytophthora* de colecciones particulares, colecciones tipo y de centros de investigación dentro y fuera de España (**Tabla 3.2**). Un total de 28 aislados fueron de la especie *P. citrophthora*, 6 de *P. parasitica*, 2 de *P. citricola* y 1 de *P. palmivora*.

3.2.1.2. Caracterización morfológica de los aislados

Observación de estructuras asexuales

Para la obtención y posterior observación de estructuras asexuales, se extrajeron del margen de crecimiento de la colonia de cada aislado en estudio discos de agar con micelio de 5 mm de diámetro y se colocaron en placas Petri estériles conteniendo solución de extracto de suelo. Las placas se incubaron en estufa a 24 °C bajo ciclos alterantes de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz blanca + luz ultravioleta cercana.

Después de 3 a 4 días de incubación se hicieron micro-preparaciones de las estructuras formadas en un portaobjetos conteniendo una gota de agua estéril para ser observadas al microscopio. Se realizaron mediciones de la longitud y anchura de los esporangios de cada aislado, calculándose posteriormente el ratio L:A de los mismos. Asimismo, se hicieron observaciones de la presencia o ausencia de papilas, forma y caducidad de los esporangios, características del esporangióforo y presencia o ausencia de clamidosporas. De cada aislado se hicieron un total de 25 medidas de cada estructura.

Tabla 3.1. Aislados de especies de *Phytophthora* de cítricos en colección

Código	Cultivar/patrón	Zona de aislamiento	Localidad	Provincia	Año
Phy 001	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Onda	Castellón	2003
Phy 002	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Onda	Castellón	2003
Phy 003	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Onda	Castellón	2003
Phy 004	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Onda	Castellón	2003
Phy 005	Hernandina/Citr. Carrizo	Tronco	Onda	Castellón	2003
Phy 006	Fortune/Volkameriana	Ramas	Isla Cristina	Huelva	2003
Phy 007	Fortune/Volkameriana	Tronco	Lepe	Huelva	2003
Phy 008	Fortune/Volkameriana	Tronco	Lepe	Huelva	2003
Phy 009	Fortune/Volkameriana	Ramas	Lepe	Huelva	2003
Phy 010	Fortune/Volkameriana	Ramas	Isla Cristina	Huelva	2003
Phy 011	Fortune/Volkameriana	Ramas	Isla Cristina	Huelva	2003
Phy 012	Fortune/Volkameriana	Ramas	Isla Cristina	Huelva	2003
Phy 013	Fortune/Volkameriana	Ramas	Isla Cristina	Huelva	2003
Phy 014	Fortune/Volkameriana	Ramas	Isla Cristina	Huelva	2003
Phy 015	Fortune/Cleopatra	Raíces	Callosa d'Ensarriá	Alicante	2004
Phy 016	Clemenules/Nar. amargo	Ramas	Zalamea	Huelva	2003
Phy 017	Clemenules/Nar. amargo	Ramas	Zalamea	Huelva	2003
Phy 018	Clemenules/Nar. amargo	Ramas	Zalamea	Huelva	2003
Phy 019	Fortune/Cleopatra	Raíces	Callosa d'Ensarriá	Alicante	2004
Phy 020	Clemenules/Nar. amargo	Ramas	Zalamea	Huelva	2003
Phy 021	Marisol/Citr. Carrizo	Raíces	Guadassuar	Valencia	2004
Phy 022	Clemenules/Nar. amargo	Ramas	Zalamea	Huelva	2003
Phy 023	Clemenules/Nar. amargo	Ramas	Zalamea	Huelva	2003
Phy 024	Clemenules/Nar. amargo	Raíces	Nerva	Huelva	2003
Phy 025	Fortune/Citr. Carrizo	Tronco	Tabernes Valldigna	Valencia	2004
Phy 026	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Nerva	Huelva	2003
Phy 027	Clemenules/Nar. amargo	Ramas	Zalamea	Huelva	2003
Phy 028	Nour/Citr. Carrizo	Tronco	Gibraleón	Huelva	2003
Phy 029	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	Viveros	Tarragona	2004
Phy 030	Nour/Citr. Carrizo	Raíces	Gibraleón	Huelva	2003
Phy 031	Nour/Citr. Carrizo	Raíces	Gibraleón	Huelva	2003
Phy 032	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	Silla	Valencia	2004
Phy 033	Nova/Citr. Carrizo	Raíces	El Campillo	Huelva	2003
Phy 034	Clemenules/Nar. amargo	Tronco	El Campillo	Huelva	2003
Phy 035	Navelina	Variedad	Huelva	Huelva	2003
Phy 036	Navelina/Citr. Carrizo	Tronco	Guadassuar	Valencia	2004
Phy 037	Navelina/Citr. Carrizo	Raíces	Guadassuar	Valencia	2004
Phy 038	Loretina/Citr. Carrizo	Raíces	Turis	Valencia	2004
Phy 039	Fortune/Citr. Carrizo	Tronco	Moncada	Valencia	2004
Phy 040	Navelina/Citr. Carrizo	Raíces	Canals	Valencia	2004
Phy 041	Hernandina /Citr. Carrizo	Ramas	Nerva	Huelva	2003
Phy 044	Hernandina /Citr. Carrizo	Ramas	Alquerías	Castellón	2003
Phy 045	Hernandina /Citr. Carrizo	Ramas	Alquerías	Castellón	2003
Phy 046	Hernandina /Citr. Carrizo	Ramas	Alquerías	Castellón	2003
Phy 047	Clemenules/Citr. Carrizo	Tronco	Canals	Valencia	2004
Phy 048	Nova/Citr. Carrizo	Tronco	-	Alicante	2004
Phy 049	Hernandina/Swin. citrumelo	Ramas	Villareal	Castellón	2003
Phy 050	Hernandina/Swin. citrumelo	Ramas	Alquerías	Castellón	2003
Phy 051	Hernandina/Swin. citrumelo	Ramas	Alquerías	Castellón	2003
Phy 052	Hernandina/Swin. citrumelo	Ramas	Alquerías	Castellón	2003
Phy 053	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Burriana	Castellón	2003
Phy 054	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Burriana	Castellón	2003
Phy 055	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Burriana	Castellón	2003
Phy 056	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Ribaraja	Valencia	2003
Phy 057	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Ribaraja	Valencia	2003
Phy 058	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Ribaraja	Valencia	2003

Sigue Tabla 3.1...

Código	Cultivar/patrón	Zona de aislamiento	Localidad	Provincia	Año
Phy 059	Clemenules/Citr. Carrizo	Ramas	Huelva	Huelva	2003
Phy 060	Navelina/Citr. Carrizo	Raíces	Canals	Valencia	2003
Phy 061	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Burriana	Castellón	2003
Phy 062	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2003
Phy 063	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2003
Phy 064	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Nerva	Huelva	2003
Phy 065	Fortune/Volkameriana	Raíces	Huelva	Huelva	2003
Phy 066	Fortune/Volkameriana	Tronco	Huelva	Huelva	2003
Phy 067	Fortune/Volkameriana	Ramas	Huelva	Huelva	2003
Phy 068	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Nerva	Huelva	2003
Phy 069	Hernandina/Citr. Carrizo	Raíces	Lliria	Valencia	2004
Phy 070	Hernandina/Citr. Carrizo	Tronco	Lliria	Valencia	2004
Phy 071	Hernandina/Citr. Carrizo	Raíces	Tavernes Valldigna.	Valencia	2004
Phy 072	Hernandina/Swin. citrumelo	Ramas	Bétera	Valencia	2004
Phy 073	Fortune/Volkameriana	Ramas	Torreblanca	Castellón	2004
Phy 074	Hernandina/Citr. Carrizo	Tronco	Castellón	Castellón	2004
Phy 075	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	Montesa	Valencia	2004
Phy 076	Fortune/Volkameriana	Raíces	Lliria	Valencia	2004
Phy 077	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	Torreblanca	Castellón	2004
Phy 078	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Torreblanca	Castellón	2004
Phy 079	Hernandina/Citr. Carrizo	Ramas	Torreblanca	Castellón	2004
Phy 080	Fortune/Citr. Carrizo	Raíces	Torreblanca	Castellón	2004
Phy 081	Navelina/Nar. amargo	Tronco	Tavernes Valldigna.	Valencia	2004
Phy 082	Navelina/Nar. amargo	Raíces	Tavernes Valldigna	Valencia	2004
Phy 083	Navelina/Nar. amargo	Raíces	Tavernes Valldigna	Valencia	2004
Phy 084	Marisol/Citr. Carrizo	Raíces	Llosa de Ranes	Valencia	2004
Phy 085	Hernandina/Cleopatra	Tronco	Torreblanca	Castellón	2004
Phy 086	Hernandina/Cleopatra	Tronco	Torreblanca	Castellón	2004
Phy 087	Navelina/Citr. Carrizo	Raíces	Montesa	Valencia	2004
Phy 088	Navelina/Citr. Carrizo	Raíces	Llosa de Ranes	Valencia	2004
Phy 089	Navelina/Citr. Carrizo	Raíces	Montesa	Valencia	2004
Phy 095	Clemenules/Citr. Carrizo	Raíces	Tarragona	Tarragona	2004
Phy 096	Clemenules/Citr. Carrizo	Raíces	Tarragona	Tarragona	2004
Phy 097	Clemenules/Citr. Carrizo	Tronco	Tarragona	Tarragona	2004
Phy 098	Fortune/Cleopatra	Ramas	Picassent	Valencia	2004
Phy 099	Fortune/Citr. Carrizo	Tronco	Bétera	Valencia	2004
Phy 100	Fortune/Citr. Carrizo	Tronco	Bétera	Valencia	2004
Phy 101	Fortune/Citr. Carrizo	Tronco	Bétera	Valencia	2004
Phy 111	Marisol/Citr. Carrizo	Raíces	Guadassuar	Valencia	2004
Phy 113	Fortune/Citr. Carrizo	Tronco	Pedreguer	Valencia	2004
Phy 114	Limón/Nar. amargo	Ramas	Santomera	Murcia	2004
Phy 115	Limón/Nar. amargo	Tronco	Santomera	Murcia	2004
Phy 116	Limón/Nar. amargo	Tronco	Santomera	Murcia	2004
Phy 117	Limón/Nar. amargo	Ramas	Santomera	Murcia	2004
Phy 118	Limón/Nar. amargo	Ramas	Santomera	Murcia	2004
Phy 119	Clemenules/Citr. Carrizo	Tronco	Moncada	Valencia	2004
Phy 127	Nova/Citr. Carrizo	Raíces	Villanueva C.	Huelva	2003
Phy 128	Clemenules/Citr. Carrizo	Ramas	Moguer	Huelva	2003
Phy 129	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	Huelva	Huelva	2003
Phy 130	Clemenule/Troyer	Ramas	Gibraleón	Huelva	2003
Phy 131	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	Cartaya	Huelva	2003
Phy 132	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Lepe	Huelva	2004
Phy 133	Navelate/Volkamer.	Ramas	Aljaraque	Huelva	2004
Phy 134	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	San Bartolomé	Huelva	2004
Phy 135	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	San Bartolomé	Huelva	2004

Sigue Tabla 3.1...

Código	Cultivar/patrón	Zona de aislamiento	Localidad	Provincia	Año
Phy 136	Clemenules/Citr. Carrizo	Ramas	Lepe	Huelva	2004
Phy 137	Clemenules/Citr. Carrizo	Ramas	Lepe	Huelva	2004
Phy 138	Clemenules/Swin. citrumelo	Ramas	Lepe	Huelva	2004
Phy 139	Clemenules/Swin. citrumelo	Ramas	Lepe	Huelva	2004
Phy 140	Clemenules/Swin. citrumelo	Ramas	Lepe	Huelva	2004
Phy 141	Clemenules/Swin. citrumelo	Ramas	Lepe	Huelva	2004
Phy 142	Fortune/Citr. Carrizo	Tronco	Isla Cristina	Huelva	2004
Phy 143	Fortune/Citr. Carrizo	Raíces	Isla Cristina	Huelva	2004
Phy 144	Nova/Citr. Carrizo	Ramas	El Campillo	Huelva	2004
Phy 145	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	Isla Cristina	Huelva	2004
Phy 146	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	Isla Cristina	Huelva	2004
Phy 147	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	Isla Cristina	Huelva	2004
Phy 149	Nour/Citr. Carrizo	Raíces	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 150	Nour/Citr. Carrizo	Tronco	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 151	Navelate/Citr. Carrizo	Tronco	Isla Cristina	Huelva	2004
Phy 152	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	San Bartolomé	Huelva	2004
Phy 153	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	San Bartolomé	Huelva	2004
Phy 154	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 155	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 156	Clemenules/Citr. Carrizo	Tronco	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 157	Nova/Citr. Carrizo	Ramas	El Campillo	Huelva	2004
Phy 158	Nova/Citr. Carrizo	Ramas	El Campillo	Huelva	2004
Phy 159	Nova/Citr. Carrizo	Ramas	El Campillo	Huelva	2004
Phy 160	Orogrande/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2003
Phy 161	Clemenules/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 162	Clemenules/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 163	Clemenules/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 164	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Lepe	Huelva	2003
Phy 165	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Aljaraque	Huelva	2004
Phy 166	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 167	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 168	Fortune/Citr. Carrizo	Tronco	San Bartolomé	Huelva	2004
Phy 169	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 170	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Aljaraque	Huelva	2004
Phy 171	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 172	Nour/Citr. Carrizo	Ramas	Gibraleón	Huelva	2004
Phy 173	Fortune/Citr. Carrizo	Tronco	Isla Cristina	Huelva	2004
Phy 174	Clemenules/Citr. Carrizo	Raíces	Gandía	Valencia	2005
Phy 177	Navel-late/Citr. Carrizo	Frutos	Moncada	Valencia	2004
Phy 178	Navelina/ Citr. Troyer	Tronco	Sueca	Valencia	2005
Phy 179	Valencia Late/Citr. Troyer	Tronco	Sueca	Valencia	2005
Phy 180	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	Oliva	Valencia	2005
Phy 181	Hernandina/Nar. amargo	Ramas	Oliva	Valencia	2005
Phy 182	Fortune/Citr. Carrizo	Ramas	Montserrat	Valencia	2005
Phy 183	Clemenules/ Citr. Carrizo	Ramas	Montserrat	Valencia	2005
Phy 184	Valencia late/ Citr. Carrizo	Raíces	Montserrat	Valencia	2005
Phy 185	Lane late/ Citr. Carrizo	Raíces	Montserrat	Valencia	2005
Phy 186	Hernandina/volkamer.	Ramas	Ribaroja	Valencia	2005
Phy 187	Navel late/Citrumelo	Frutos	Montesa	Valencia	2005
Phy 188	Clemenules/ Citr. Carrizo	Raíces	Ribaroja	Valencia	2005
Phy 190	Clemenules/Citr. Carrizo	Ramas	Ribaroja	Valencia	2005
Phy 192	Valencia late/Volkameriana	Frutos	Moncada	Valencia	2005
Phy 193	Hernandina/Volkameriana	Ramas	Torreblanca	Castellón	2005
Phy 194	Hernandina/ Citr. Carrizo	Ramas	Silla	Valencia	2005

- Sin datos

Tabla 3.2: Aislados de referencia de especies de *Phytophthora* en colección

Código	Código de referencia	Hospedante	Especie	Procedencia	Año
Phy 042	CECT 2352	<i>C. sinensis</i>	<i>P. citrophthora</i>	CECT – España	1990
Phy 043	CECT 2353	<i>C. sinensis</i>	<i>P. citrophthora</i>	CECT – España	1984
Phy 090	Ph 186 S	<i>Citrus</i> spp.	<i>P. parasitica</i>	Tartous – Siria	-
Phy 091	Ph 111	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	<i>P. citricola</i>	INRA – Francia	-
Phy 092	Ph 91 (A2)	Suelo	<i>P. parasitica</i>	ATCC – USA	-
Phy 093	Ph 119 (A1)	<i>C. sinensis</i>	<i>P. citrophthora</i>	INRA – Francia	-
Phy 094	Ph 115	Suelo	<i>P. parasitica</i>	INRA – Francia	2000
Phy 102	CIT 61	<i>Citrus</i> spp.	<i>P. citricola</i>	INRA – Francia	-
Phy 103	CTO 144 (A2)	<i>C. clementina</i>	<i>P. citrophthora</i>	INRA – Francia	-
Phy 104	PA 55 (Estéril)	<i>C. clementina</i>	<i>P. citrophthora</i>	INRA – Francia	1998
Phy 105	PA 34 (A1)	<i>C. clementina</i>	<i>P. citrophthora</i>	INRA – Francia	1997
Phy 106	PA 67 (Estéril)	<i>P. trifoliata</i>	<i>P. citrophthora</i>	INRA – Francia	1998
Phy 107	PA 36 (A2)	Suelo	<i>P. citrophthora</i>	INRA – Francia	1998
Phy 108	PAR 113	<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i>	<i>P. parasitica</i>	INRA – Francia	-
Phy 109	PA 89	<i>C. clementina</i>	<i>P. citrophthora</i>	INRA – Francia	1998
Phy 110	PAL 292 (A2)	<i>Theobroma cacao</i>	<i>P. palmivora</i>	INRA – Francia	-
Phy 120	PO118	Ornamentales	<i>P. citrophthora</i>	Polonia	2003
Phy 121	PO252	Ornamentales	<i>P. citrophthora</i>	Polonia	2003
Phy 122	PO098	Ornamentales	<i>P. citrophthora</i>	Polonia	2003
Phy 123	PO157	Ornamentales	<i>P. citrophthora</i>	Polonia	2003
Phy 124	PO328	Ornamentales	<i>P. citrophthora</i>	Polonia	2003
Phy 125	PO323	Ornamentales	<i>P. citrophthora</i>	Polonia	2003
Phy 126	PO316	Ornamentales	<i>P. citrophthora</i>	Polonia	2003
Phy 175		<i>C. aurantifolia/C. jambhiri</i>	<i>P. parasitica</i>	U. Nac. Piura, Perú	2005
Phy 176		<i>C. aurantifolia/C. jambhiri</i>	<i>P. parasitica</i>	U. Nac. Piura, Perú	2005
Phy 189		<i>C. sinensis</i>	<i>P. citrophthora</i>	IVIA - España	1998
Phy 191		<i>C. clementina</i>	<i>P. citrophthora</i>	IVIA - España	2002
Phy 199		<i>C. limon/C. macrophylla</i>	<i>P. citrophthora</i>	U. Católica Chile	2005
Phy 200		<i>C. limon/C. macrophylla</i>	<i>P. citrophthora</i>	U. Católica Chile	2005
Ps – 74		<i>Pinus</i> spp.	<i>P. citrophthora</i>	Valencia	2006
Ps – 121		<i>Evonimus</i> spp.	<i>P. citrophthora</i>	Valencia	2007
Ps – 122		<i>Evonimus</i> spp.	<i>P. citrophthora</i>	Valencia	2007
Ps – 127		<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>P. citrophthora</i>	Alicante	2007
Ps – 128		<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>P. citrophthora</i>	Alicante	2007
Ps – 129		<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>P. citrophthora</i>	Alicante	2007
Ps – 134		<i>Ficus carica</i>	<i>P. citrophthora</i>	Valencia	2007
Ps – 135		<i>Ficus carica</i>	<i>P. citrophthora</i>	Valencia	2007

Observación de estructuras sexuales

Las estructuras sexuales de los aislados en estudio se indujeron utilizando el método de los cultivos duales (Erwin y Ribeiro, 1996) como se describió en el capítulo 2. Cada cepa se apareó independientemente en placas Petri conteniendo agar jugo V8 con aislados de referencia de los grupos de apareamiento A1 y A2 de *P. citrophthora* y *P. parasitica* (**Tabla 3.2**). Los grupos de apareamiento de *P. citrophthora* fueron proporcionadas por F. Panabières (INRA, Francia) y de *P. parasitica* por A. Ippolito (Universidad de Bari - Italia). La complementación de los grupos de apareamiento A1 y A2 se incluyó como control. Los apareamientos se incubaron en oscuridad a 24 °C, observándose la formación de estructuras sexuales a los 15, 30 y 45 días después del apareamiento.

Para las observaciones de las estructuras al microscopio se realizaron montajes en agua estéril de fragmentos de agar + micelio de zonas adyacentes al punto de siembra del aislado a identificar y de los puntos de convergencia de las colonias enfrentadas. Aislados que produjeron oosporas cuando se aparearon con el aislado de referencia A1, pero no con el aislado A2, se designaron como A2. Aislados que formaron oosporas cuando se aparearon con el aislado de referencia A2 y no las formaron cuando se aparearon con A1, se denominaron A1. Aislados que no produjeron estructuras sexuales con ninguno de los aislados de referencia se consideraron estériles. El grupo de apareamiento se determinó para 134 aislados de *P. citrophthora*.

De las estructuras sexuales formadas se determinó, para el caso de los anteridios, su longitud y anchura, si eran anfígenos o paráginos, monoclinos o diclinos. Para los oogonios se determinó el diámetro, el porcentaje de estructuras anfígenas o paráginas, y para las oosporas, su diámetro y el grosor de la pared para estimar su condición de pleróticas o apleróticas. Los promedios de estas características se realizaron midiendo un total de 25 estructuras.

3.2.1.3. Caracterización fisiológica de los aislados

Crecimiento a diferentes temperaturas

A partir del margen de una colonia de 5 días de crecimiento de los diferentes aislados en estudio se extrajeron discos de inóculo de 5 mm de diámetro mediante un sacabocado. Las siembras se realizaron colocando en el centro de una placa Petri conteniendo medio PDA (Biokar diagnostics, France), un disco de inóculo con la superficie de micelio en contacto con el medio. En un estudio previo con algunos aislados (datos no mostrados) se observó que a temperaturas menores de 16 °C el crecimiento de las colonias fue muy lento y no se detectaron diferencias significativas entre aislados.

Los aislados se hicieron crecer en oscuridad, incubándose a las temperaturas de: 16, 20, 24, 28, 32 y 35 °C. Se realizaron tres repeticiones (placas) de cada aislado por temperatura. La

evaluación del crecimiento radial de la colonia en cada combinación aislado-temperatura se hizo a los 5 días de incubación. Para las mediciones se marcaron en la base de cada placa dos líneas que intersectaban en ángulo recto en el centro de la misma, que coincidía con el centro del disco de inóculo. El crecimiento radial total (mm) se calculó tomando la media de las seis mediciones radiales, restando a dicha medida el radio del disco de inóculo (2,5 mm). Para el cálculo de la temperatura óptima, los datos de crecimiento se ajustaron a una ecuación mediante regresión lineal, que se derivó e igualó a 0.

Patrón de crecimiento de las colonias

Siete días después de la siembra, se registraron los patrones de crecimiento de las colonias de cada aislado a cada temperatura, comparándose con los patrones de crecimiento tipo definidos por Erwin y Ribeiro (1996): petaloide, rosáceo, estelado, radiado, estolonífero y sin patrón de crecimiento definido, así como formas intermedias de éstos.

Análisis estadístico

Se realizó un estudio estadístico multivariante mediante un análisis factorial utilizando el programa informático Statgraphics Plus 5.1. En dicho estudio se incluyeron las variables: zona de aislamiento, grupo del hospedante (cítricos), longitud de esporangios, anchura de esporangios, ratio de esporangios, papilación, presencia o ausencia de clamidosporas o de estructuras sexuales, temperatura óptima de crecimiento, crecimiento a 24 , 32 y 35 °C, patrón y margen de crecimiento a 24 °C. Con el objetivo de facilitar el análisis, los datos cualitativos se simplificaron siguiendo los criterios señalados en la **Tabla 3.3**. Los datos cuantitativos se incluyeron sin ninguna modificación.

3.2.2. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE AISLADOS DE *Phytophthora* DE CÍTRICOS

3.2.2.1. Ensayos de sensibilidad *in vitro* a fungicidas

a. Sensibilidad al metalaxil

Un total de 74 aislados de *P. citrophthora* y 20 aislados de *P. parasitica* se seleccionaron en función de sus zonas de procedencia y año de aislamiento para evaluar su sensibilidad *in vitro* al metalaxil. Las cepas se sembraron en medio de cultivo PDA conteniendo metalaxil [Ridomil (polvo mojable) 25% p/p de metalaxil - Syngenta] a concentraciones de 0; 0,1; 1,0; 5,0; 10 y 100 µg m.a. ml⁻¹. Un disco de agar + micelio se colocó en el centro de cada placa Petri y se incubó en oscuridad a 24 °C por 5 días.

Tabla 3.3. Codificación de variables utilizada para el análisis estadístico (parámetros cualitativos)

Código^a	Zona aislamiento	Código	Estructuras sexuales	Código	Papilación
1	Ramas	1	Presenta	0	Papilado
2	Tronco	2	No presenta	1	Semipapilado
3	Raíces				
4	Frutos				

Código	Crecimiento 35 °C	Código	Clamidosporas	Código	Margen colonia 24 °C
0	No	0	No	0	Irregular
1	Si	1	Si	1	Uniforme

Código	Grupo hospedante	Código	Patrón de crecim. 24 °C
1	Limonos	0	Sin patrón
2	Naranjos	1	Estolonífero
3	Mandarinas ^b	2	Radiado
4	Ornamentales	3	Estelado ^c
		4	Petaloide ^d

^a Códigos introducidos en el programa informático para realizar el análisis multivariante.

^b Aislados procedentes de cultivares de clementina e híbridos.

^c Se incluyeron los patrones de crecimiento: ligeramente estelado, estelado a rosáceo, rosáceo y semirosáceo.

^d Se incluyó el patrón de crecimiento semipetaloide.

El crecimiento radial de cada colonia se registró usando dos medidas tomadas en un ángulo de 90°. Se utilizó tres placas Petri por concentración de fungicida y por aislado. Cada ensayo se repitió dos veces. Las medidas se promediaron, el radio del disco de inoculación (2,5 mm) se sustrajo de la media, y la reducción relativa de crecimiento *in vitro* para cada concentración de fungicida se calculó como sigue: $(100 - [\text{crecimiento con fungicida}/\text{crecimiento en la placa control}] \times 100)$ (Taylor *et al.*, 2002; Abu-El Samen *et al.*, 2005).

La sensibilidad de los aislados al metalaxil se consideró como sigue: (i) sensible al metalaxil si el crecimiento radial sobre 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de metalaxil no sobrepasó al 40 % del crecimiento en relación al tratamiento control de 0 $\mu\text{g ml}^{-1}$; (ii) sensibilidad intermedia si el crecimiento radial fue mayor del 40 % del correspondiente al control sobre 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, pero no sobre 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de metalaxil; y (iii) resistente si el crecimiento radial sobre 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de metalaxil fue mayor del 40 % del correspondiente al control (Taylor *et al.*, 2002; Abu-El Samen, *et al.*, 2005).

En una segunda etapa, para cada aislado se estimó la concentración efectiva media (CE_{50}), variable definida como la concentración media de metalaxil necesaria para inhibir el 50% del crecimiento de micelio *in vitro* de cada aislado. La CE_{50} se estimó mediante un modelo de regresión lineal entre el logaritmo de las concentraciones de metalaxil y su porcentaje de inhibición. Para estimar este valor, se utilizó el rango de concentraciones que varió entre 0,1 y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de metalaxil. El porcentaje de inhibición se transformó a unidades Probits mediante la tabla propuesta por Finney (1964). El punto en la línea de regresión en la cual el 50% del crecimiento de los aislados fue inhibido fue el valor de la CE_{50} .

b. Sensibilidad al mefenoxam

La sensibilidad al mefenoxam [Ridomil Gold 2.5 G (concentrado soluble) 48% p/v de mefenoxam - Syngenta] se determinó en los mismos aislados utilizados en el ensayo de metalaxil. Las concentraciones de fungicida, las consideraciones para la clasificación de los aislados en función de su sensibilidad y el cálculo de la CE_{50} fue similar a los procedimientos descritos en el ensayo anterior.

3.2.2.2. Análisis molecular de los aislados

Extracción del DNA

La extracción del DNA de cada aislado se realizó a partir del micelio recogido de una placa Petri de 6 días de crecimiento en medio PDA. El micelio se pulverizó utilizando nitrógeno líquido y la extracción del DNA se realizó con el “kit” de extracción Plant DNA miniprep de EZNA® (Omega Biotek Inc), siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante.

Análisis mediante RAMS (Random Amplified Microsatellites)

El análisis RAMS se realizó siguiendo el protocolo de Hantula *et al.* (1997) con las siguientes modificaciones: 5 - 25 ng de DNA se usaron como molde en un volumen de reacción de 25 μ l conteniendo el iniciador GT para la diferenciación entre especies de *Phytophthora*, o el iniciador CGA para valorar las diferencias intraespecíficas en especies de *Phytophthora* (**Tabla 3.4**). Para ambos casos la concentración final del iniciador fue 0,2 μ M, y la de cada dNTP 0,1mM, añadiéndose 0,5 unidades de *Taq* polimerasa [MBL *Taq* DNA Polimerasa (Dominion MBL, Córdoba, España)] por reacción. Las condiciones de la reacción fueron una fase inicial de desnaturalización durante 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización, 30 s a 95 °C, anillamiento por 45 s a 57 °C para CGA o 50 °C para GT, y elongación 2 min a 71 °C, y un paso de elongación final por 3 min a 71 °C. Los productos de la amplificación se separaron en gel de agarosa al 1,5 % en tampón TBE 0,5X. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta.

Tabla 3.4. Cebadores y sus secuencias utilizados en el análisis RAMS (Cohen *et al.*, 2003).

Nombre	Secuencia
RAMS GT	5'[YHY(GT) ₇ G]3'
RAMS CGA	5'[DHB(CGA) ₅]3'

Las designaciones: B (G, T ó C), D (G, A ó T), H (A, T ó C) e Y (A, C ó G) se usaron para los sitios degenerados.

Para el análisis de los resultados, los fragmentos amplificados mediante el iniciador CGA se valoraron visualmente como presencia (1) o ausencia (0) de banda, y se construyó una única matriz combinando los datos de todos los aislados para el análisis. Aquellas bandas con igual tamaño se consideraron homólogas. La semejanza genética entre aislados se calculó según el coeficiente de Dice (Dice, 1945), con el programa SimQual de NTSYSpc versión 2.0 (Exeter software, Setauket, NY). Para cada coeficiente, la similitud de la matriz se usó para construir dendrogramas con la ayuda del programa UPGMA (Unweighted Pair Grouping by Mathematical Averaging), usando los programas SAHN y TREE en NTSYSpc.

3.2.3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD PATOGENICA DE AISLADOS REPRESENTATIVOS DE LAS POBLACIONES DE *P. citrophthora* DE CÍTRICOS

Condiciones del experimento

El estudio se condujo en 12 parcelas comerciales de diferentes variedades y patrones de cítricos ubicadas en 4 zonas diferentes de la Comunidad Valenciana (**Tabla 3.5**). Dentro de cada parcela se seleccionaron 6 árboles. Las inoculaciones se hicieron entre los meses de mayo y junio de 2006.

Aislados utilizados

Se utilizaron 6 aislados de *P. citrophthora* seleccionados al azar entre individuos pertenecientes a los dos grupos genotípicos más numerosos de la población, P-1 (Phy 016, Phy 035 y Phy 058) y P-9 (Phy 011, Phy 028 y Phy 051).

Inoculación

Se seleccionaron al azar 6 ramas por árbol en diferentes orientaciones y sobre cada una de ellas se inoculó un aislado de *P. citrophthora*, de acuerdo al proceso de inoculación de ramas de árboles en campo descrito en el capítulo 2 (Apartado 2.2.5). Cada aislado se inoculó en 6 árboles diferentes. Asimismo, en la zona del patrón de cada árbol del experimento se inoculó un aislado diferente de *P. citrophthora*.

Evaluación y análisis de datos

Las evaluaciones de las ramas y de los patrones se realizaron transcurridos 30 días desde la inoculación. Se eliminó la corteza de las zonas inoculadas y se midió el área de la lesión presente

en la zona cambial. El procedimiento de evaluación y el cálculo de las áreas de cada tratamiento se llevaron a cabo de acuerdo al procedimiento seguido en el capítulo 2 (Apartado 2.2.5).

Se consideraron tres tipos de factores: genéticos del hospedante y del patógeno y de la localización de la parcela. Los factores genéticos del hospedante fueron: la variedad inoculada, el grupo de cítricos y la influencia del patrón y/o la variedad injertada sobre el área de lesión. Los factores relativos al patógeno fueron: la agresividad de los aislados y el grupo poblacional de los mismos. El tercer factor fue la localización de la parcela.

La correlación entre estos factores de estudio y las áreas de lesión se realizaron por separado tanto para las lesiones desarrolladas sobre la variedad (en ramas) como sobre patrones.

Los datos de las áreas de cada parcela se sometieron a un análisis de regresión lineal debido a la imposibilidad de plantear un diseño factorial en bloques al azar. Los valores de las áreas de las lesiones se consideraron como variable respuesta, analizando por separado los valores obtenidos sobre la variedad y sobre el patrón. Las variedades se incluyeron como variable explicativa cualitativa tipo “dummy”, que utilizan sólo los valores cero y uno. Los aislados se codificaron según el grupo al que pertenecían y se trataron también como una variable explicativa de tipo cualitativo. El análisis se realizó utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1.

Tabla 3.5. Parcelas utilizadas en el ensayo de inoculación de genotipos de *P. citrophthora*. Primavera – verano de 2006.

Parcela	Localización	Variedad	Patrón
1	Sueca	Navelina	Citrango Troyer
2	Sueca	Valencia Late	Citrango Troyer
3	Oliva	Fortune	Citrango Troyer
4	Oliva	Hernandina	Naranja amargo
5	Montserrat	Lane Late	Citrango Carrizo
6	Montserrat	Fortune	Citrango Carrizo
7	Montserrat	Clemenules	Citrango Carrizo
8	Montserrat	Valencia Late	Citrango Carrizo
9	Ribaroja	Hernandina	Volkameriana
10	Ribaroja	Navelate	Citrumelo Swingle
11	Ribaroja	Valencia Late	Citrango Carrizo
12	Ribaroja	Clemenules	Citrango Carrizo

3.3. RESULTADOS

3.3.1. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD FENOTÍPICA (MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA) DE AISLADOS DE *Phytophthora* EN CÍTRICOS

3.3.1.1. Aislados fúngicos

Del total de las cepas en colección de *Phytophthora* aisladas de cítricos, 134 se identificaron como *P. citrophthora* y 32 como *P. parasitica* (Anexos: Tablas 10.1 a 10.4).

3.3.1.2. Caracterización morfológica

P. citrophthora

Los aislados de *P. citrophthora* mostraron una notable variabilidad en las características de los esporangios (Tabla 3.6). Éstos fueron semipapilados en un 47 % y papilados en un 53 % de los casos. Ocasionalmente, se encontraron esporangios bipapilados. Los esporangios de todos los aislados fueron persistentes, no proliferantes con simpodios de 2 a 3 esporangios unidos lateralmente al esporangióforo. Su tamaño fue de (24,9-) 43,2 (-61,1) x (18,9-) 30,7 (-43,4) μm , siendo su ratio L:A de (1,2:1-) 1,4:1 (-1,6:1). La forma dominante de los esporangios fue ovoide-obpiriforme en un 46 % de los casos, seguida por ovoide (33 %), obpiriforme (13 %), subesféricos (5 %), ovoide-ovados (2 %) y esféricos (2 %). Algunos aislados presentaron esporangios con formas distorsionadas, no teniéndose éstos en cuenta para el cálculo de las medias. El 52 % de los aislados produjeron clamidosporas, siendo terminales e intercalares y promediaron un diámetro de 25,5 μm . En cuanto a la formación de estructuras sexuales, sólo uno de los aislados (Phy 037) produjo oosporas al aparear con el grupo de apareamiento A1. Las oosporas fueron anfígenas, pleróticas, con un promedio de 27,7 μm de diámetro; los demás aislados no aparearon con ningún grupo de apareamiento, siendo por tanto estériles.

Los aislados de referencia de *P. citrophthora* (Tabla 3.6) formaron esporangios de forma ovoide-obpiriforme en un 73 %, mientras que las formas esféricas, subesféricas, ovoides y obpiriformes se presentaron en un 7 % de los casos. El 73 % de los aislados formaron esporangios papilados mientras que el 27 % restante fueron semipapilados. Los esporangios fueron no caducos, no proliferantes y con simpodios de 2 a 3 esporangios unidos lateralmente al esporangióforo. El tamaño de los esporangios fue de (27,1-) 38,7 (-48,1) x (21,2-) 27,6 (-34,1) y el ratio L:A de (1,2:1-) 1,4:1 (-1,6:1). El 50 % de los aislados formó clamidosporas, siendo el tamaño medio de éstas de 25,8 μm . A excepción de los aislados heterotáticos A1 y A2, ningún aislado de referencia de esta especie produjo estructuras sexuales al ser enfrentados con los respectivos grupos de apareamiento.

Tabla 3.6. Características de las estructuras de aislados de *Phytophthora* en estudio.

Características morfológicas	<i>P. citrophthora</i>		<i>P. parasitica</i>	
	Aislados en estudio	Aislados de referencia	Aislados en estudio	Aislados de referencia
Longitud (µm)	(24,9-) 43,0 (-61,1)	(27,1-) 38,7 (-48,1)	(29,8-) 42,8 (-56,1)	(25,4-) 41,1 (58,7)
Anchura (µm)	(27,1-) 38,7 (-41,1)	(21,2-) 27,6 (-34,1)	(16,7-) 32,6 (-43)	(18,1-) 30,0 (-41,9)
Ratio L:A	(1,2:1-) 1,4:1 (-1,6:1)	(1,2:1-) 1,4:1 (-1,6:1)	(1,2:1-) 1,3:1 (-1,4:1)	(1,2:1-) 1,4:1 (-1,5:1)
Papilados (%)	53	73	78	86
Semipapilados (%)	47	27	22	14
Ovoide-obpiriforme (%)	46	73	42	40
Esporangios				
Ovoide (%)	33	7	9	20
Obpiriforme (%)	13	7	24	20
Subesférico (%)	5	7	18	20
Ovoide-ovado (%)	2	0	0	0
Ovoide-subesférico (%)	0	0	3	0
Esférico (%)	2	7	0	0
Distorsionadas (%)	0	0	3	0
Clamidosporas (µm)	[52] ^a (19,4-) 25,5 (-40,4)	[50] ^a (17,5-) 25,8 (-36,4)	[84] ^a (17,6-) 29,4 (-40,2)	[100] ^a (20,7-) 26,4 (-34,2)
Oosporas (µm)	27,7µm ^b	N.F	[91] ^c (23,0-) 25,6 (-26,2)	[100] ^c (24,7-) 26,3 (-28,7)

N.F. ∴ No formaron estructuras

^a % de aislados que produjeron clamidosporas

^b Sólo el aislado Phy 037 produjo oosporas

^c % de aislados que produjeron oosporas

P. parasitica

Aislados de esta especie presentaron esporangios de forma ovoide-obpiriforme (42%), obpiriformes (24%), subesféricos (18%), ovoides (9%) y ovoide-subesféricos (3%) (**Tabla 3.6**). Hubo un pequeño porcentaje de aislados (3%) que mostraron formas distorsionadas. El 78 % de los aislados produjeron esporangios papilados y un 22 % semipapilados. El tamaño de los esporangios fue de (29,8-) 42,8 (-56,1) x (16,7-) 32,6 (-43) μm , con un ratio (L:A) de (1,2:1-) 1,3:1 (-1,4:1). Los esporangios en todos los casos fueron no caducos, no proliferantes y con simpodios de 2 a 3 esporangios frecuentemente unidos lateralmente al esporangióforo. El 84 % de los aislados produjo clamidosporas, cuyas medidas variaron de 20 a 40 μm de diámetro. Los apareamientos con los aislados de referencia A1 y A2 de *P. parasitica* formaron estructuras sexuales en un 91 % de los casos, siendo estériles el 9 % restante. Los aislados que presentaron estructuras sexuales formaron oosporas anfígenas, esféricas, apleróticas, promediando 25,6 μm de diámetro. Se encontró un mayor porcentaje de estructuras sexuales del grupo de apareamiento A1, con un 58,6 %, y el 41,4 % restante fueron A2.

Los aislados de referencia de *P. parasitica* formaron esporangios con forma ovoide-obpiriforme en un 40 % de los casos, mientras cada una de las formas ovoide, obpiriforme y ovoide-obpiriforme se presentaron en un 20 % (**Tabla 3.6**). El tamaño de los esporangios varió de (25,4-) 41,1 (-58,7) x (18,1-) 30,0 (-41,9) μm siendo el ratio (L:A) de (1,2:1-) 1,4:1 (-1,5:1). Los esporangios fueron papilados en un 86 % y semipapilados en un 14 %. La totalidad de los aislados formaron clamidosporas, que promediaron de 25 a 35 μm de diámetro. Todos los aislados formaron oogonios y posteriormente oosporas al ser enfrentados con los grupos de apareamiento correspondientes. Las oosporas fueron anfígenas, esféricas, apleróticas, promediando 26,3 μm de diámetro. La mayoría de los aislados fueron del grupo de apareamiento A1.

3.3.1.3. Caracterización fisiológica.**Crecimiento a diferentes temperaturas**

En las **Tablas 10.5 a 10.8** (Anexos), se presentan los datos del crecimiento de los diferentes aislados a las distintas temperaturas y en las **Tablas 10.9 a 10.12** los parámetros de la regresión para estimar las temperaturas óptimas de las especies de *Phytophthora* en estudio. Para *P. citrophthora*, los aislados procedentes de cítricos presentaron valores de ratio de crecimiento menores a 16, 20 y 32 °C que a 24 y 28 °C (**Tabla 3.7**). Esta misma tendencia se obtuvo con los aislados de referencia. La temperatura óptima de crecimiento para los aislados de cítricos estaba entre 22,9 y 28,9 °C (**Tabla 10.9**) y para los aislados de referencia entre 22,2 y 27,9 °C (**Tabla 10.10**).

Tabla 3.7. Cuadro resumen del diámetro de crecimiento semanal a diferentes temperaturas de aislados de *Phytophthora*.

Aislados	Tasas de crecimiento (mm/semana)					
	16 °C	20 °C	24 °C	28 °C	32 °C	35 °C
<i>P. citrophthora</i>						
En estudio	(16,0-) 35,2 (-47,8)	(17,7-) 50,7 (-65,5)	(34,5-) 62,9 (-71,3)	(28,0-) 62,9 (-76,0)	(6,0-) 33,1 (-67,0)	-- ^z
Referencia	(17,1-) 32,9 (-40,7)	(37,2-) 45,6 (-58,0)	(42,2-) 55,7 (-70,3)	(36,3-) 55,4 (-68,0)	(4,5-) 35,4 (-59,7)	--
<i>P. parasitica</i>						
En estudio	(3,4-) 12,7 (-36,2)	(11,9-) 21,8 (-39,2)	(10,5-) 27,7 (-52,5)	(17,2-) 33,6 (-63,8)	(18,3-) 33,3 (-58,5)	(2,0-) 20,7 (-40,0)
Referencia	(1,4-) 10,6 (-15,3)	(13,4-) 19,8 (-27,3)	(32,3-) 35,5 (-37,2)	(32,5-) 37,9 (-54,3)	(27,7-) 29,8 (-40,4)	(4,2) 14,6 (-29,3)

^z Sin crecimiento

Los aislados de *P. parasitica* presentaron ratios de crecimiento menores a 16 y 35 °C que a 20 y 24 °C (**Tablas 10.7 y 10.8**), siendo a 28 y 32 °C su tasa de crecimiento más alta, al igual que los valores obtenidos para los aislados de referencia. La temperatura óptima de crecimiento para los aislados en estudio osciló entre 24,9 y 31,6 (**Tabla 10.11**), mientras que para los aislados de referencia estaba entre 26,8 y 31,0 °C (**Tabla 10.12**).

Patrones de crecimiento

Los patrones de crecimiento encontrados en este estudio se muestran en las **Figuras 3.1 y 3.2**. El patrón de crecimiento de *P. citrophthora* fue mayoritariamente petaloide (**Tabla 3.8**) para las temperaturas 16, 20, 24 y 28 °C, siendo las proporciones 89,3; 91,1; 88,4; y 81,2 % respectivamente. El porcentaje de aislados que presentaron patrones de crecimiento petaloides, (semipetaloide o ligeramente petaloide) a 32 °C fue del 6%. La máxima variabilidad se dió a esta temperatura, donde los patrones de crecimiento que se presentaron con más frecuencia fueron: sin patrón de crecimiento (49,1%) y rosáceos (35,7%). Otros patrones de colonia presentados con menor frecuencia fueron semipetaloide, ligeramente petaloide, radiado, estelado, estelado-rosáceo, semi-estelado y semi-rosáceo. El margen de la colonia fue mayoritariamente regular, encontrando bajas proporciones de márgenes irregulares a diferentes temperaturas excepto a 32 °C, donde se encontró una proporción del 24,1%. En los aislados de referencia se obtuvo similares resultados, donde la mayor variabilidad de morfología de colonia fue a 32 °C (**Tabla 3.8**).

En *P. parasitica* los patrones de crecimiento más comunes en casi todas las temperaturas ensayadas fueron: sin patrón de crecimiento y estolonífero (**Tabla 3.8**). En menor proporción se observaron las formas petaloide, semiestelada y radiada. El margen de la colonia más frecuentemente encontrado fue uniforme y, en menor proporción, el margen irregular. La mayor variabilidad de patrones de crecimiento se encontró a las temperaturas de 32 y 35 °C, observándose la misma tendencia en los aislados de referencia. En anexos (**Tablas 10.13 a 10.16**) aparecen en forma detallada los tipos de margen de crecimiento para cada aislado en estudio.

Análisis estadístico multivariante

En el estudio estadístico se eligieron los dos factores que presentaron un valor propio mayor (**Tabla 3.9**). Se puede observar que el **factor 1** explica un 32,49 % de la variabilidad total y el **factor 2** un 18,25 %, representando entre ambos el 50,74 %. Se escogieron estos dos factores ya que al aumentar el número de los mismos se incrementa la representación de la variabilidad, pero se reduce la facilidad de interpretación de resultados. Este análisis se hizo con aislados de ambas especies de *Phytophthora*.

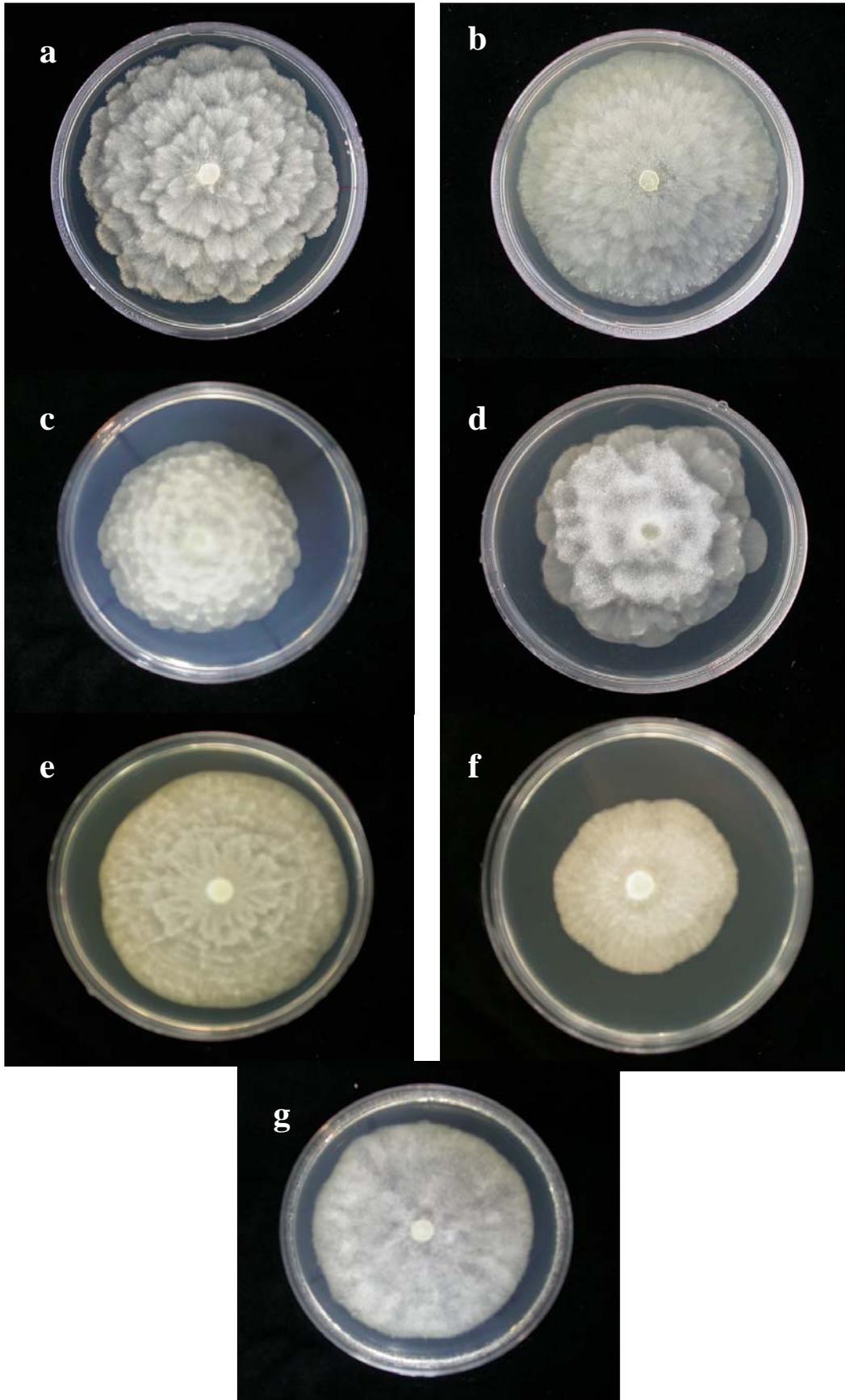


Figura 3.1. Patrones de crecimiento en medio PDA de aislados de *P. citrophthora* de cítricos. a. Petaloide; b. Semipetaloide; c. Rosáceo; d. Semirosáceo; e. Estelado; f. Semiestelado; g. Sin patrón de crecimiento

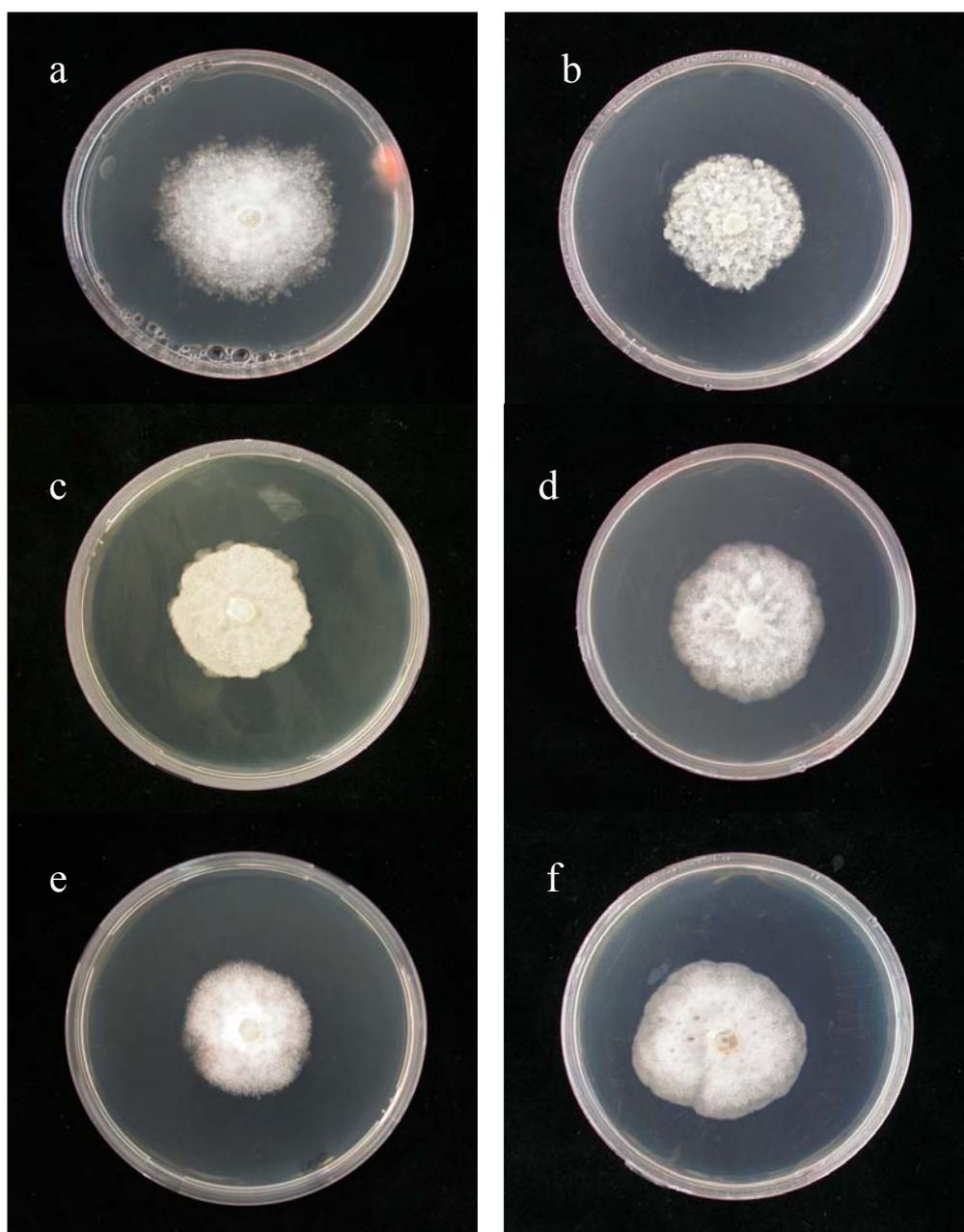


Figura 3.2. Patrones de crecimiento en medio PDA de aislados de *P. parasitica* de cítricos. a. Estolonífero; b. Rosáceo; c. Estelado; d. Estelado - rosáceo; e. Algodonoso; f. Sin patrón de crecimiento.

Tabla 3.8. Patrones de crecimiento y márgenes de colonia de aislados de *Phytophthora* utilizados en el estudio

	16 °C		20 °C		24 °C		28 °C		32 °C		35 °C										
	Patrón (%)	Margen (%)	Patrón (%)	Margen (%)	Patrón (%)	Margen (%)	Patrón (%)	Margen (%)	Patrón (%)	Margen (%)	Patrón (%)	Margen (%)									
<i>P. citrophthora</i>	Aislados en estudio																				
	P	89	U	96	P	88	U	83	P	81	U	83	SP	49	U	76	s.c.				
	SP	5	I	4	Spet.	3	I	17	R	8	I	17	R	35	I	24					
	Spet	1			R	3			E	4			L.E	4							
	E	1			L.E.	3			Spet	3			SR	4							
	Ra	1			E	3			SP	3			L.P	2							
	SE	1							E.R.	1			P	2							
	L.E.	1							Spet	2			Spet	2							
	E.R.	1							E.R.	1			E.R.	1							
									Ra	1			Ra	1							
Aislados de referencia																					
P	32	U	100	P	38	U	82	Ra	43	U	93	Spet	38	U	63	s.c.					
SP	25	I	0	Ra	36	I	18	P	31	I	7	P	31	I	37						
SE	25			SP	13			SP	13			SP	13								
E	18			Spet	13			SP	6			R	6								
								SE	6			SR	6								
								SE	6			SE	6								
En estudio																					
SP	91	U	100	SP	73	U	100	SP	60	U	61	SP	53	U	39	SP	64	U	8		
P	9	I	0	Ef	15	I	0	Ef	24	I	39	Ef	43	I	67	Ef	30	E	36	I	92
				Ra	4			E	16			E	4			R	17				
				Spet	4																
				SE	4																
SP	75	U	75	SP	40	U	60	SP	75	U	50	SP	75	U	40	Ef	60	Ef	75	U	0
Ef	25	I	25	Ef	40	I	40	Ef	25	I	50	Ef	25	I	50	R	20	R	25	I	100
				Spet	20			Spet	20			E	20			E	20				

P = Petaloide Spet = Semipetaloide R = Rosáceo Ra = Radiado Ef = Estolonifera
SE = Semiestelado E = Estelado SR = Semirosáceo SP = Sin pattern U = Uniforme
s.c. = Sin crecimiento L.P. = Ligeramente petaloide L.E. = Ligeramente estelado E.R. = Estelado a rosáceo I = Indefinido

Tabla 3.9. Valores propios y variabilidad explicada por cada uno de los factores obtenidos en el estudio.

Nº de factor	Valor propio	% de variación	Acumulado
1	4,5488	32,491	32,491
2	2,5553	18,252	50,743
3	1,3973	9,981	60,724
4	1,2161	8,686	69,410
5	1,0648	7,605	77,016
6	0,9003	6,431	83,447
7	0,5828	4,163	87,609
8	0,4856	3,468	91,078
9	0,3880	2,772	93,849
10	0,3009	2,150	95,999
11	0,2598	1,855	97,854
12	0,1908	1,363	99,218
13	0,0751	0,536	99,754
14	0,0344	0,246	100,000

En la **Tabla 3.10** se representan los 14 parámetros incluidos en este estudio, los cuales poseen un coeficiente para cada parámetro para el **factor 1** y para el **factor 2**. Estos coeficientes multiplican a los valores de cada aislado para cada uno de los parámetros. La suma de estos productos respecto al factor 1 representa la posición de cada aislado en el eje X, mientras que la suma de los productos del **factor 2** proporciona la posición de cada uno de los parámetros de cada aislado, ofreciendo un valor que, al ser sumado junto con todos los referentes al factor 1 proporcionan a cada aislado una posición en el eje Y. Tanto la posición en el eje X como en el eje Y representa la posición de cada aislado en la **Figura 3.4**

Los parámetros que más inciden en el **factor 1** (**Tabla 3.10; Figura 3.3**) son: crecimiento a 35 °C (-0,9354), crecimiento a 24 °C (-0,8968), formación de estructuras sexuales (0,8922), temperatura óptima de crecimiento (-0,7845), patrón de crecimiento a 24 °C (-0,7641) y la zona de aislamiento en el árbol (-0,7185). En el **factor 2** se obtuvo que los parámetros longitud (0,8798) y anchura de esporangios (0,7216) y ratio L:A de los esporangios (0,7494) seguidos de la papilación (-0,5648) y de la formación de clamidosporas (0,5260) incidían en mayor medida.

En el **factor 1** (eje X) se aprecia la formación de dos grupos de aislados, lo que permite hacer una separación interespecífica entre ellos (**Figuras 3.3 y 3.4**). El primer grupo de aislados (**Figuras 3.3 y 3.4**) se caracterizó por no crecer a 35 °C, presentó mayores tasas de crecimiento y temperaturas óptimas alrededor de 24 °C. Estos aislados tuvieron la tendencia de no formar estructuras sexuales al ser apareados. El patrón de colonia a 24 °C tendía a ser petaloide o semipetaloide y se aisló frecuentemente de ramas de árboles enfermos y en menor proporción a partir de tronco, raíces y frutos.

Tabla 3.10. Descripción de los factores analizados en el estudio estadístico.

Parámetro	Factor 1	Factor 2
Zona de aislamiento	-0,7185	0,2346
Hospedante	-0,1576	0,1246
Longitud esporangio	0,0541	0,8798
Anchura esporangio	0,1318	0,7216
Ratio L:A	-0,0923	0,7494
Papilación	-0,2958	-0,5648
Clamidosporas	0,3608	0,5260
Estructuras sexuales	0,8922	-0,0726
Temperatura óptima	-0,7845	-0,2746
Crecimiento 24 °C	-0,8968	0,0242
Crecimiento 32 °C	0,0281	-0,0378
Crecimiento 35 °C	-0,9354	-0,0597
Patrón crecimiento 24 °C	-0,7641	0,1275
Margen 24 °C	-0,2929	-0,0690

El segundo grupo se caracterizó por presentar crecimiento a 35 °C; sin embargo, su tasa de crecimiento era lenta a 24 °C y formó frecuentemente estructuras sexuales al ser apareados. Las temperaturas óptimas de este grupo de aislados tendían a ser elevadas, no poseía patrón definido de crecimiento o su patrón era estolonífero y se aisló mayoritariamente de tronco y raíces de árboles afectados.

Por su parte, la variabilidad observada en el **factor 2** constituye una variación intraespecífica de los aislados en función de las dos especies separadas mediante los parámetros del **factor 1**. En este caso, no se observa una agrupación definida de individuos entre grupos poblacionales. Sin embargo, se puede observar que los aislados que en mayor proporción presentaron esporangios más largos, más anchos y con un ratio L:A más elevado, eran frecuentemente papilados y formaron comúnmente clamidosporas.

De acuerdo a las características morfológicas y fisiológicas, el primer grupo de aislados (**Figura 3.4**) se corresponde con la especie *P. parasitica*, que es una especie adaptada a climas tropicales y la fase sexual juega un rol importante en su ciclo de vida (Erwin y Ribeiro, 1996). Comúnmente afecta a los cítricos en España en épocas de verano. El segundo grupo se corresponde con la especie *P. citrophthora*, que predomina en primavera y otoño (Erwin y Ribeiro, 1996) pues tiene requerimientos térmicos menores que *P. parasitica*. *P. citrophthora* es una especie cuya fase sexual no forma parte importante en su ciclo de vida, y es la especie predominante en zonas con climas mediterráneos.

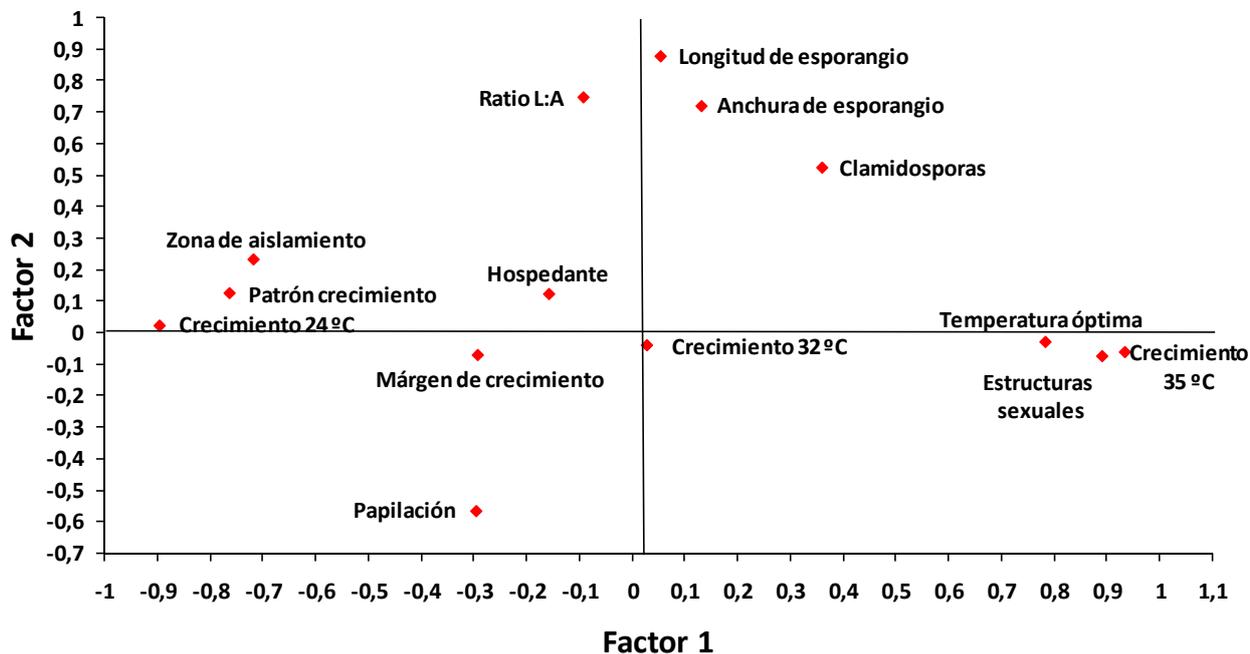


Figura 3.3. Representación de los parámetros en función de los factores estudiados

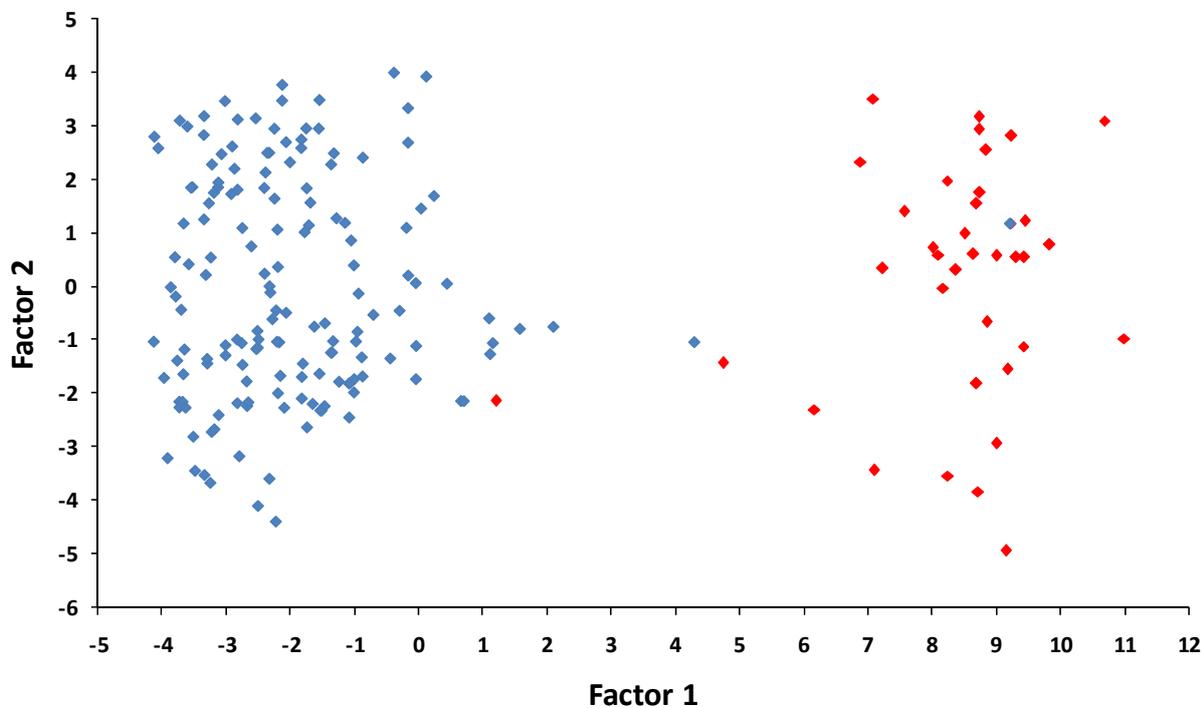


Figura 3.4. Representación de los aislados en función de los dos factores estudiados

3.3.2. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE AISLADOS DE *Phytophthora* DE CÍTRICOS

3.3.2.1. Ensayos de sensibilidad *in vitro* a fungicidas acilalaninas

a1. Sensibilidad de aislados de *P. citrophthora* a metalaxil y mefenoxam

El metalaxil redujo significativamente las tasas de crecimiento en la mayoría de los aislados de *P. citrophthora* en estudio (**Tabla 3.11**). De 74 aislados ensayados, 52 (70,3 %) se clasificaron como sensibles, debido a que sus tasas de crecimiento sobre el medio con 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de metalaxil no sobrepasaron el 40 % del crecimiento del control. Dieciocho aislados (24,3 %) se consideraron con sensibilidad intermedia, donde la tasa de crecimiento a 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de metalaxil fue mayor del 40 % del control, pero el porcentaje de crecimiento a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ fue menor del 40 % respecto al control. Cuatro aislados (5,4 %) resultaron resistentes a este fungicida, donde el porcentaje de crecimiento medio en 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de metalaxil fue mayor del 40 % de los controles (40,8 a 56,9 %). En la **Tabla 3.13**, aparecen los valores de la CE_{50} al metalaxil de los aislados estudiados. En función de los datos de reducción de crecimiento *in vitro* a este fungicida presentado en la **Tabla 10.17 (Anexos)**, se encontró que los aislados que presentaron valores de CE_{50} entre 0,1 y 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, se catalogaron como sensibles. Asimismo, los aislados que presentaron valores comprendidos entre 2,5 y 5,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$, se clasificaron como moderadamente sensibles, y aquellos que presentaron valores entre 5,9 y 723 $\mu\text{g ml}^{-1}$, se consideraron como resistentes. La totalidad de cepas con sensibilidad intermedia o resistencia a este fungicida procedieron de las provincias de Castellón, Huelva y Valencia.

El mefenoxam redujo significativamente las tasas de crecimiento de la mayoría de los aislados de *P. citrophthora* (**Tabla 3.12**). De 74 aislados ensayados, 59 (79,7 %) se clasificaron como sensibles, catorce aislados (18,9 %) se catalogaron con sensibilidad intermedia, y sólo un aislado (1,4 %) resultó resistente a este fungicida. En la **Tabla 3.14**, aparecen los valores de la CE_{50} al mefenoxam de los aislados estudiados. Aislados que presentaron valores entre 0,1 y 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, se clasificaron como sensibles. Aislados que presentaron valores comprendidos entre 2,5 y 6,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, se clasificaron como moderadamente sensibles, y aquellos que presentaron valores entre 6,5 y 475 $\mu\text{g ml}^{-1}$, se consideraron como resistentes. La totalidad de cepas con sensibilidad intermedia y resistencia a este fungicida procedieron de las provincias de Castellón, Huelva y Valencia.

En cuanto a la sensibilidad de los aislados a ambos fungicidas, se encontró un mayor número de aislados sensibles al mefenoxam que al metalaxil.

Tabla 3.11. Sensibilidad al metalaxil de aislados de *P. citrophthora* de cítricos

Aislados ^Y	Sensibilidad ^Z	% de crecimiento <i>in vitro</i> respecto al testigo				
		Dosis de metalaxil ($\mu\text{g ml}^{-1}$)				
		0,1	1	5	10	100
Phy 001	I	100,00	63,75	50,60	3,13	0,00
Phy 002	S	93,65	72,73	4,13	1,65	0,00
Phy 003	I	97,90	81,15	64,80	9,84	0,00
Phy 004	I	100,00	69,87	53,90	0,00	0,00
Phy 006	I	90,10	56,67	48,30	33,00	0,00
Phy 008	S	100,00	71,33	37,80	0,00	0,00
Phy 010	S	100,00	55,17	33,90	5,52	0,00
Phy 011	S	100,00	69,68	27,10	16,77	17,42
Phy 012	S	100,00	70,00	38,60	0,00	0,00
Phy 014	I	100,00	66,47	58,70	0,60	0,00
Phy 015	S	52,10	10,64	8,51	8,51	4,26
Phy 016	I	114,50	73,43	44,10	25,87	18,88
Phy 017	I	100,00	76,58	73,40	0,00	0,00
Phy 018	I	100,00	56,23	51,10	0,00	1,00
Phy 020	S	83,54	28,40	27,80	20,99	9,88
Phy 022	S	72,32	36,46	38,02	39,58	12,50
Phy 023	S	66,61	39,60	33,60	30,20	14,85
Phy 026	S	84,38	46,50	9,70	3,04	1,00
Phy 027	S	91,31	24,37	17,70	11,76	0,00
Phy 028	S	100,00	78,21	37,20	20,51	13,46
Phy 031	S	89,14	44,19	37,60	19,35	1,00
Phy 032	I	86,17	48,96	51,04	34,38	1,00
Phy 035	S	78,78	41,56	28,60	0,00	0,00
Phy 037	S	100,00	62,88	36,50	1,24	1,00
Phy 041	S	100,00	71,46	30,10	3,02	1,00
Phy 042*	S	72,60	38,16	24,50	28,06	0,00
Phy 043*	S	68,32	26,02	25,50	29,08	1,02
Phy 044	S	90,12	42,38	30,90	27,14	3,81
Phy 045	S	73,73	39,72	20,50	28,04	13,55
Phy 046	R	146,10	74,34	62,80	57,77	56,90
Phy 049	S	49,79	6,77	14,60	18,23	1,00
Phy 050	S	100,00	58,39	10,07	7,38	8,72
Phy 051	I	92,15	64,79	45,10	14,08	0,00
Phy 054	I	87,98	49,88	43,90	41,57	0,00
Phy 055	I	100,00	69,74	47,80	1,44	0,00
Phy 057	S	100,00	61,02	23,60	0,66	1,00
Phy 058	S	100,00	53,15	34,90	0,00	0,00
Phy 059	S	41,72	8,43	8,40	0,00	0,00
Phy 063	I	54,67	10,06	45,30	39,11	32,40
Phy 066	S	66,54	31,22	24,60	0,00	0,00
Phy 067	S	72,06	44,11	11,50	0,00	0,00
Phy 069	I	84,80	53,55	52,30	42,58	2,58
Phy 070	S	61,12	22,77	29,20	17,41	16,96
Phy 072	S	56,32	26,28	32,70	35,26	22,44
Phy 073	S	90,70	35,25	17,80	4,14	0,00
Phy 075	S	84,67	46,15	34,10	30,29	0,00
Phy 077	S	74,65	38,07	28,90	27,52	0,00

Sigue Tabla 3.11...

Aislados ^Y	Sensibilidad ^Z	% de crecimiento <i>in vitro</i> respecto al testigo				
		Dosis de metalaxil ($\mu\text{g ml}^{-1}$)				
		0,1	1	5	10	100
Phy 087	S	83,33	33,44	24,90	0,00	0,00
Phy 114	S	87,17	39,40	35,70	0,00	0,00
Phy 115	S	93,90	56,44	38,70	9,09	0,00
Phy 116	S	100,00	58,23	39,20	2,02	0,00
Phy 118	S	100,00	63,43	12,60	0,00	0,00
Phy 136	I	88,55	45,33	56,60	1,21	0,00
Phy 137	I	122,00	84,48	61,20	3,45	0,00
Phy 147	I	94,76	53,33	41,33	23,33	12,00
Phy 152	S	98,40	62,58	25,15	15,95	8,59
Phy 155	S	62,19	18,84	1,00	0,00	0,00
Phy 156	S	71,21	23,22	8,70	12,13	1,00
Phy 157	S	90,50	33,33	24,80	28,10	1,00
Phy 158	R	100,00	65,75	58,20	57,53	45,21
Phy 160	S	39,37	9,21	15,80	10,53	5,26
Phy 161	S	118,70	75,16	26,80	29,30	15,92
Phy 162	R	124,43	66,67	60,80	65,00	40,80
Phy 164	R	108,80	61,02	51,10	47,80	43,30
Phy 165	S	92,10	52,66	14,80	13,02	8,28
Phy 166	S	100,00	61,04	25,30	15,58	9,74
Phy 167	S	62,10	14,97	14,90	2,72	2,22
Phy 169	S	78,31	22,22	17,40	13,89	10,42
Phy 171	S	65,25	12,33	4,67	0,00	0,00
Phy 172	S	81,24	32,22	9,34	0,00	0,00
Phy 177	I	100,00	59,60	40,80	7,95	1,00
Phy 189*	S	79,79	45,22	26,70	2,11	0,00
Phy 190	S	100,00	63,22	36,6	9,24	0
Phy 192	S	100,00	53,22	33,20	0,00	1,00

^Y Los orígenes de los aislados aparecen en las Tablas 3.1 y 3.2

^Z S = sensible, I = intermedio, R = resistente.

* Aislados de referencia.

Tabla 3.12. Sensibilidad al mefenoxam de aislados de *P. citrophthora* de cítricos

Aislados ^Y	Sensibilidad ^Z	% de crecimiento <i>in vitro</i> respecto al testigo				
		Dosis de mefenoxam ($\mu\text{g ml}^{-1}$)				
		0,1	1	5	10	100
Phy 001	I	88,51 ^Z	55,61	52,55	12,76	1,53
Phy 002	S	100,00	47,37	21,11	14,21	0,62
Phy 003	I	100,00	76,70	71,02	30,68	4,55
Phy 004	I	100,00	79,65	44,19	19,19	4,07
Phy 006	I	100,00	55,56	40,17	20,03	3,30
Phy 008	I	100,00	64,21	43,16	12,11	2,11
Phy 010	S	100,00	61,50	30,00	11,00	3,50
Phy 011	S	100,00	44,31	14,37	20,36	8,38
Phy 012	S	100,00	56,34	34,74	5,16	1,88
Phy 014	I	100,00	62,56	44,83	8,87	2,96
Phy 015	S	50,51	8,76	8,76	7,62	0,00
Phy 016	I	100,00	66,85	45,65	20,11	4,35
Phy 017	I	100,00	66,84	50,00	30,53	1,05
Phy 018	S	100,00	32,56	28,50	12,87	1,10
Phy 020	S	100,00	20,24	34,52	11,90	2,38
Phy 022	S	42,23	2,53	0,63	0,00	0,00
Phy 023	S	44,44	5,26	3,68	3,68	2,11
Phy 026	S	63,78	14,66	10,60	9,99	0,14
Phy 027	S	38,14	2,21	1,66	2,21	1,10
Phy 028	S	56,20	32,58	27,53	19,10	1,69
Phy 031	S	38,47	4,55	0,00	0,00	0,00
Phy 032	S	51,58	2,50	2,50	2,50	0,00
Phy 035	S	82,42	46,67	33,33	11,79	7,69
Phy 037	S	73,52	38,98	22,70	5,80	4,52
Phy 041	S	69,44	22,56	12,87	3,65	0,00
Phy 042*	S	65,20	4,76	5,95	5,95	5,95
Phy 043*	S	73,30	5,00	4,38	1,88	4,38
Phy 044	S	68,65	9,60	6,87	6,54	0,15
Phy 045	S	70,10	6,11	6,67	5,56	5,00
Phy 046	I	100,00	71,88	46,88	36,72	18,75
Phy 049	S	60,14	3,14	1,26	1,26	0,00
Phy 050	S	100,00	40,76	39,01	38,90	2,22
Phy 051	S	100,00	48,35	30,58	25,21	5,79
Phy 054	S	100,00	51,50	20,60	9,61	6,60
Phy 055	I	100,00	63,30	41,98	22,50	12,30
Phy 057	S	100,00	45,60	37,70	35,60	3,50
Phy 058	S	100,00	49,04	36,54	13,94	5,29
Phy 059	S	55,55	6,82	6,82	6,82	6,82
Phy 063	S	71,40	4,79	4,79	4,79	4,19
Phy 066	S	72,10	17,55	12,50	5,55	0,20
Phy 067	S	88,70	35,60	22,90	21,56	2,22
Phy 069	S	71,28	18,25	28,57	35,71	23,81
Phy 070	S	60,15	5,06	5,06	8,99	5,06
Phy 072	S	73,66	20,97	18,55	9,68	10,48
Phy 073	S	74,40	21,60	18,60	6,89	0,10
Phy 075	S	66,10	5,00	3,33	6,67	6,67
Phy 077	S	63,44	5,75	5,17	6,90	0,57

Sigue Tabla 3.12...

Aislados ^Y	Sensibilidad ^Z	% de crecimiento <i>in vitro</i> respecto al testigo				
		Dosis de mefenoxam ($\mu\text{g ml}^{-1}$)				
		0,1	1	5	10	100
Phy 087	S	82,87	24,67	22,02	0,98	0
Phy 114	S	100,00	56,80	35,74	27,7	9,6
Phy 115	S	100,00	48,57	38,70	16,19	11,43
Phy 116	S	100,00	60,63	29,61	9,05	7,69
Phy 118	S	100,00	56,7	35,7	15,8	15,8
Phy 136	S	94,63	40,5	17,7	0	0
Phy 137	I	100,00	66,6	42,88	25,7	2,08
Phy 147	S	100,00	53,21	37,82	33,97	7,05
Phy 152	S	100,00	46,10	3,90	14,29	5,84
Phy 155	S	33,93	0,00	0,00	0,00	0,00
Phy 156	S	100,00	30,6	30,1	7,89	0
Phy 157	S	71,79	12,57	12,57	9,71	6,29
Phy 158	I	100,00	32,67	43,33	35,33	2,67
Phy 160	S	78,89	8,75	2,50	1,25	0,00
Phy 161	S	93,80	28,57	29,22	22,08	5,19
Phy 162	R	110,00	74,55	81,82	77,27	43,64
Phy 164	I	100,00	60,64	56,6	22,5	31,9
Phy 165	S	65,60	5,88	2,35	2,35	1,18
Phy 166	S	79,70	20,59	10,00	8,24	4,71
Phy 167	S	58,70	5,56	2,47	2,47	0,62
Phy 169	S	52,04	4,65	0,00	0,00	0,00
Phy 171	S	76,65	34,49	32,7	22,9	0
Phy 172	S	93,45	51,78	27,8	12,78	3,7
Phy 177	I	100,00	66,83	46,61	17,33	9,41
Phy 189*	S	63,98	25,6	12,5	0	0
Phy 190	S	100,00	59,8	26,6	26,6	26,6
Phy 192	S	60,14	8,94	8,94	8,94	8,94

^Y Los orígenes de los aislados aparecen en las Tablas 3.1 y 3.2

^Z S = sensible, I = intermedio, R = resistente.

* Aislados de referencia.

Tabla 3.13. Valores de la concentración efectiva media (CE₅₀) del metalaxil respecto a los aislados españoles de *P. citrophthora*.

Aislados ^Y	CE ₅₀ (µg ml ⁻¹)		Aislados	CE ₅₀ (µg ml ⁻¹)	
	Media	Límites fiduciales ^Z		Media	Límites fiduciales
Phy 001	2,775	2,032 - 3,664	Phy 059	0,019	0,000 - 0,131
Phy 002	1,462	1,151 - 1,808	Phy 063	4,132	1,450 - 5,567
Phy 003	5,905	4,568 - 7,571	Phy 066	0,508	0,217 - 0,865
Phy 004	2,965	3,657 - 4,786	Phy 067	0,831	0,511 - 1,145
Phy 006	2,802	1,522 - 4,459	Phy 069	3,100	2,567 - 3,430
Phy 008	1,237	0,971 - 1,717	Phy 070	0,096	0,017 - 0,712
Phy 010	1,585	1,019 - 2,250	Phy 072	0,227	0,197 - 0,933
Phy 011	1,386	1,229 - 1,899	Phy 073	0,429	0,161 - 0,790
Phy 012	1,419	1,129 - 1,880	Phy 075	0,909	0,281 - 1,859
Phy 014	3,287	2,501 - 4,248	Phy 077	0,341	0,047 - 0,946
Phy 015	1,210	0,230 - 2,057	Phy 087	0,581	0,269 - 0,951
Phy 016	5,250	3,126 - 8,087	Phy 114	0,953	0,540 - 1,429
Phy 017	5,094	4,029 - 6,451	Phy 115	1,048	0,774 - 1,654
Phy 018	2,241	1,588 - 3,013	Phy 116	1,524	1,150 - 2,091
Phy 020	0,018	0,061 - 0,242	Phy 118	1,450	1,132 - 1,789
Phy 022	0,093	0,058 - 0,869	Phy 136	4,017	3,004 - 4, 813
Phy 023	0,167	0,071 - 0,921	Phy 137	5,265	4,175 - 6,634
Phy 026	0,672	0,349 - 1,054	Phy 147	2,689	0,655 - 3,149
Phy 027	0,063	0,002 - 0,271	Phy 152	1,024	0,826 - 1,856
Phy 028	1,513	0,913 - 2,039	Phy 155	0,373	0,085 - 0,606
Phy 031	0,969	0,381 - 1,789	Phy 156	0,015	0,004 - 0,126
Phy 032	2,111	0,929 - 3,719	Phy 157	0,110	0,003 - 0,505
Phy 035	0,914	0,529 - 1,347	Phy 158	84,343	20,289 - 505,345
Phy 037	1,476	1,004 - 2,015	Phy 160	0,771	--
Phy 041	1,350	0,735 - 2,074	Phy 161	3,474	1,862 - 5,600
Phy 042*	0,114	0,001 - 0,963	Phy 162	277,788	--
Phy 043*	0,016	0,005 - 0,209	Phy 164	768,622	135,317 - 933,231
Phy 044	0,503	0,088 - 1,277	Phy 165	0,629	0,209 - 1,263
Phy 045	0,048	0,001 - 0,435	Phy 166	1,491	0,716 - 2,513
Phy 046	402,983	70,171 - 836,814	Phy 167	0,016	0,006 - 0,120
Phy 049	0,020	0,001 - 0,414	Phy 169	0,110	0,001 - 0,234
Phy 050	0,828	0,371 - 1,440	Phy 171	0,077	0,002 - 0,262
Phy 051	2,894	1,962 - 4,024	Phy 173	0,486	0,210 - 0,773
Phy 054	1,778	0,644 - 3,405	Phy 177	2,136	1,409 - 3,006
Phy 055	2,974	2,265 - 3,830	Phy 189*	1,467	0,981 - 2,021
Phy 057	1,563	1,103 - 2,083	Phy 190	0,968	0,561 - 1,439
Phy 058	1,533	1,055 - 2,073	Phy 192	2,214	1,495 - 3,069

*Aislados de referencia.

^Y Los orígenes de los aislados aparecen en las Tablas 3.1 y 3.2.

^Z Límites fiduciales para una probabilidad del 95%.

Tabla 3.14. Valores de la concentración efectiva media (CE₅₀) del mefenoxam respecto a los aislados españoles de *P. citrophthora*.

Aislados ^Y	CE ₅₀ (µg ml ⁻¹)		Aislado	CE ₅₀ (µg ml ⁻¹)	
	Media	Límites fiduciales ^Z		Media	Límites fiduciales
Phy 001	2,514	1,589 - 3,649	Phy 059	0,178	0,001 - 0,767
Phy 002	1,277	1,033 - 1,894	Phy 063	< 0,1	--
Phy 003	6,161	6,626 - 12,507	Phy 066	< 0,1	0,003 - 0,158
Phy 004	2,123	1,562 - 2,468	Phy 067	0,183	0,015 - 0,609
Phy 006	2,904	1,009 - 3,048	Phy 069	1,655	0,098 - 1,999
Phy 008	1,104	0,796 - 1,809	Phy 070	< 0,1	--
Phy 010	0,989	0,512 - 1,340	Phy 072	< 0,1	--
Phy 011	0,211	0,018 - 0,690	Phy 073	< 0,1	0,005 - 0,28440
Phy 012	1,553	1,046 - 2,376	Phy 075	0,222	0,078 - 0,788
Phy 014	2,591	1,726 - 3,639	Phy 077	< 0,1	--
Phy 015	< 0,1	0,001 - 0,191	Phy 087	0,272	0,073 - 0,570
Phy 016	3,444	2,214 - 4,978	Phy 114	1,890	0,788 - 3,413
Phy 017	4,226	2,712 - 6,150	Phy 115	1,477	1,017 - 2,778
Phy 018	0,296	0,058 - 0,734	Phy 116	1,511	1,302 - 2,009
Phy 020	< 0,1	--	Phy 118	1,583	0,649 - 2,879
Phy 022	< 0,1	--	Phy 136	0,877	0,122 - 1,023
Phy 023	< 0,1	--	Phy 137	3,307	2,496 - 4,458
Phy 026	< 0,1	--	Phy 147	1,576	0,536 - 3,099
Phy 027	< 0,1	--	Phy 152	0,230	0,039 - 0,613
Phy 028	0,196	0,019 - 0,622	Phy 155	0,000	--
Phy 031	0,869	0,056 - 1,123	Phy 156	0,364	0,100 - 0,781
Phy 032	< 0,1	--	Phy 157	< 0,1	--
Phy 035	0,878	0,329 - 1,659	Phy 158	3,277	2,090 - 4,070
Phy 037	0,431	0,135 - 0,884	Phy 160	< 0,1	0,0001 - 0,189
Phy 041	0,114	0,014 - 0,331	Phy 161	< 0,1	0,0002 - 0,362
Phy 042*	< 0,1	--	Phy 162	475,635	119,728 - 908,187
Phy 043*	< 0,1	--	Phy 164	2,998	2,213 - 3,957
Phy 044	< 0,1	--	Phy 165	< 0,1	--
Phy 045	< 0,1	--	Phy 166	< 0,1	--
Phy 046	6,494	3,679 - 10,494	Phy 167	< 0,1	--
Phy 049	< 0,1	--	Phy 169	0,615	--
Phy 050	1,184	0,530 - 2,058	Phy 171	0,329	0,049 - 0,890
Phy 051	0,824	0,231 - 1,757	Phy 173	1,079	0,509 - 1,825
Phy 054	0,803	0,334 - 1,448	Phy 177	2,468	1,488 - 3,129
Phy 055	2,930	1,569 - 4,707	Phy 189*	0,469	0,001 - 0,810
Phy 057	0,899	0,196 - 2,082	Phy 190	1,151	0,179 - 2,935
Phy 058	1,568	1,122 - 1,678	Phy 192	0,301	0,089 - 0,574

* Aislados de referencia.

^Y Los orígenes de los aislados aparecen en las Tablas 3.1 y 3.2.

^Z Límites fiduciales para una probabilidad del 95%.

a.2. Localización de parcelas de cítricos con aislados de *Phytophthora* insensibles al metalaxil y mefenoxam

En la **Tabla 3.15** se muestra la distribución de los aislados resistentes o con sensibilidad intermedia al metalaxil y al mefenoxam en función de su origen geográfico. En la provincia de Huelva se encontró la mayoría de estos aislados. De 18 aislados con sensibilidad intermedia al metalaxil, 12 de ellos procedieron de Huelva, 3 de Castellón y 3 de la provincia de Valencia. De los 4 aislados que resultaron resistentes, 3 procedieron de Huelva y el restante de Castellón. De los 14 aislados en los cuales se encontró sensibilidad intermedia al mefenoxam, 11 procedieron de la provincia de Huelva, 2 de Castellón y 1 de Valencia. El único aislado resistente a este fungicida provino de la provincia de Huelva (Phy 162, Gibraleón).

Se encontró parcelas en las cuales se aislaron cepas insensibles a ambos fungicidas, 8 de ellas procedieron de Huelva, 1 de Castellón y 1 de Valencia; asimismo, un aislado (Phy 162) de Gibraleón – Huelva, fue resistente a ambos fungicidas.

Tabla 3.15. Origen geográfico de aislados de *P. citrophthora* de cítricos con sensibilidad intermedia (I) o resistencia (R) al metalaxil y mefenoxam

Provincia	Localidad	Estudiadas	Número de parcelas					
			Sensibilidad al metalaxil		Sensibilidad al mefenoxam		Sensibilidad metalaxil/mefenoxam	
			I	R	I	R	I	R
Castellón	Alquerias	6	1	1	1	-	-	-
	Burriana	4	2	-	1	-	1	-
Huelva	El Campillo	5	-	1	1	-	-	-
	Gibraleón	20	1	1	-	1	-	1
	Zalamea	7	3	-	2	-	2	-
	Isla Cristina	13	3	-	2	-	2	-
	Onda	5	3	-	3	-	3	-
	Lepe	11	2	1	3	-	1	-
Valencia	Moncada	4	1	-	1	-	1	-
	Silla	2	1	-	-	-	-	-
	Lliria	3	1	-	-	-	-	-

a.3. Sensibilidad de aislados de *P. parasitica* al metalaxil y mefenoxam

Todos los aislados de *P. parasitica* resultaron sensibles tanto al metalaxil como al mefenoxam (**Tabla 3.16**). Los valores de la concentración efectiva media (CE₅₀) de los aislados estudiados para el metalaxil se muestran en la **Tabla 3.17** y para el mefenoxam en la **Tabla 3.18**. Para ambos fungicidas, la CE₅₀ de los aislados estudiados fue muy baja, y en otros, no se pudo estimar la concentración ni su rango debido a la baja tasa de crecimiento de los aislados de *P. parasitica* sobre las diversas concentraciones de fungicidas.

Tabla 3.16. Sensibilidad al metalaxil y mfenoxam de aislados de *P. parasitica* de cítricos

Aislados ^X	Reducción de crecimiento <i>in vitro</i> ^Z					
	Sensibilidad ^Y	Metalaxil		Sensibilidad	Mefenoxam	
		5 µg ml ⁻¹	100 µg ml ⁻¹		5 µg ml ⁻¹	100 µg ml ⁻¹
Phy 019	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 021	S	12,01	4,27	S	8,30	5,30
Phy 025	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 036	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 038	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 039	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 047	S	8,51	0,93	S	8,94	8,94
Phy 048	S	5,71	3,96	S	14,06	11,90
Phy 060	S	8,43	0,00	S	6,80	6,80
Phy 074	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 083	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 084	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 088	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 113	S	2,90	0,00	S	0,00	0,00
Phy 127	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 142	S	4,17	0,00	S	0,00	0,00
Phy 149	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 150	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 168	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00
Phy 173	S	0,00	0,00	S	0,00	0,00

^X Los orígenes de los aislados aparecen en las Tablas 3.1 y 3.2.

^Y S = sensible, I = intermedio, R = resistente.

^Z (100 - [crecimiento con fungicida/crecimiento en la placa control] x 100)

Tabla 3.17. Valor de la concentración efectiva media (CE₅₀) del metalaxil respecto a los aislados españoles de *P. parasitica*

Aislados ^Y	CE ₅₀ (µg ml ⁻¹)		Aislado	CE ₅₀ (µg ml ⁻¹)	
	Media	Límites fiduciales ^Z		Media	Límites fiduciales
Phy 019	< 0,1	--	Phy 083	< 0,1	--
Phy 021	0,716	0,003 - 1,014	Phy 084	< 0,1	--
Phy 025	< 0,1	--	Phy 088	< 0,1	--
Phy 036	< 0,1	0,002 - 0,163	Phy 113	< 0,1	--
Phy 038	< 0,1	--	Phy 127	0,104	0,01 - 0,193
Phy 039	< 0,1	--	Phy 142	< 0,1	--
Phy 047	< 0,1	--	Phy 149	< 0,1	--
Phy 048	0,160	0,023 - 0,211	Phy 150	< 0,1	--
Phy 060	< 0,1	--	Phy 168	< 0,1	--
Phy 074	< 0,1	--	Phy 173	< 0,1	--

^Y Los orígenes de los aislados aparecen en las Tablas 3.1 y 3.2.

^Z Límites fiduciales para una probabilidad del 95%

Tabla 3.18. Valor de la concentración efectiva media (CE₅₀) del mefenoxam respecto a los aislados españoles de *P. parasitica*

Aislados ^Y	CE ₅₀ (µg ml ⁻¹)		Aislado	CE ₅₀ (µg ml ⁻¹)	
	Media	Límites fiduciales ^Z		Media	Límites fiduciales
Phy 019	< 0,1	--	Phy 083	< 0,1	--
Phy 021	< 0,1	--	Phy 084	< 0,1	--
Phy 025	< 0,1	--	Phy 088	< 0,1	--
Phy 036	0,013	0,000 – 0,606	Phy 113	< 0,1	--
Phy 038	< 0,1	--	Phy 142	0,118	0,008 - 0,095
Phy 040	< 0,1	--	Phy 149	< 0,1	--
Phy 047	< 0,1	--	Phy 151	< 0,1	--
Phy 048	0,160	0,027 - 0,433	Phy 155	< 0,1	--
Phy 060	< 0,1	--	Phy 168	< 0,1	--
Phy 074	< 0,1	--	Phy 173	< 0,1	--

^Y Los orígenes de los aislados aparecen en las Tablas 3.1 y 3.2.

^Z Límites fiduciales para una probabilidad del 95%

3.3.2.2. Análisis molecular de los aislados

a. Diferenciación de especies de *Phytophthora*

Siguiendo las metodologías de trabajos publicado sobre RAMS de Hantula *et al.*, (1997) y Cohen *et al.*, (2003), se probó un iniciador anclado al GT en los experimentos con RAMS. Las diferentes especies de *Phytophthora* produjeron patrones distintivos (**Figura 3.5**). La especie *P. citrophthora* presentó bandas específicas de ~430 y ~1600 pb, mientras que la especie *P. parasitica* presentó bandas distintivas de ~990 y ~1050 pb. *P. citricola* presentó bandas características de 850, 1050, 1200, 1500 y 3000 pb.

b. Diversidad intraespecífica en *P. citrophthora*

El análisis RAMS con el iniciador CGA generó 14 patrones de bandas diferentes (**Figura 3.6**). Para el análisis de agrupamiento se consideraron únicamente aquellas bandas que se amplificaron en, al menos, tres repeticiones (**Tabla 3.19**). El patrón 1 (P-1), constituyó el principal grupo de aislados, agrupando al 88,8 % (119/134) de la población (**Tabla 3.19**). El patrón 9 (P-9), incluyó tres aislados, mientras que los otros 12 patrones de banda estuvieron compuestos por sólo un aislado. La mayoría de los aislados identificados como *P. citrophthora* presentaron típicamente una banda de 790 pb y otra de 1550 pb (**Figura 3.6, Tabla 3.19**). El aislado Phy 192 (P-13) presentó sólo una de las bandas características (1550 pb) y el aislado Phy 022 (P-14) no presentó ninguna de ellas.

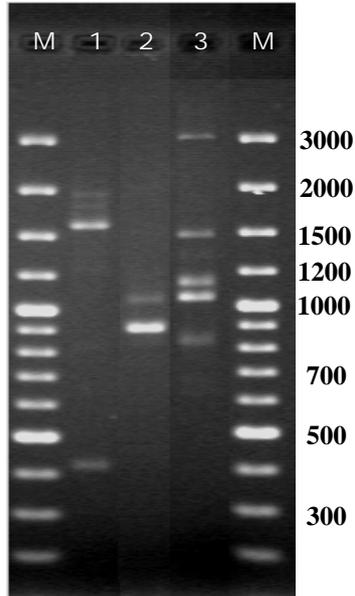


Figura 3.5. Productos de amplificación obtenidos con el iniciador GT para las especies de *Phytophthora* con la técnica de los RAMS. Columna 1: Phy 002 de *P. citrophthora*; columna 2: Phy 047 de *P. parasitica*, columna 3: Phy 091 de *P. citrícola*; M: Marcador.

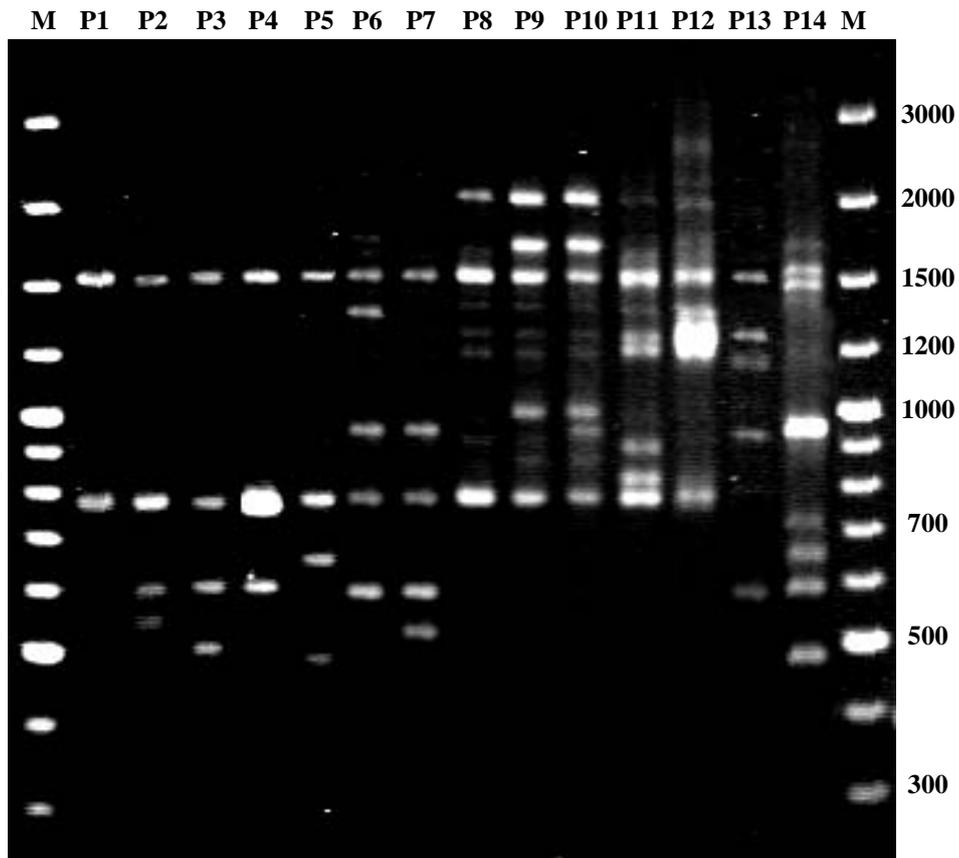


Figura 3.6. Productos de amplificación obtenidos con el iniciador CGA para la especie *P. citrophthora*, con la técnica RAMS de aislados representativos de cada patrón: P-1 (Phy 002), P-2 (Phy 015), P-3 (Phy 068), P-4 (Phy 145), P-5 (Phy 190), P-6 (Phy 134), P-7 (Phy 098), P-8 (Phy 050), P-9 (Phy 011), P-10 (Phy 065), P-11 (Phy 193), P-12 (Phy 037), P-13 (Phy 192), P-14 (Phy 022); M (marcador).

En el dendrograma de la **Figura 3.7**, se puede observar la gran diversidad genotípica entre aislados de *P. citrophthora*. La mayoría de los aislados provenientes de cítricos se agrupan dentro del tipo de patrón 1 (aislado Phy 002) (**Figura 3.7**). Los aislados de referencia se distribuyeron principalmente en los patrones 1, 9, 11 y 12. También se pudo observar un agrupamiento entre los aislados heterotálicos del grupo de apareamiento A2 (**Figura 3.7**) tales como el aislado Phy 037 (P-12) de nuestra colección, y los aislados de referencia Phy 107 (Francia) y Phy 199 (Chile), a diferencia del resto de los aislados de la colección que fueron estériles. Los aislados Phy 022 y Phy 103 identificados como *P. citrophthora* conforman un grupo separado del resto de los aislados pertenecientes a esta especie.

Otra característica relevante es que todos los aislados de referencia de *P. citrophthora* provenientes de hospedantes diferentes a cítricos se agrupan en un solo patrón, denominado P-11 (**Tablas 3.2 y 3.21**). De esto se puede inferir que los aislados de esta especie provenientes de cítricos presentan una población más heterogénea, a diferencia de la homogeneidad genotípica presentada por los aislados provenientes de otros hospedantes distintos de los cítricos.

Tabla 3.19. Distribución de marcadores RAMS entre 132 aislados españoles de *P. citrophthora* de cítricos.

Tamaño de Banda	Patrones CGA													
	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7	P-8	P-9	P-10	P-11	P-12	P-13	P-14
2050	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
1800	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1550	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1400	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1225	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
1100	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
910	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
850	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
790	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
730	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
680	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
670	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
600	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
560	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
540	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
520	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Nº aislados	119	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1

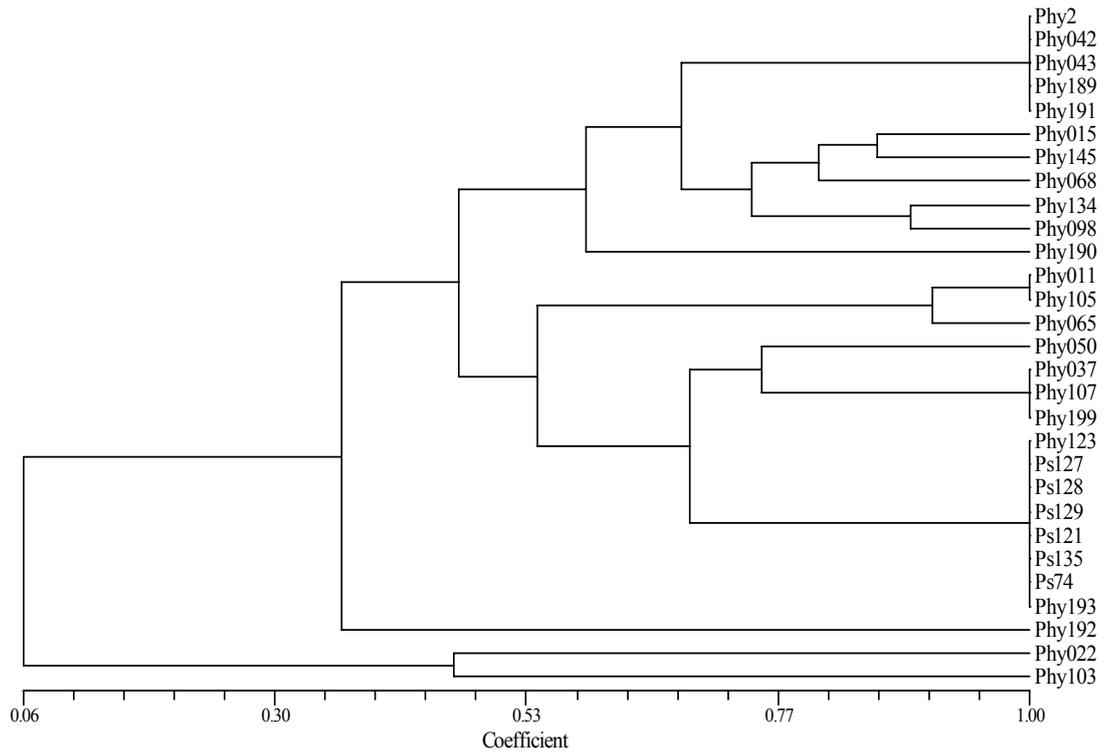


Figura 3.7. Dendrograma de aislados de *P. citrophthora* (en su mayoría provenientes de chancros en ramas de cítricos y aislados de referencia de otros hospedantes), generado en base a RAMS – CGA utilizando UPGMA del programa NTSYS. Los números de los aislados son representativos de aquellos que aparecen en las Tablas 3.1 y 3.2.

c. Diversidad intraespecífica de *P. parasitica*

La utilización del iniciador CGA desarrolló 6 patrones polimórficos diferentes dentro de los aislados de *P. parasitica* (**Figura 3.8, Tabla 3.20**). El patrón 2 (N-2), constituyó el principal grupo de aislados, agrupando al 46,7 % (14/30) de la población (**Tabla 3.21**). El patrón 4 (N-4), fue el segundo patrón con más número de aislados en estudio, agrupando al 30 % (9/30) de los aislados de la población, los otros 4 patrones de banda estuvieron compuestos por sólo uno o dos aislados.

En la **Figura 3.9** se puede observar el agrupamiento de las diferentes especies de *Phytophthora* en base al análisis RAMS - CGA. La mayoría de los aislados de *P. parasitica* formaron un grupo bastante homogéneo, a excepción de los aislados Phy 025 y Phy 094 cuyas características genotípicas difirieron de las típicas para la especie.

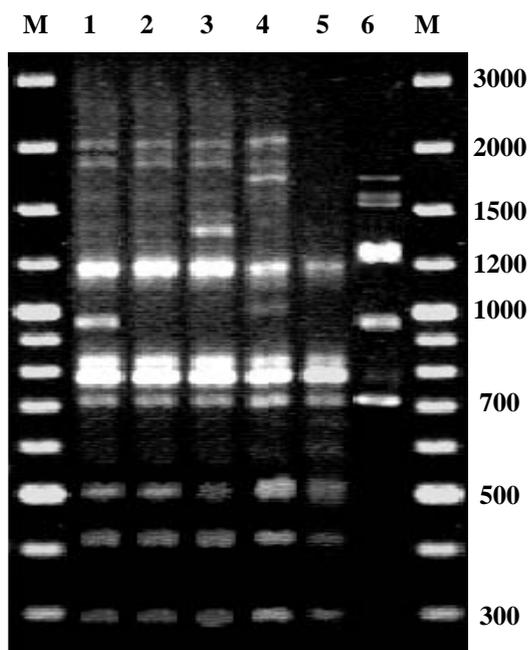


Figura 3.8. Productos de amplificación obtenidos con el iniciador CGA para la especie *P. parasitica* con la técnica RAMS de los aislados representativos de cada patrón: N-1 (Phy 074), N-2 (Phy 021), N-3 (Phy 048), N-4 (Phy 083), N-5 (Phy 173), N-6 (Phy 025) y M (marcador).

Tabla 3.20. Distribución de marcadores RAMS entre 30 aislados españoles de *P. parasitica* de cítricos.

Tamaño de Banda	Patrones CGA					
	N - 1	N - 2	N - 3	N - 4	N - 5	N - 6
2080	-	-	-	+	-	-
2000	+	+	+	-	-	-
1900	+	+	+	-	-	-
1800	-	-	-	+	-	+
1600	-	-	-	-	-	+
1500	-	-	-	-	-	+
1400	-	-	+	-	-	-
1320	-	-	-	-	-	+
1225	+	+	+	+	+	-
1120	-	-	-	-	-	-
1100	+	-	-	-	-	+
850	+	+	+	+	+	-
790	+	+	+	+	+	-
730	+	+	+	+	+	+
510	+	+	+	+	+	-
420	+	+	+	+	+	-
300	+	+	+	+	+	-
Nº aislados	2	14	1	9	2	2

Tabla 3.21. Características genotípicas de aislados de *P. citrophthora* y *P. parasitica* utilizados en este estudio.

Especie	Aislados	Patrón RAMS - CGA
<i>P. citrophthora</i>	Phy 001; Phy 002; Phy 003; Phy 004; Phy 005; Phy 006; Phy 007; Phy 008; Phy 009; Phy 010; Phy 012; Phy 013; Phy 014; Phy 016; Phy 017; Phy 018; Phy 020; Phy 023; Phy 024; Phy 026; Phy 027; Phy 029; Phy 030; Phy 031; Phy 032; Phy 033; Phy 035; Phy 037; Phy 040; Phy 041; Phy 044; Phy 045; Phy 046; Phy 049; Phy 052; Phy 053; Phy 054; Phy 055; Phy 056; Phy 057; Phy 058; Phy 059; Phy 061; Phy 062; Phy 063; Phy 066; Phy 067; Phy 069; Phy 070; Phy 071; Phy 072; Phy 073; Phy 075; Phy 077; Phy 078; Phy 079; Phy 080; Phy 081; Phy 082; Phy 085; Phy 087; Phy 096; Phy 111; Phy 114; Phy 115; Phy 116; Phy 117; Phy 118; Phy 119; Phy 128; Phy 129; Phy 130; Phy 131; Phy 132; Phy 133; Phy 135; Phy 136; Phy 137; Phy 138; Phy 139; Phy 140; Phy 141; Phy 144; Phy 146; Phy 147; Phy 152; Phy 153; Phy 154; Phy 155; Phy 156; Phy 157; Phy 158; Phy 159; Phy 160; Phy 161; Phy 162; Phy 163; Phy 164; Phy 165; Phy 166; Phy 167; Phy 169; Phy 170; Phy 171; Phy 172; Phy 174; Phy 177; Phy 178; Phy 179; Phy 180; Phy 181; Phy 182; Phy 183; Phy 184; Phy 185; Phy 186; Phy 187; Phy 188; Phy 194. Phy 042*; Phy 043*; Phy 104*; Phy 106*; Phy 189*; Phy 191*; Phy 093*;	1
	Phy 015	2
	Phy 068	3
	Phy 145	4
	Phy 190	5
	Phy 134	6
	Phy 098	7
	Phy 050	8
	Phy 011; Phy 028; Phy 051 Phy 105*;	9
	Phy 065	10
	Phy 193 Phy 120*; Phy 121*; Phy 122*; Phy 123*; Phy 124*; Phy 125*; Phy 126*; PS - 127* ; PS - 128*; PS - 74*; PS - 121*; PS - 122*; PS - 129*; PS - 134; PS - 135*.	11
	Phy 037 Phy 107*; Phy 199*; Phy 200*.	12
	Phy 192	13
	Phy 022	14
	Phy 103*;	N.R
<i>P. parasitica</i>	Phy 047; Phy 074.	1
	Phy 019; Phy 021; Phy 036; Phy 038; Phy 039; Phy 076; Phy 101; Phy 127; Phy 142; Phy 143; Phy 149; Phy 150; Phy 151; Phy 168; Phy 092*; Phy 108*; Phy 109*	2
	Phy 048; Phy 090*	3
	Phy 083; Phy 084; Phy 086; Phy 088; Phy 089; Phy 095; Phy 097; Phy 099; Phy 100.	4
	Phy 113; Phy 173	5
	Phy 025; Phy 060;	6
	Phy 094*.	N.R
	Phy 175*; Phy 176*.	N.R

* Aislados de referencia
N.R. Patrón no representado

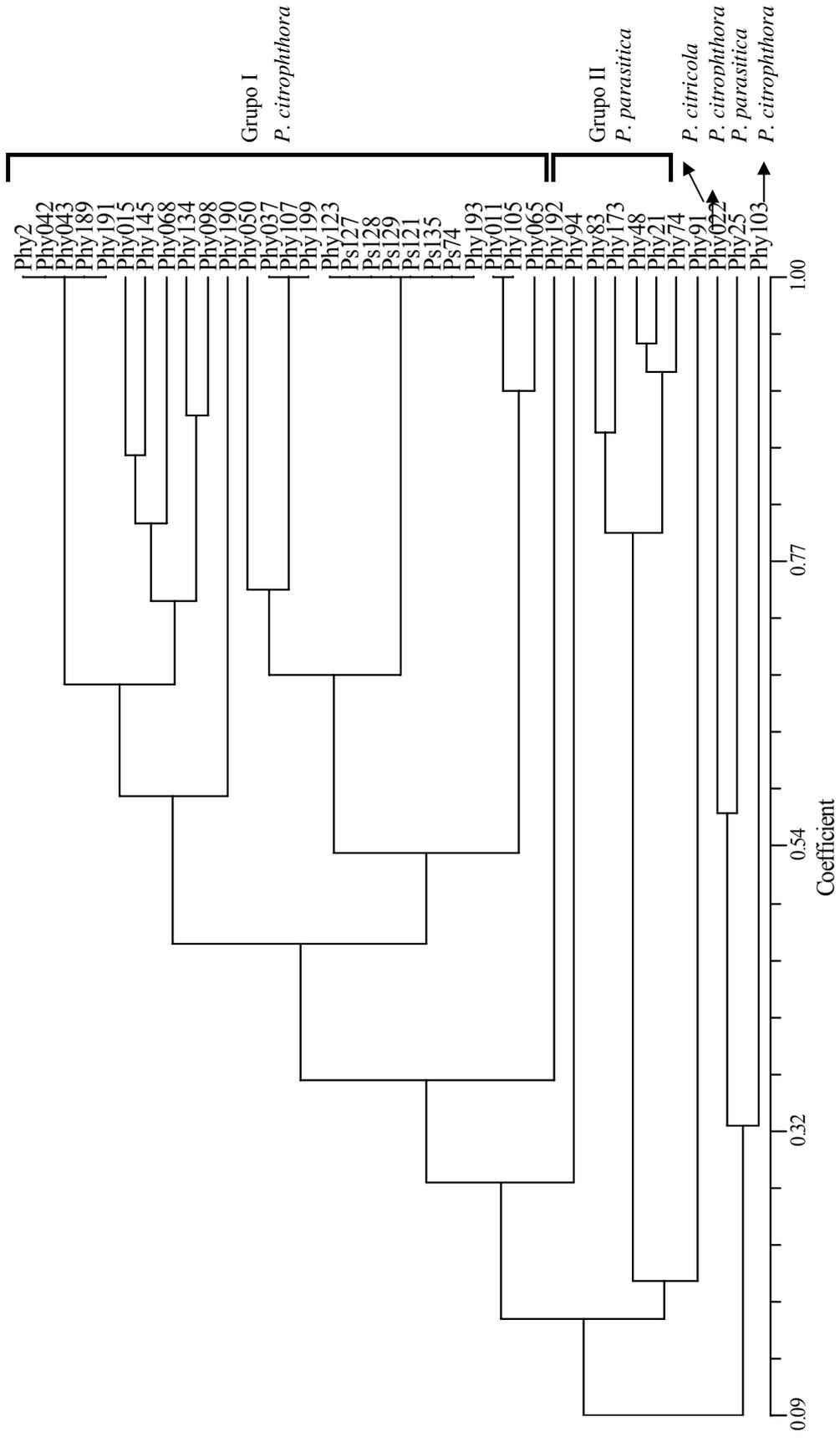


Figura 3.9. Dendrograma de aislados de especies de *Phytophthora* generado en base a RAMS – CGA utilizando UPGMA del programa NTSYS. Los grupos principales se identificaron como I y II y los números de los aislados son representativos de aquellos que aparecen en las Tablas 3.1 y 3.2.

3.3.3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD PATOGENICA DE AISLADOS REPRESENTATIVOS DE LAS POBLACIONES de *P. citrophthora* DE CÍTRICOS

Las áreas de lesión resultantes de las evaluaciones efectuadas en las variedades y patrones de cítricos inoculados con los aislados de *P. citrophthora* se muestran en la **Tabla 10.18 (Anexos)**.

3.3.3.1. Lesiones desarrolladas sobre la variedad

Los resultados de las correlaciones efectuadas entre los factores de estudio y el área de lesión en la zona de la variedad se resumen en la **Tabla 3.22**. Los resultados muestran que los factores relacionados con el hospedante tales como la variedad, el grupo de cítricos y la influencia del patrón sobre la variedad; y los factores relacionados a las parcela y la zona de ubicación de éstas, fueron altamente significativos ($P < 0,05$). Asimismo, se encontró que no hubo correlación ($P > 0,05$), en los factores inherentes al patógeno, tales como agresividad de los aislados y grupo poblacional.

En la **Tabla 3.23** se observa que solamente el cultivar Clemenules obtuvo mayor área de lesión ($6,92 \text{ cm}^2$) que la variedad Hernandina, siendo por tanto los otros cultivares estudiados menos susceptibles que Clemenules a la infección por aislados de *P. citrophthora*. La **Tabla 3.24** muestra el análisis de correlación entre grupos de cítricos: las clementinas e híbridos son sensiblemente más susceptibles a la infección que las naranjas, obteniendo en promedio estas últimas $3,67 \text{ cm}^2$ menos de lesión.

Con respecto a la influencia de los patrones sobre el área de lesión en las variedades, los resultados indican que árboles injertados sobre patrón citrumelo tuvieron mayor área de lesión que aquellos injertados sobre los otros patrones, con $8,44 \text{ cm}^2$ más de lesión que citrange Carrizo (**Tabla 3.25**).

Los resultados obtenidos del efecto de la parcela de ensayo sobre el área de lesión muestran que en la parcela 4, ubicada en Oliva (Hernandina/naranja amargo), se obtuvo las áreas de lesión más grandes del experimento (**Tabla 3.26**). Asimismo, el acumulado de área de lesión de los diferentes municipios del ensayo, mostró que precisamente en las parcelas ubicadas en la zona de Oliva se encontraron las mayores áreas de lesión (**Tabla 3.27**).

En lo referente al factor aislado, los resultados indican que todos tuvieron un comportamiento similar: estadísticamente no hubo diferencias de agresividad entre aislados en ningún cultivar utilizado. Ni la variedad injertada, ni el efecto del patrón sobre la variedad, ni la localización de la parcela de ensayo influyeron sobre la agresividad de algún aislado. Asimismo; no se encontró diferencias significativas de agresividad ni sobre patrones ni sobre variedades entre individuos de los principales grupos poblacionales de *P. citrophthora* (P-1 y P-9) utilizados en este estudio (**Tablas 3.28 y 3.29**).

Tabla 3.22. Análisis de regresión múltiple de la influencia de los factores genéticos del hospedante, del patógeno y de la localización de la parcela sobre el área de lesión en ramas de variedades de cítricos inoculadas con aislados de *P. citrophthora*.

Factores	Análisis de regresión múltiple ^z	
	r ²	Valor de P
Genéticos del hospedante		
Variedad	10,27	0,0000
Grupo de cítricos	4,05	0,0010
Patrones	33,87	0,0000
Localización de la parcela		
Parcela	34,73	0,0000
Zona	14,7	0,0000
Genéticos del patógeno		
Aislado	0,31	0,9759
Grupo poblacional	0,03	0,7790

^z r², proporción de la variación explicada; Valor de P, ANOVA, probabilidad para la ecuación de regresión

Tabla 3.23. Análisis de regresión múltiple de la influencia del cultivar de cítrico inoculado con *P. citrophthora* sobre el área de lesión en la zona de la variedad.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	4,0836	0,0030	Hernandina
Clemenules	6,9171*	0,0001	
Fortune	2,0605	0,3587	
Lane - late	1,4523	0,5291	
Navel - late	0,2066	0,9132	
Valencia - late	-0,18078	0,9170	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.24. Análisis de regresión múltiple de la influencia del grupo de especies de cítricos inoculado con *P. citrophthora* sobre el área de lesión en la zona de la variedad.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	7,96924	0,0000	Clementinas
Naranjas	-3,6651 *	0,0010	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.25. Análisis de regresión múltiple de la influencia del patrón de cítricos inoculado con *P. citrophthora* sobre el área de lesión en la zona de la variedad.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	4,44267	0,0000	Citrange Carrizo
Citrumelo	8,43821 *	0,0000	
Volkameriana	0,20472	0,9003	
Naranjo amargo	0,98765	0,5678	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.26. Análisis de regresión múltiple de la influencia de la parcela de ensayo sobre el área de lesión ocasionada por *P. citrophthora* en la zona de la variedad.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	3,89905	0,0183	Parcela 12
Parcela 1	0,748344 *	0,7420	
Parcela 2	-0,72333	0,7556	
Parcela 3	-0,11339	0,9602	
Parcela 4	18,9818	0,0000	
Parcela 5	1,6369	0,4764	
Parcela 6	2,2451	0,3189	
Parcela 7	0,7232	0,7529	
Parcela 8	0,8618	0,7046	
Parcela 9	1,1380	0,6287	
Parcela 10	0,0215	0,9927	
Parcela 11	-0,6214	0,7892	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.27. Análisis de regresión múltiple de la influencia de la zona de ubicación de las parcelas de estudio sobre el área de lesión ocasionada por *P. citrophthora* en la zona de la variedad.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	5,27956	0,0000	Montserrat
Sueca	-1,33456 *	0,3923	
Oliva	8,25682	0,0000	
Ribaroja	-1,24314	0,3383	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.28. Análisis de regresión múltiple de la influencia del aislado de *P. citrophthora* utilizado sobre el área de lesión en la zona de la variedad.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	5,49936	0,0001	Phy 058
Phy 011	0,616861 *	0,7478	
Phy 016	0,765388	0,6989	
Phy 028	0,200638	0,9162	
Phy 035	0,732543	0,7076	
Phy 051	1,58837	0,4107	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.29. Análisis de regresión múltiple de la influencia del grupo poblacional de aislados de *P. citrophthora* sobre el área de lesión en la zona de la variedad.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	5,97519	0,0000	G - 1
G - 9	0,315843 *	0,7790	

* Valores de área de lesión en relación al referencial.

3.3.3.2. Lesiones desarrolladas sobre el patrón

Los resultados obtenidos de las correlaciones efectuadas entre los factores de estudio y el área de lesión en el patrón se resumen en la **Tabla 3.30**. De los factores relacionados con el hospedante, sólo el grupo de cítricos injertados sobre el patrón fue significativo ($P < 0,05$). Las regresiones efectuadas muestran que el factor parcela resultó significativo; no obstante, la ubicación geográfica de las mismas no lo fue. El estudio de los factores relacionados con el hospedante tales como la agresividad de los aislados y el grupo poblacional no fueron significativos.

La **Tabla 3.31** muestra que árboles injertados con el cultivar Valencia-Late presentaron mayor área de lesión en los patrones. Los demás cultivares de cítricos injertados sobre el patrón no influyeron sobre el área de lesión. Cuando se analizaron en conjunto grupos de cítricos, se encontró que las lesiones en los patrones injertados con naranjas produjeron más área de lesión ($1,59 \text{ cm}^2$ más) que los injertados con clementinas (**Tabla 3.32**).

La **Tabla 3.33** muestra que los distintos patrones inoculados tuvieron un comportamiento similar frente al área de lesión: no se encontró evidencia de que algún patrón fuera más susceptible a la infección que otro.

La **Tabla 3.34** muestra que en la parcela 7 (Clemenules/citrango Carrizo) ubicada en Montserrat (Valencia), fue en donde se encontró los mayores tamaños de lesión sobre patrones. Sin embargo, los promedios de lesión desarrollados en los patrones en las diferentes zonas de ubicación de las parcelas no mostraron diferencias entre sí (**Tabla 3.35**).

Los aislados de *P. citrophthora* utilizados en este estudio no difirieron significativamente en agresividad en las inoculaciones en los diferentes patrones. Tampoco hubo influencia del grupo poblacional de los aislados utilizados en agresividad sobre patrones (**Tablas 3.36 y 3.37**).

Tabla 3.30. Análisis de regresión múltiple de la influencia de los factores genéticos del hospedante, del patógeno y de la localización de la parcela en relación al área de lesión en patrones de cítricos inoculadas con aislados de *P. citrophthora*.

Factores	Análisis de regresión múltiple ^Z	
	r^2	Valor de <i>P</i>
Genéticos del hospedante		
Variedad	11,26	0,1732
Grupo de cítricos	5,96	0,0431
Patrones	2,72	0,4012
Localización		
Parcela	39,11	0,0014
Zona	8,11	0,1362
Genéticos del patógeno		
Aislado	5,16	0,6360
Grupo poblacional	0,92	0,4323

^Z r^2 , proporción de la variación explicada; Valor de *P*, ANOVA, probabilidad para la ecuación de regresión

Tabla 3.31. Análisis de regresión múltiple de la influencia del cultivar de cítrico inoculado con *P. citrophthora* sobre el área de lesión en el patrón.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	2,87667	0,0028	Hernandina
Clemenules	0,11083*	0,9282	
Fortune	-0,28333	0,8603	
Lane - late	1,01167	0,5304	
Navel - late	0,39416	0,7644	
Valencia - late	2,64275	0,0326	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.32. Análisis de regresión múltiple de la influencia del grupo de especies de cítricos inoculados con *P. citrophthora* sobre el área de lesión en el patrón.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	2,87882	0,0000	Clementinas
Naranjas	1,59003*	0,0431	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.33. Análisis de regresión múltiple de la influencia del patrón de cítricos inoculado sobre el área de lesión ocasionada por *P. citrophthora*.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	3,91368	0,0000	Citrange Carrizo
Citrumelo	-0,82535 *	0,5598	
Volkameriana	-1,80035	0,2056	
Naranja amargo	-0,68286	0,3678	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.34. Análisis de regresión múltiple de la influencia de la parcela de ensayo sobre el área de lesión en el patrón ocasionada por *P. citrophthora*.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	4,42833	0,0003	Parcela 12
Parcela 1	-2,31511 *	0,1566	
Parcela 2	-0,65667	0,6854	
Parcela 3	-1,69333	0,2981	
Parcela 4	-1,34000	0,4095	
Parcela 5	-0,54000	0,7390	
Parcela 6	-1,83500	0,2599	
Parcela 7	5,41563	0,0014	
Parcela 8	-1,06333	0,5309	
Parcela 9	-2,44667	0,1347	
Parcela 10	-1,93633	0,2571	
Parcela 11	-0,75633	0,6564	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.35. Análisis de regresión múltiple de la zona de ubicación de las parcelas sobre el área de lesión sobre el patrón ocasionada por *P. citrophthora*.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	2,91167	0,0026	Oliva
Ribaroja	0,23742 *	0,8375	
Sueca	0,03083	0,9813	
Montserrat	2,07791	0,0740	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.36. Análisis de regresión múltiple del efecto del aislado utilizado sobre el área de lesión en el patrón ocasionada por *P. citrophthora*.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	3,38333	0,0008	Phy 058
Phy 011	1,85333 *	0,1758	
Phy 016	-0,34606	0,8034	
Phy 028	-0,17083	0,9000	
Phy 035	0,29939	0,8295	
Phy 051	0,10576	0,9393	

* Valores de área de lesión en relación al referencial

Tabla 3.37. Análisis de regresión múltiple del efecto de la agresividad del grupo poblacional de aislados de *P. citrophthora* sobre el área de lesión en el patrón.

Parámetro	Estimado	Valor de P	Referencial
Constante	3,36824	0,0000	G - 1
G - 9	0,62519 *	0,4323	

* Valores de área de lesión en relación al referencial.

3.4. DISCUSIÓN

3.4.1. ESTUDIO DE LA VARIACIÓN FENOTÍPICA (MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA) DE AISLADOS DE *Phytophthora* DE CÍTRICOS

Caracterización morfológica.

Las características asexuales y sexuales de los aislados de *Phytophthora* mostraron una gran variabilidad. El estudio de sus características morfológicas asexuales como forma, tamaño y longitud de esporangios han sido utilizadas como criterios taxonómicos para la diferenciación de las distintas especies de *Phytophthora* (Stamps *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996). Sin embargo, estas características pueden ser inestables y son conocidas por cambiar significativamente con las condiciones culturales, ya que el tamaño de las estructuras asexuales es altamente variable en función de la edad del cultivo y de la composición del medio de crecimiento (Erwin, 1983).

P. citrophthora

Las últimas versiones de claves taxonómicas para *Phytophthora* (Stamps *et al.*, 1990; Erwin y Ribeiro, 1996) contemplan un ratio longitud-anchura de menos de 1,6:1 asignado para *P. citrophthora*; sin embargo, otros investigadores han citado ratios de 1,6:1 ó más (Kellam y Zentmyer, 1986). Nuestros resultados muestran una notable variabilidad en cuanto a forma, tamaño y longitud de los esporangios, hecho que concuerda con los resultados obtenidos por estos últimos autores. Desafortunadamente, esta especie se identifica todavía con dificultad, con pocos caracteres morfológicos distintivos y algunas cualidades adscritas que no están en la descripción original de la especie (Godwin y Coffey, 1994). Los esporangios de *P. citrophthora* han sido descritos como caducos (Holliday, 1980; Stamps *et al.*, 1980) y como no caducos (Kellam y Zentmyer, 1986; Erwin y Ribeiro, 1996). Todos los aislados de *P. citrophthora* usados en nuestro estudio provenientes de diversas zonas citrícolas poseen esporangios no caducos, corroborando las afirmaciones del segundo grupo de autores.

En la descripción inicial de la especie (Smith y Smith, 1906), las clamidosporas no fueron citadas como un carácter de la especie. Sin embargo, Tucker (1931) observó la formación de clamidosporas en cultivos viejos de esta especie y Kellam y Zentmyer (1986) las citaron en aislados de *P. citrophthora* de cacao en Brasil. En el presente estudio se ha observado una notable variabilidad en la formación de clamidosporas en función de los aislados; más de la mitad de las cepas en estudio formaron estas estructuras.

La sexualidad de *P. citrophthora* tampoco se citó en la descripción original de Smith y Smith (1906) y hasta la fecha, es una característica de esta especie que no está bien definida. Algunos autores la han caracterizado como estéril (Stamps *et al.*, 1990) mientras que otros la han descrito como heterotálica con anteridios anfígenos (Ribeiro, 1978; Liyanage y Wheeler, 1989).

Cohen *et al.*, (2003) indicaron que el 72 % de los aislados de *P. citrophthora* de las zonas cítricas de Córcega no formaron estructuras sexuales, siendo por tanto estériles, mientras que el porcentaje restante (28 %) presentó gametos sexuales. En nuestro estudio, el cruzamiento con los grupos de apareamiento de referencia mostraron que sólo uno de los aislados de la colección (Phy 037) formó estructuras sexuales. Este resultado descarta la hipótesis de la aparición de nuevos genotipos de *P. citrophthora* surgidos mediante reproducción sexual y asociados al síndrome de chancros en rama de cítricos debido al bajo porcentaje de aislados heterotálicos obtenidos.

P. parasítica

Según Waterhouse (1974), el ratio medio L:A de los esporangios de *P. parasítica* es de 1,2:1 – 1,4:1. Ho y Jong (1989) señalaron que el ratio medio de esta especie era de 1,4:1. En el presente trabajo se obtuvo ratios de crecimiento comprendidos entre 1,2:1 a 1,6:1. Dada la variabilidad existente para este carácter, el ratio L:A no se considera un criterio útil para la identificación de la especie (Hall, 1993). Los esporangios de esta especie se han descrito como prominentemente papilados (Erwin y Ribeiro, 1996); en nuestro estudio se encontraron tanto esporangios papilados como semipapilados, encontrando una notable variabilidad en este carácter.

La formación de clamidosporas por *P. parasítica* es abundante (Erwin y Ribeiro, 1996); sin embargo, Hall (1993) cita que solamente el 50 % de los aislados de su estudio las formaron. En nuestro estudio, el 84 % de los aislados de *P. parasítica* formaron clamidosporas, que variaron entre 16,7 - 43,0 μm de diámetro, siendo la media 32,6 μm . Hall (1993) señala que la media es de 33 μm de diámetro, mientras que Erwin y Ribeiro (1996) sostienen que las dimensiones de las clamidosporas están comprendida entre 13 - 60 μm . En la descripción original de Dastur (1913), el diámetro de las clamidosporas estaba entre 20 - 60 μm (Erwin y Ribeiro, 1996).

Los aislados de *P. parasítica* han sido descritos como heterotálicos (Erwin y Ribeiro, 1996) y como homotálicos (Tsao *et al.*, 1980). En nuestro estudio, la mayoría de los aislados formaron estructuras sexuales; sin embargo, un pequeño porcentaje de los mismos no presentó gametos sexuales al aparearlos con los grupos de apareamiento correspondientes. En los aislados que formaron oosporas, éstas fueron esféricas, appleróticas y anfígenas, siendo el diámetro medio de 25,6 μm . Estos resultados concuerdan con las citas de Erwin y Ribeiro (1996), quienes señalan que *P. parasítica* presenta oosporas anfígenas, appleróticas, entre esféricas y ovadas, con un diámetro comprendido entre 15 y 64 μm . Hall (1993) sitúa el diámetro de las oosporas en $26 \pm 3,1 \mu\text{m}$. La descripción original de Dastur indica que éstas oscilan entre 13 y 35 μm (Erwin y Ribeiro, 1996).

Caracterización fisiológica de los aislados

La temperatura óptima de crecimiento observada para *P. citrophthora* fluctuó entre 22,1 y 28,9 °C, con una temperatura máxima compatible con el crecimiento comprendida entre 32 y 33 °C. Estos resultados concuerdan en parte con la descripción de las características fisiológicas de la especie por Erwin y Ribeiro (1996), quienes indican temperaturas óptimas entre 24 y 28 °C. Algunos aislados de nuestro estudio presentaron temperaturas óptimas menores a las citadas por estos autores, pero concuerdan con la temperatura máxima de crecimiento citada para la especie, comprendida entre 32 ± 1 °C.

P. parasitica presentó temperaturas óptimas de crecimiento entre 25,0 y 31,6 °C, lo cual es acorde con la descripción de Erwin y Ribeiro (1996), quienes estiman la temperatura óptima de *P. parasitica* entre 27 y 32 °C. Asimismo, todos los aislados crecieron a 35 °C, temperatura a la cual no crecieron los aislados de *P. citrophthora*. Este carácter es un criterio útil con fines de diferenciación entre especies de *Phytophthora* de cítricos.

La morfología de la colonia o patrón de crecimiento de los aislados fue un carácter inestable y afectado por la temperatura a la cual se sometieron los aislados, habiendo una amplia variación en los patrones de crecimiento en función de las temperaturas ensayadas. Sin embargo, fue alrededor de la temperatura óptima para cada especie en donde se expresó con mejor claridad y consistencia las diferencias de patrón de crecimiento entre aislados.

La mayor variabilidad de este carácter para aislados de *P. citrophthora* se observó a 32 °C, indicando que las altas temperaturas pueden modificar la expresión fenotípica del patógeno. A 24 °C el 90 % de los aislados de esta especie presentaron el patrón petaloide o semi petaloide. Este patrón de crecimiento ha sido citado por Erwin y Ribeiro (1996) como el patrón característico de *P. citrophthora*. Sin embargo, en un 10 % de los aislados se encontraron otros tipos de patrones de crecimiento tales como: semipetaloide, estelado, radiado y sin patrón de crecimiento, indicando la existencia de variabilidad fenotípica en la población.

Los aislados de *P. parasitica* presentaron una amplia variabilidad de patrones de crecimiento, siendo este carácter más estable a su temperatura óptima (28 °C). A esta temperatura un alto % de aislados mostraron aspectos de colonias sin patrón de crecimiento, seguido cercanamente por el patrón estolonífero y un pequeño % por estelado. Esta característica difiere de estudios previos (Erwin y Ribeiro, 1996) que indican que sobre medio PDA el patrón de crecimiento de *P. parasitica* es principalmente estolonífero.

La inestabilidad en cuanto a morfología de la colonia de *P. citrophthora* y *P. parasitica* no ha sido citada hasta el momento. En estudios en *P. cinnamomi* sobre morfología de la colonia a diferentes temperaturas, Zentmyer *et al.* (1976) y Hüberli *et al.* (2001) indican que éste no es un carácter estable y debería ser usado con cautela cuando es utilizado con fines de identificación, pues el patrón de crecimiento del aislado es influenciado por la composición del medio de agar.

En nuestro estudio, la utilización del medio de cultivo PDA fue útil para identificar especies de *Phytophthora*, pues sobre este medio *P. citrophthora* y *P. parasitica* mostraron caracteres inherentes a cada especie como velocidad de crecimiento y patrón de colonia. Además, siendo éste medio de composición estándar, la variabilidad en su composición es mínima, permitiéndonos diferenciar variaciones fenotípicas entre aislados de una misma especie y que éste carácter fuese reproducible. Este criterio puede ser útil para la diferenciación entre las especies de *Phytophthora* en cítricos, siempre y cuando las temperaturas estén comprendidas entre las óptimas para ambas especies.

El análisis multivariante mostró una notable variabilidad tanto interespecífica como intraespecífica de los aislados de *Phytophthora* estudiados. El análisis mostró que los aislados que crecieron a 35 °C, presentaron temperaturas óptimas de crecimiento elevadas, patrones de crecimiento mayoritariamente sin patrón o estoloníferos, con formación frecuentemente de estructuras sexuales y de clamidosporas y presentando en su mayoría esporangios papilados, se correspondieron con *P. parasitica*. Éste análisis también mostró que un segundo grupo de aislados que se caracterizó por no formar estructuras sexuales, no crecer a 35 °C, presentar temperaturas óptimas alrededor de 24 °C con colonias de aspecto petaloide, que formaron clamidosporas en menor proporción que el grupo anterior y cuyos aislados presentaron en mayor proporción esporangios semi-papilados, estuvo conformado por la especie *P. citrophthora*.

La interpretación intraespecífica de los resultados indicó que los aislados de *P. citrophthora* con ratios L:A más altos presentaban clamidosporas y aquéllos con menor ratio L:A las produjeron en menor proporción. Se desconoce la ventaja biológica que esta característica podría conferir, pero podría estar estrechamente ligada a la epidemiología del patógeno. Algunos aislados mostraron a su vez una amplia diversidad de sus temperaturas óptimas, donde algunos aislados se asemejaron más a las óptimas para la especie *P. parasitica* que domina en épocas de más calor. Esta característica podría conferirles cierto tipo de ventaja patogénica en épocas del año donde las temperaturas están fuera del óptimo para *P. citrophthora* que es alrededor de 24 °C.

3.4.2. ESTUDIO DE LA VARIACIÓN GENOTÍPICA DE AISLADOS DE *Phytophthora* DE CÍTRICOS.

Respuesta de aislados de *P. citrophthora* al metalaxil y al mefenoxam.

Éste es el primer estudio realizado en España para establecer el grado de sensibilidad de la población española de *P. citrophthora* frente a los fungicidas metalaxil y mefenoxam. De un total de 74 aislados de *P. citrophthora* colectados de diferentes zonas productoras de cítricos del este y sur de la península, 4 resultaron resistentes y 18 con resistencia intermedia al metalaxil. Con respecto al mefenoxam, 1 aislado se consideró como resistente y 14 con resistencia intermedia.

En España, estudios previos para establecer la sensibilidad de fungicidas acilalaninas sobre especies de *Phytophthora* se han realizado únicamente sobre *P. capsici* (Silvar *et al.*, 2006). De un estudio de 16 aislados, estos autores concluyen que la población de *P. capsici* del norte de España era altamente sensible al metalaxil: sólo un aislado resultó resistente y otro moderadamente resistente a este fungicida.

En estudios realizados con *P. infestans*, Cohen y Reuveni (1983) y Davidse (1995) indicaron que los aislados resistentes al metalaxil tienen una mayor adaptabilidad a las condiciones medioambientales que los aislados sensibles. Sin embargo, otros estudios tanto en *P. infestans* como en *P. capsici* sugieren que no existe correlación entre adaptabilidad y resistencia al metalaxil, y que la resistencia a este fungicida sólo influye en la presión de selección (Lee *et al.*, 1991; Gisi y Cohen, 1996; Lamour y Hausbeck, 2001). *P. infestans* es la especie más ampliamente estudiada en el tema de presión de selección y su respuesta al metalaxil. A comienzos de 1991, aislados resistentes a este fungicida (Deahl *et al.*, 1993) comenzaron a reemplazar a aislados sensibles que eran los predominantes en la región del este de Washington y el sur de la Columbia británica desde 1947 (Miller *et al.*, 1997).

Este hecho evidencia que la resistencia y/o tolerancia al metalaxil por parte de especies de *Phytophthora* es un factor importante en la selección de individuos de una población. Lamentablemente, no podemos contrastar que este fenómeno haya sucedido en las zonas citrícolas españolas debido a que no contamos con aislados de referencia de *P. citrophthora* previos a la introducción del uso del metalaxil en España. Como ha sucedido con *P. infestans*, aislados más agresivos con tolerancia y/o resistencia al metalaxil pudieron haber reemplazado a cepas sensibles menos agresivas sobre la zona de la variedad que sobre patrones.

El metalaxil actúa inhibiendo la síntesis del ARN ribosómico (Fisher y Hayes, 1984; Davidse, 1995). La RNA polimerasa es el lugar de acción del metalaxil y una alteración de esta enzima puede conducir a resistencias en algunos oomicetos (Davidse *et al.*, 1983). Estudios genéticos realizados en *P. infestans* y *P. sojae* indicaron que la resistencia está ligada a un solo gen dominante, con variaciones en resistencia contabilizadas por la influencia de genes menores (Lee *et al.*, 1999).

En los últimos años se han realizado estudios con marcadores de DNA ligados a los loci en aislados de *P. infestans* con resistencia al metalaxil (Judelson y Roberts, 1999). Estos estudios indican que los loci que confirieron resistencia al metalaxil en aislados de *P. infestans* procedentes de México y Holanda fueron diferentes de los aislados británicos, indicando que la resistencia al metalaxil se pudo haber desarrollado independientemente en aislados de esta especie en diferentes áreas del mundo.

Nuestro estudio representa la primera evidencia de sensibilidad intermedia y resistencia de aislados de *P. citrophthora* de cítricos al mfenoxam. Existen pocas citas previas de especies de *Phytophthora* con resistencia a este fungicida (Parra y Ristaino, 1998, 2001; Lamour y Hausbeck,

2000). En general, los porcentajes de inhibición de crecimiento y los valores medios de la CE_{50} de los aislados, fueron más altos para metalaxil que para mefenoxam. Este hecho ha sido observado previamente en estudios de resistencia de aislados de *P. capsici* frente al metalaxil y mefenoxam (Parra y Ristaino, 2001). Este hecho se debe a que el metalaxil ha sido utilizado con bastante más frecuencia en el tiempo previo a la entrada del mefenoxam, lo cual explicaría el hecho de que los valores de la CE_{50} sean más altos.

En España, no hay antecedentes de la utilización del mefenoxam previo a su entrada legal en 2004 en reemplazo del metalaxil. Sin embargo, los aislados encontrados con sensibilidad intermedia y resistencia y los altos valores de la CE_{50} para el mefenoxam, evidencian la existencia de resistencia cruzada con el metalaxil antes inclusive de su entrada. Aunque el mefenoxam es aplicado a dosis más bajas en campo que el metalaxil para evitar la aparición de cepas resistentes, contiene el enantiómero más activo de su antecesor. Parra y Ristaino (2001) indican que la tasa de desarrollo de resistencia en poblaciones del patógeno puede variar para los dos fungicidas. Los resultados de nuestro estudio indican que esta tasa es mayor para los aislados de *P. citrophthora* frente al metalaxil que con el mefenoxam.

La alta variabilidad observada en los valores de la CE_{50} de los aislados de este estudio fue inesperada considerando que casi la totalidad de la población española de *P. citrophthora* fue estéril. Lamour y Hausbeck (2000) en estudios sobre *P. capsici* afirman que la sensibilidad al mefenoxam es controlada por un solo gen con dominancia parcial que no está ligado al grupo de apareamiento. Esto indica que la reproducción sexual no es indispensable para que surjan o se generen genotipos con resistencia a fungicidas acilalaninas. Por tanto, la resistencia o tolerancia a estos fungicidas puede adquirirse en poblaciones predominantemente asexuales como es el caso de la población española de *P. citrophthora*. Este hecho ha sido citado anteriormente en poblaciones clonales de *P. infestans* en donde la selección de individuos tolerantes o resistentes al metalaxil se debe a la variación asexual (Abu-El Samen *et al.*, 2003). Se necesita más trabajo para examinar los mecanismos genéticos de la resistencia al mefenoxam en aislados de *P. citrophthora* de cítricos, para establecer si existen loci diferentes a los citados en otras especies de *Phytophthora* que confieran resistencia en poblaciones de *P. citrophthora*.

El origen geográfico de los aislados y su relación con la insensibilidad al metalaxil y mefenoxam mostraron que cepas provenientes de algunos municipios de las provincias de Castellón, Huelva y Valencia presentaron valores intermedios de insensibilidad y resistencia a estos fungicidas. Sin embargo, de estas mismas zonas se han aislado a su vez cepas sensibles. La insensibilidad de cepas en algunas parcelas de estas zonas probablemente se deba a aplicaciones frecuentes de metalaxil para el control de las diversas enfermedades ocasionadas por *Phytophthora*, seleccionando cepas tolerantes y/o resistentes al fungicida. Otra posibilidad es que estas cepas insensibles hayan sido llevadas a campo a través del material vegetal a partir de los viveros. Se

pudo constatar que los aislados que resultaron con sensibilidad intermedia al metalaxil, lo fueron también con el mefenoxam pero no al revés.

Respuesta de aislados de *P. parasitica* al metalaxil y al mefenoxam.

Los aislados de *P. parasitica* estudiados son sensibles a la acción de ambos fungicidas. No existen antecedentes del estudio de la sensibilidad al metalaxil por *P. parasitica* en España y a nivel mundial los antecedentes de resistencia en esta especie son escasos. Timmer *et al.*, (1998) encontraron que del 31 al 59% de los aislados de *P. parasitica* de cítricos en Florida fue resistente al metalaxil. Estos autores indicaron que aislados resistentes al metalaxil pueden competir bien con aislados sensibles y pueden persistir por largos periodos aún después de que el uso del metalaxil haya sido interrumpido. El metalaxil es efectivo en el control de enfermedades ocasionadas por oomicetos hasta cuando la proporción de aislados resistentes es baja, pero su uso debería evitarse en zonas o lugares concretos en donde el porcentaje de aislados resistentes sea alto.

Coffey y Bower (1984) compararon la respuesta *in vitro* de *P. citrophthora* y *P. parasitica* aisladas de cítricos frente al metalaxil. Este estudio mostró que la especie *P. parasitica* fue altamente sensible y *P. citrophthora* altamente resistente a metalaxil en concentraciones de 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$; sin embargo, tales diferencias no fueron tan evidentes a 1,0 $\mu\text{g/ml}^{-1}$. Estos autores contemplaron la posibilidad de hacer una diferenciación entre ambas especies por la diferencia en la sensibilidad al metalaxil. Este resultado se asemeja al panorama observado en la población española de *Phytophthora* en cítricos, en donde se ha constatado un mayor grado de resistencia al metalaxil por aislados de *P. citrophthora* que aquellos pertenecientes a *P. parasitica*.

Análisis molecular de los aislados de *Phytophthora*

P. citrophthora

El análisis molecular de la población de *P. citrophthora* en España mostró que está compuesta por un grupo mayoritario (P-1) y otros 13 grupos poblacionales muy minoritarios, todos ellos con un único aislado excepto el patrón 9 que incluía 3. La mayoría de aislados que presentaron estos patrones se aislaron de infecciones en ramas, no encontrándose, por tanto, correlación entre patrones genéticos y una zona en concreto de aislamiento sobre el árbol. Asimismo, no se encontró una relación entre las frecuencias de grupos poblacionales y la zona geográfica de origen.

Estudios previos relacionados con la estructura genética de *P. citrophthora* en cítricos se realizaron en Córcega utilizando marcadores RAMS (Cohen *et al.*, 2003), comprobando la existencia de 4 sub-poblaciones (G-1, G-2, G-3 y G-4) dentro de la especie. Los resultados de

nuestro estudio indican que la estructura genética de los aislados españoles de *P. citrophthora* es más amplia y compleja que la de Córcega. Esto podría deberse a que los aislados estudiados son de lugares más diversos y geográficamente más distantes dentro de la península, abarcando un área mucho más extensa que la isla de Córcega. La mayor diversidad genotípica puede deberse también a que, al no haber fronteras geográficas, el movimiento de material vegetal y, por ende, el transporte de propágulos de una zona a otra es mayor, dando cabida a la introducción de nuevo material genético del patógeno a una zona determinada a partir de otras zonas cítricas.

Nuestro estudio muestra que la población española de *P. citrophthora* presentó un alto grado de variabilidad a pesar de que su reproducción es básicamente asexual, con un grupo principal (P-1) que abarcó alrededor del 90% de la población. Algunos de los aislados de referencia de *P. citrophthora* estudiados están incluidos en este grupo mayoritario P-1. Este resultado concuerda con el estudio de la variabilidad poblacional de *P. citrophthora* en Córcega, donde el grupo mayoritario, el G1, correspondiente a nuestro patrón 1 (P-1), conformó el principal grupo poblacional con alrededor del 80% de los aislados estudiados (Cohen *et al.*, 2003; Vernière *et al.*, 2004).

No se pudo correlacionar ningún carácter morfológico de los aislados estudiados con un patrón genético predeterminado obtenido mediante RAMS. Dentro de los estudios fisiológicos tampoco pudo relacionarse las temperaturas óptimas de los aislados con alguno de los grupos poblacionales encontrados. Sin embargo, el patrón de crecimiento de la colonia registrado a 24 °C fue el carácter más estable para establecer una relación entre patrón de crecimiento y grupo poblacional. Este resultado evidencia que existe una correlación entre un cambio genético y la manifestación fenotípica que se hace evidente a través del patrón de crecimiento de la colonia. Este resultado es consistente con los obtenidos previamente en estudios con linajes asexuales de *Phytophthora* en otros patosistemas (Dobrowolsky *et al.*, 2003).

Con *P. parasitica* no se encontró una correspondencia entre patrón de crecimiento y grupo genético, lo cual ha sido observado en estudios similares con especies de *Phytophthora*. Hüberli *et al.* (2001) encontraron una alta inestabilidad en la morfología de las colonias de aislados de *P. cinnamomi*, aún en individuos pertenecientes al mismo linaje clonal.

Dentro de la gama de grupos poblacionales obtenidos, existen aislados como, por ejemplo, Phy 022 y Phy 103 que, aunque comparten cualidades inherentes a *P. citrophthora* y pueden ser por tanto catalogados como tal, genéticamente muestran diferencias notables con respecto al resto de aislados de esta especie. Es posible que estos aislados pudieran ser resultado de hibridaciones inter-específicas con otras especies de *Phytophthora* presentes o asociadas a los cítricos. Los resultados de este estudio indican también que no existe un patrón genético definido que tenga correlación con los aislados que presentaron sensibilidad intermedia o resistencia al metalaxil o mefenoxam. La mayoría de estos aislados pertenecen al grupo genético principal de la población (P-1), donde también se encontraron aislados sensibles.

La variación genética encontrada en *P. citrophthora* en este estudio es un tema complejo y poco entendido. Por un lado se observa un gran grupo dentro de la especie que indicaría que la población se ha mantenido estable a través del tiempo; y por otro lado, el amplio número de grupos poblacionales fuera de este gran grupo indicaría procesos que han dado lugar a la variabilidad genética. Esta información es muy importante pues tiene implicancias directas para el desarrollo de estrategias de control de la enfermedad, en particular, aquellas que involucran el mejoramiento genético para la resistencia del hospedante.

La variación genética dentro y entre poblaciones de campo de especies fúngicas carentes de sexualidad como *P. citrophthora* puede ocurrir a través de una mezcla de procesos de mutación, migración y recombinación (Forgan *et al.*, 2007). Dentro de este fenómeno, la mutación crea la variabilidad genética y otros procesos tales como hibridación, transferencia horizontal de genes, flujo de genes (migración) o recombinación, redistribuyen ésta variabilidad.

Una hipótesis que podría ser aplicable a la variabilidad encontrada en *P. citrophthora* en las zonas cítricas del país, implicaría procesos de presión selectiva como consecuencia de la modificación de algunos factores ligados al actual manejo de los cítricos en el país o una alteración en las condiciones medioambientales. Estos cambios involucrarían el reemplazo del naranjo amargo por citrange Carrizo (Agustí, 2000, Cambra *et al.* 2000), la introducción de nuevos cultivares de cítricos, el uso de sistemas de irrigación más eficientes, o un cambio en los regímenes de lluvia en las áreas de este cultivo en los últimos años. Estas variaciones, o la interacción de algunas de ellas podrían haber producido algún cambio genético en *P. citrophthora* haciéndolo más adaptable a las nuevas condiciones y seleccionando variantes más agresivas a los cultivares y nuevas vías para su diseminación.

En la incapacidad de formar estructuras sexuales, la recombinación asexual podría contribuir a generar nuevas especificidades de virulencia bien por mutación de un solo gen fúngico implicado en el reconocimiento gen a gen, o bien por la creación de nuevas combinaciones a partir de las especificidades de virulencia existentes (Forgan *et al.*, 2007). La variación genética por estos procesos podría explicar alguna variación fenotípica surgida dentro de linajes clonales de hongos diploides como *P. citrophthora*, hecho que ha sido corroborado en otras especies de *Phytophthora* (Hüberli *et al.*, 2001; Dobrowolski *et al.*, 2003).

La variación genética en muchos hongos depende también del ciclo parasexual de recombinación somática, el cual es una alternativa a la recombinación sexual. Los eventos que ocurren durante un ciclo parasexual pueden incluir la pérdida de elementos cromosómicos, o la pérdida de cromosomas enteros durante la mitosis que sigue a la cariogamia (Forgan *et al.*, 2007). Evidencia de la existencia de un ciclo parasexual en oomicetos ha sido documentada para el caso de *P. parasitica* (Yu-Huang y Ko, 1998).

P. parasitica

La población española de *P. parasitica* en cítricos está compuesta por 6 grupos poblacionales diferentes, en donde N-2 y N-4 fueron los más numerosos. Todos los aislados de esta especie estuvieron asociados a lesiones en tronco y/o raíces. A pesar de haber estudiado las características de un número relativamente bajo de aislados de esta especie, se ha constatado su gran diversidad genotípica. Esto se debe a que *P. parasitica* es una especie heterotálica en donde la reproducción sexual forma parte de su ciclo de vida y da lugar a individuos genéticamente diversos.

El aislado Phy 025 comparte cualidades típicas de *P. parasitica* y puede ser catalogada como tal; sin embargo, difiere genéticamente del resto de aislados estudiados de la especie. Al igual que los posibles híbridos encontrados en *P. citrophthora*, es posible que este aislado pueda ser resultado igualmente de una hibridación inter-específica. Sin embargo, más estudios y la utilización de técnicas moleculares más adecuadas son necesarios para constatar o rechazar esta hipótesis.

El conocimiento de la estructura genética de esta especie es necesario para fines de mejora vegetal, principalmente para la obtención de nuevos patrones con resistencia a este patógeno. Se requieren más investigaciones para comprobar si las características genéticas de los diferentes subgrupos de la población se corresponden con cualidades patogénicas.

3.4.3. ESTUDIO DE LA VARIACIÓN PATOGENICA DE AISLADOS REPRESENTATIVOS DE LAS POBLACIONES de *P. citrophthora* DE CÍTRICOS.

El trabajo publicado por Vernière *et al.* (2004) muestra la existencia de un sub-grupo poblacional dentro de *P. citrophthora* al cual denominaron G-2, compuesta por individuos heterotálicos del grupo de apareamiento A2, que son más agresivos sobre la zona de la variedad que sobre patrones, a diferencia de la típica población de aislados estériles de *P. citrophthora*.

En nuestro estudio sólo se encontró un aislado similar al denominado G-2 que se caracteriza por ser heterotálico, del grupo de apareamiento A2. Sin embargo, a diferencia del estudio conducido en Córcega, este patrón es representado solamente por un aislado. En nuestro estudio, las pruebas de patogenicidad se hicieron con representantes de los dos sub-grupos poblacionales mayoritarios, el P-1 y el P-9, correspondientes al G-1 y al G-3 del estudio conducido en Córcega. Nuestros resultados mostraron que no existen diferencias de agresividad entre aislados de ambos grupos genotípicos tanto sobre variedades como sobre patrones, descartando la hipótesis de que esta diferencia genética involucre mayor agresividad o patogenicidad selectiva sobre patrones o variedades. Este estudio confirma a su vez que las clementinas y sus híbridos son más afectadas que otros cultivares de cítricos como por ejemplo, las naranjas, independientemente del patrón en que estén injertadas.

Apartado II
Epidemiología

Capítulo 4

Desarrollo estacional de lesiones e influencia de factores ambientales y del hospedante en la susceptibilidad de cultivares de cítricos a infecciones por especies de *Phytophthora*

CAPÍTULO 4: DESARROLLO ESTACIONAL DE LESIONES E INFLUENCIA DE FACTORES MEDIOAMBIENTALES Y DEL HOSPEDANTE EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE CULTIVARES DE CITRICOS A INFECCIONES POR ESPECIES DE *Phytophthora*

4.1. INTRODUCCIÓN

La aparición del síndrome de chancros en ramas de cítricos ocasionado por *P. citrophthora* en España, plantea una re-evaluación de todos los aspectos conocidos de las condiciones bajo las cuales se desenvuelve esta especie en las zonas citrícolas del país.

Cambios estacionales en la susceptibilidad de los cítricos frente a especies de *Phytophthora* se han citado anteriormente (Matheron y Matejka, 1989; 1992; 1993; Dirac *et al.*, 2003). Sin embargo, estos trabajos se condujeron para establecer períodos críticos en la susceptibilidad del hospedante a infecciones con origen en el suelo asociadas a *Phytophthora* tales como la pudrición del cuello o de la raíz. Por tanto, las conclusiones obtenidas de estos estudios no pueden ser extrapolables a las infecciones en ramas, como es el presente caso.

Los cambios estacionales en la susceptibilidad de especies vegetales han sido relacionados frecuentemente a los factores climáticos tales como la temperatura y parámetros relacionados con el agua, enfatizando la importancia de las condiciones medioambientales para la infección y colonización (Matheron y Mircetich, 1985; Robin *et al.*, 1994). El conocimiento de dos aspectos importantes de la patogénesis tales como el período o los períodos de máxima susceptibilidad del hospedante y las condiciones medioambientales óptimas para el desarrollo del patógeno, son esenciales para el diseño de estrategias de control apropiadas para el manejo de enfermedades, fundamentalmente cuando es necesario el uso de fungicidas (Matheron y Matejka, 1989; 1993; Dirac *et al.*, 2003).

El control químico juega un rol importante en el manejo de enfermedades; por ello, es necesario un estudio que plantee responder a aspectos esenciales para hacer más eficiente su empleo, tales como las épocas de mayor actividad del patógeno y los factores medioambientales y asociados al hospedante que intervienen. Por tal motivo, es esencial que las estrategias de lucha contra esta enfermedad sean mejoradas desde el punto de vista del momento o momentos óptimos de aplicación de fungicidas, conociendo algunos aspectos biológicos y epidemiológicos del patógeno y de los períodos críticos de susceptibilidad de los árboles frente a la infección.

En muchas regiones del mundo donde se cultivan cítricos, incluyendo las españolas, las pudriciones radicales y del cuello del árbol son los lugares de infección y colonización por especies de *Phytophthora* más importantes y más ampliamente investigadas. Se desconoce si los

modelos estacionales de susceptibilidad de ramas de árboles a especies de *Phytophthora* reflejan verdaderamente cambios estacionales en relación a las enfermedades ocasionadas por este patógeno a nivel de raíces y del cuello de la planta.

En España no existen antecedentes de estudios sobre las fluctuaciones estacionales de la susceptibilidad de cítricos a especies de *Phytophthora*. En tal sentido, en el presente apartado se pretende (i), estudiar los cambios estacionales en la susceptibilidad de los cítricos a *P. citrophthora* y *P. parasitica* (la segunda especie de mayor importancia) mediante inoculaciones sucesivas en ramas en campo y en varetas cortadas en laboratorio. Se investigará la relación entre la susceptibilidad temporal de varetas *in vitro* con la severidad de las infecciones en ramas inoculadas en campo. (ii), conocer la influencia en la severidad de la enfermedad de diversos factores medioambientales y del hospedante.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Localización del experimento

Se escogieron tres parcelas de cítricos de una finca del término municipal de Monserrat, en la provincia de Valencia, ubicadas alrededor de las coordenadas 39° 21' 45'' norte y 0° 32' 20'' oeste. La primera parcela era de mandarina clementina cultivar Hernandina con árboles de 12 años de edad al inicio del experimento, la segunda parcela era de mandarina de la cultivar Fortune de 16 años de edad, y la tercera era de naranjo dulce cultivar Lane - Late de 9 años de edad. Todas las parcelas estaban injertadas sobre patrón Citrange carrizo y regadas mediante riego por goteo.

4.2.2. Aislados

Se utilizaron las cepas Phy-114 de *P. citrophthora*, aislada de chancros en ramas de limonero cv. Verna de Santomera (Murcia) y Phy 047 de *P. parasitica*, aislada de lesiones en tronco de árboles de mandarina Clemenules de Canals (Valencia). Ambos aislados se seleccionaron en un ensayo preliminar por su agresividad a cultivares de cítricos.

4.2.3. Registro de las variables medioambientales en campo

Las variables medioambientales se registraron entre el 1 de octubre de 2004 y el 31 de diciembre de 2006 con los registradores de datos CR10 y CR10X (Campbell Scientific LTD., Leicester, UK) conectados a sensores combinados de temperatura y humedad relativa (modelo HMP35AC), humedad (modelo 237) y lluvia (modelo ARG100). A partir de los datos obtenidos se calcularon las ocho variables medioambientales siguientes: temperaturas mensuales (°C) (promedio

de mínimas, medias y máximas), humedad relativa mensual (%), (promedio de mínimas, medias y máximas), agua libre en la copa (horas acumuladas en el mes) y pluviometría mensual (mm de agua).

4.2.4. Ensayo de campo

En cada parcela experimental se seleccionaron al azar 30 árboles, los cuales se marcaron y numeraron. Un grupo de 10 árboles distribuidos al azar en la parcela constituyó el tratamiento para las inoculaciones con *P. citrophthora*, otro grupo de 10 árboles para *P. parasitica* y el último grupo sirvió como control. Sobre cada árbol en cada tratamiento se seleccionó al azar una rama lignificada (~ 25 – 30 mm de diámetro) a partir del tercio medio de la copa del árbol. La primera semana de cada mes, desde octubre de 2004 a diciembre de 2006, se realizaron las inoculaciones a las ramas con las especie de *Phytophthora* en estudio. En cada árbol se inoculó una rama por cada fecha de inoculación. Para las inoculaciones, se siguió la metodología descrita en el capítulo 2 (ensayo 2; apartado 2.2.5.). Las ramas de los diez árboles que conformaron el tratamiento control se inocularon con discos de PDA estéril.

Las evaluaciones se realizaron 30 días después de cada inoculación. Las ramas inoculadas se cortaron del árbol y se llevaron al laboratorio en donde se evaluó el área de la lesión desarrollada por cada especie de *Phytophthora*. El proceso de evaluación de las áreas de infección de las ramas fue similar al descrito en el capítulo 2 (ensayo 2; apartado 2.2.5.). A cada una de las lecturas se le restó el área de inoculación. Para confirmar que los chancros desarrollados pertenecían al patógeno en cuestión, en cada evaluación se hicieron reaislamientos de ramas al azar sembrando tejidos afectados de las lesiones en medio PARBPH.

4.2.5. Ensayo de laboratorio

En intervalos mensuales coincidentes con los momentos de inoculación de ramas en campo, se colectaron 30 varetas de cítricos lignificadas de alrededor de 20 cm de longitud y 25 – 30 mm de diámetro de cada uno de los campos en estudio. Una vez cortadas, se guardaron inmediatamente en cámaras húmedas para evitar la pérdida de humedad hasta su traslado al laboratorio para su procesamiento. En laboratorio, cada vareta se desinfectó con alcohol y en la parte basal de la misma se colocó un trozo de algodón empapado en agua estéril sujetado con parafilm. El proceso de inoculación fue similar al descrito en el capítulo 2 (ensayo 2; apartado 2.2.5.). Se inocularon diez varetas por cada tratamiento. Las inoculaciones se realizaron con los mismos aislados de *Phytophthora* utilizados en la fase de campo. Los controles se inocularon bajo el mismo procedimiento pero utilizando agar estéril. Las varetas inoculadas se introdujeron en cámara húmeda y se incubaron en estufa a 24 °C.

Las evaluaciones se efectuaron 7 días después de cada inoculación. Con la ayuda de un injertador se procedió al levantamiento de la corteza hasta descubrir completamente el área de la lesión. Para la evaluación del área de lesión, se siguió la misma metodología utilizada en el ensayo de campo. A cada una de las lecturas se le restó el área de inoculación. En cada evaluación se hicieron reaislamientos de varetas al azar a partir de los tejidos afectados sobre medio PARBPH.

4.2.6. Determinación del contenido relativo de agua (CRA) en la corteza

En los mismos intervalos de inoculación de ramas en campo, se colectó al azar 5 estrías de tejido cortical (5 x 3 cm) a partir de ramas principales de 8 a 12 cm de grosor de cada campo en estudio. Para mantener una homogeneidad del material vegetal colectado durante el tiempo del experimento, las estrías se extrajeron a partir de las ramas del tercio medio del árbol. Una vez extraídas, se depositaron en cámara húmeda para evitar la pérdida de humedad y se trasladaron al laboratorio para determinar el contenido relativo de agua en la corteza. Para el procesamiento de las muestras se utilizó la metodología descrita por Robin *et al.* (1994). En primer lugar se midió el peso fresco de la muestra (PF). A continuación se determinó el peso de turgencia (PT); para ello, las muestras se mantuvieron por espacio de 18 horas en agua, se secaron superficialmente con papel de celulosa y se pesaron. Finalmente, para determinar el peso seco (PS), las muestras se colocaron en un horno a 70 °C durante 3 días y se volvieron a pesar. El contenido relativo de agua en la corteza (CRA) se calculó con la fórmula:

$$CRA = [(PF-PS)/(PT-PS)] \times 100$$

4.2.7. Análisis estadístico

Los promedios mensuales del área de lesión registrada en cada cultivar de cítricos en estudio se sometieron por separado a un análisis de la varianza (ANOVA) para establecer diferencias entre el desarrollo mensual y estacional de lesiones en relación a las especies de *Phytophthora* inoculadas. Las diferencias significativas entre medias se determinaron a un nivel de significación de $P < 0,05$. Con los factores que resultaron significativos en el ANOVA, se realizó una prueba de separación de medias utilizando el análisis de Fisher de la mínima diferencia significativa (LSD). El programa estadístico utilizado para estos análisis fue el SAS versión 9.0 (SAS Institute, Cary, N.C).

Para explorar y medir las relaciones potenciales entre los tamaños de lesión causados por *P. citrophthora* y *P. parasitica* y las variables medioambientales y relacionadas al hospedante (CRA en la corteza), se realizaron análisis de regresión lineal y múltiple. Los datos colectados durante el periodo de octubre de 2004 a diciembre de 2006 se usaron para los análisis de regresión. Estos análisis se condujeron separadamente por cada cultivar de cítricos utilizando el paquete estadístico SAS y diferencias significativas entre medias se determinaron a $P < 0,05$.

Debido a que los datos de algunas variables frecuentemente presentaron valores altos y bajos, en algunos casos cercanos a cero, se utilizaron transformaciones de sus datos a raíz cuadrada y a logaritmos para obtener una aproximación más cercana a la distribución normal de residuos.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Fluctuación estacional de la susceptibilidad de los cítricos a especies de *Phytophthora*.

1. Ensayo de campo

Los valores promedios mensuales del área de lesión (cm²) de los cultivares de cítricos ensayados frente a las especies de *Phytophthora* aparecen representados en la **Tabla 10.19 (Anexos)** y **Figura 4.1**. El tratamiento testigo no desarrolló lesiones a lo largo del período de inoculaciones.

a. Fluctuación mensual en el desarrollo de lesiones

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) de los promedios mensuales de área de lesión por especie de *Phytophthora* y por cultivar de cítrico por año (**Tabla 4.1**), mostraron que existieron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre los factores estudiados (meses y especies) y sus respectivas interacciones para los tres cultivares estudiados. Al registrarse interacción entre los factores de estudio, se hizo un análisis por separado de cada especie de *Phytophthora* y cultivar para determinar el mes o los meses del año en los cuales estas especies son más agresivas o despliegan mayor actividad.

P. citrophthora

Los mayores promedios de área de lesión y que a su vez resultaron estadísticamente significativos se produjeron entre los meses de marzo y mayo en el cultivar Fortune, siendo mayo donde se alcanzó los mayores promedios de área de lesión en 2005 y abril en el 2006 (**Figura 4.1, Tabla 4.1**). Posteriormente, se produjo un descenso en los promedios del área de lesión durante los meses estivales. En los meses de septiembre – octubre se produjo un incremento de los valores promedio de lesión. A partir del mes de noviembre se produjo una disminución en el tamaño de la lesión, llegando a sus valores mínimos en los meses de enero y febrero. Es en este período en donde se registraron los valores promedios estadísticamente más bajos de todo el ensayo. A partir del mes de noviembre se produjo una disminución en el tamaño de la lesión, llegando a sus valores mínimos en los meses de enero y febrero. Es en este período en donde se registraron los valores promedios estadísticamente más bajos de todo el ensayo.

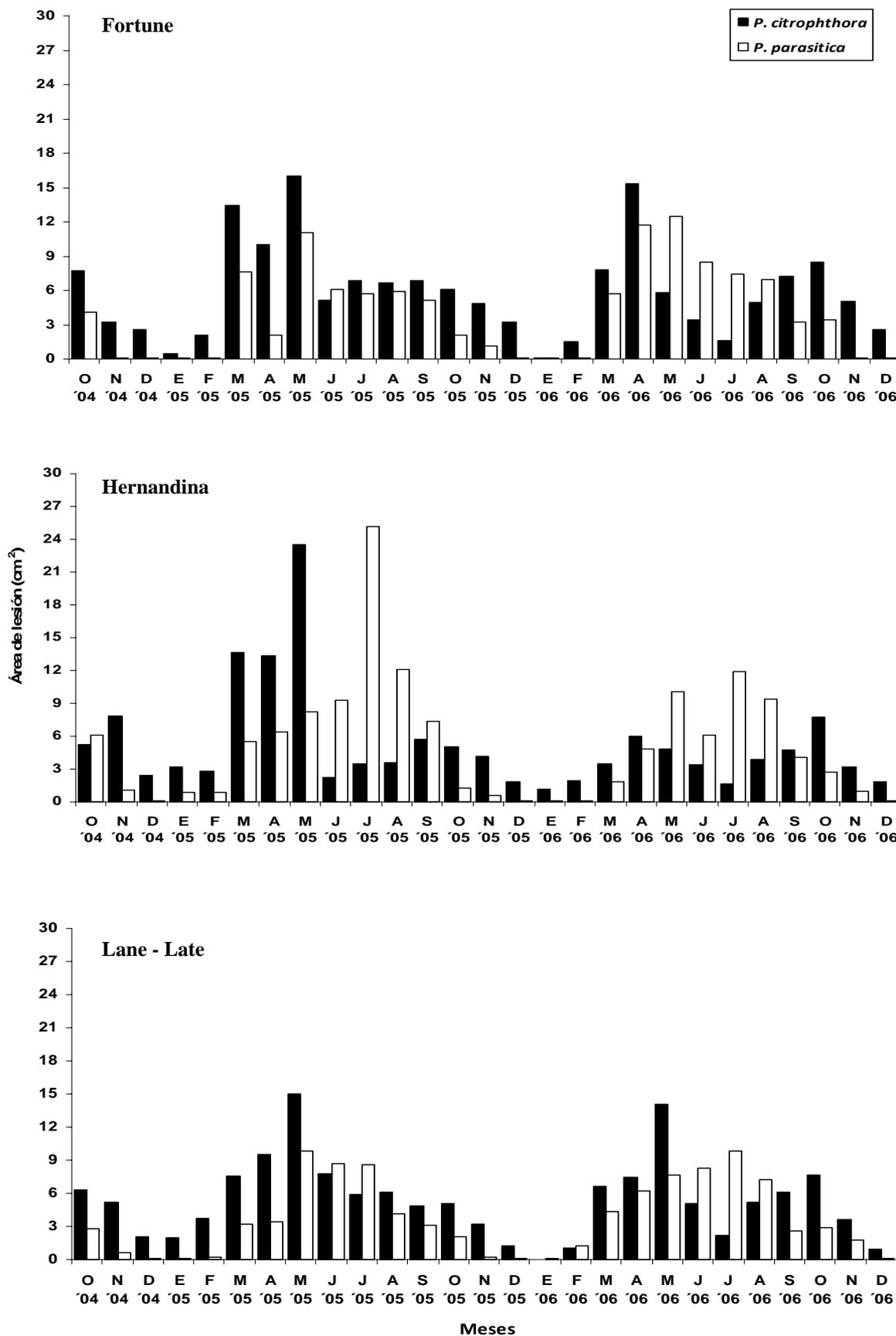


Figura 4.1. Evolución mensual del tamaño de las lesiones (cm²) en tres variedades de cítricos inoculadas en campo con dos especies de *Phytophthora*.

Tabla 4.1. Promedios mensuales de área de lesión causada por especies de *Phytophthora* en cultivares de cítricos en ensayos de inoculaciones en campo.

a. Año 2004 – 2005

Fuente	Valor de P											
	Fortune		Hernandina				Lane - Late					
Ef. principal												
A : Meses	0,0000		0,0000				0,0000					
B : Especies	0,0000		0,0000				0,0000					
Interacción												
A x B	0,0000		0,0000				0,0000					
	Fortune		Hernandina				Lane - Late					
	<i>P. citrophthora</i>	<i>P. parasitica</i>										
Octubre '04	7,75 ^W	bc ^X	4,08	ab	5,20	b	6,06	b	6,32	b	2,76	a
Noviembre '04	3,20	ab	0,10	a	7,81	b	1,10	a	5,13	b	0,66	a
Diciembre '04	2,58	a	0,10	a	2,41	a	0,10	a	2,10	a	0,10	a
Enero '05	0,52	a	0,09	a	3,23	a	0,87	a	1,93	a	0,10	a
Febrero '05	2,05	a	0,10	a	2,79	a	0,90	a	3,76	a	0,16	a
Marzo '05	13,46	d	7,58	c	13,63	c	5,51	b	7,51	bc	3,20	a
Abril '05	10,02	cd	2,13	a	13,32	c	6,40	b	9,53	c	3,45	a
Mayo '05	15,98	d	11,01	d	23,49	d	8,18	bc	14,96	d	9,78	c
Junio '05	5,14	b	6,13	bc	2,22	a	9,33	bc	7,77	bc	8,71	bc
Julio '05	6,81	b	5,75	b	3,46	a	25,13	d	5,87	b	8,54	bc
Agosto '05	6,67	b	5,90	b	3,57	a	12,13	c	6,06	b	4,12	ab
Septiembre '05	6,88	b	5,18	b	5,67	b	7,32	b	4,83	ab	3,13	a
Especies												
<i>P. citrophthora</i>	6,75 ^{YZ}		b				7,23				a	
<i>P. parasitica</i>	4,01		a				6,92				a	

b. Año 2005 – 2006

Fuente	Valor de P											
	Fortune		Hernandina				Lane - Late					
Ef. principal												
A : Meses	0,0000		0,0000				0,0000					
B : Especies	0,0000		0,0000				0,0000					
Interacción												
A x B	0,0000		0,0000				0,0000					
	Fortune		Hernandina				Lane - Late					
	<i>P. citrophthora</i>	<i>P. parasitica</i>										
Octubre '05	6,11 ^W	b ^X	2,13	a	5,00	ab	1,22	a	5,12	ab	2,03	a
Noviembre '05	4,84	ab	1,14	a	4,18	ab	0,60	a	3,18	a	0,23	a
Diciembre '05	3,21	a	0,10	a	1,87	a	0,10	a	1,19	a	0,10	a
Enero '06	0,10	a	0,10	a	1,12	a	0,10	a	0,10	a	0,10	a
Febrero '06	1,56	a	0,10	a	1,97	a	0,10	a	1,01	a	1,26	a
Marzo '06	7,77	b	5,76	b	3,48	a	1,88	a	6,58	b	4,38	ab
Abril '06	15,33	c	11,71	c	5,98	b	4,81	ab	7,47	bc	6,17	b
Mayo '06	5,83	ab	12,43	c	4,80	ab	10,06	c	14,10	c	7,65	b
Junio '06	3,39	a	8,51	bc	3,37	a	6,09	b	5,03	ab	8,23	bc
Julio '06	1,65	a	7,40	b	1,67	a	11,87	c	2,16	a	9,87	c
Agosto '06	5,00	ab	6,94	b	3,91	a	9,40	bc	5,17	ab	7,23	b
Septiembre '06	7,23	b	3,22	a	4,72	ab	4,08	ab	6,09	b	2,55	a
Especies												
<i>P. citrophthora</i>	5,17 ^{YZ}		b				5,51				b	
<i>P. parasitica</i>	4,66		a				4,19				a	

^W Cada valor es media de 10 repeticiones.

^X Números seguidos de la misma letra en la columna no son significativamente diferentes según el análisis LSD (P<0,05).

^Y Cada valor es media de 120 repeticiones.

^Z Promedio de área de lesión en cm².

Con el cultivar Hernandina se observó una considerable variación en los promedios de área de lesión entre años de estudio, registrándose mayores áreas de lesión en 2005 que en 2006. Los promedios de área de lesión significativamente más altos se registraron en los meses de marzo a mayo, destacando mayo con el mayor promedio de área de lesión en 2005 y octubre en el 2006 (**Tabla 4.1**).

Posteriormente, se produjo una caída de los promedios de área de lesión durante el mes de junio, manteniéndose esta tendencia en los meses estivales. Los valores promedios del área de lesión aumentaron algo en el período septiembre-octubre, para descender progresivamente a sus niveles más bajos a partir del mes de noviembre. En los meses de diciembre, enero y febrero se registraron las áreas promedio de lesión más bajas. En la **Figura 4.1** se observa que estas tendencias y picos de infección se repitieron en todo el experimento. En el segundo año (2006), a pesar de que los mayores promedios de lesión se registraron en los meses de septiembre - octubre, éstos no difirieron significativamente de los valores obtenidos en los meses de abril y mayo.

En el cultivar Lane-Late los mayores promedios de área de lesión se registraron entre marzo y mayo, siendo en mayo de 2005 y 2006 donde se obtuvieron los mayores promedios de área de lesión, difiriendo significativamente de los otros meses de estudio (**Tabla 4.1**). A partir de junio, se registró una disminución en los valores promedios de área de lesión hasta los meses de diciembre a enero, en donde se registraron los niveles de infección más bajos (**Figura 4.1**). En ambos años de estudio se observaron dos picos de infección, el primero entre los meses de marzo a junio y el segundo en los meses de agosto - octubre.

P. parasitica

En el cultivar Fortune, los promedios de área de lesión de todos los meses de inoculaciones (**Tabla 10.19** y **Figura 4.1**) mostraron que *P. parasitica* comenzó su actividad a partir del mes de marzo de cada año. Sin embargo, fue en mayo en donde alcanzó los valores de tamaño de lesión más altos y estadísticamente más importantes de todo el estudio. En general, se pudo observar que *P. parasitica* desarrolló un comportamiento de infección similar a *P. citrophthora* en este cultivar en el primer año (2005), pero difirió sustancialmente en el segundo año (2006) por el mayor tamaño de lesiones registradas en los meses de verano. Entre los meses de noviembre a febrero la actividad de esta especie fue nula.

De manera similar, en el cultivar Hernandina *P. parasitica* comenzó su actividad a partir del mes de marzo; no obstante, su severidad varió sustancialmente en función del año. En 2005, los mayores promedios de lesión se obtuvieron a partir del mes de mayo con un pico significativo en julio, prolongándose hasta el mes de septiembre. En el año 2006 se observó una importante actividad entre los meses de abril a junio; sin embargo, fue en el mes de julio en donde se produjo los mayores promedios de área de lesión y estadísticamente más importantes.

En el cultivar Lane – Late no hubo diferencias marcadas en los valores promedios de área de lesión entre los años de ensayo. En el año 2005 se observó que las áreas de lesión más grandes se registraron en los meses de mayo, junio y julio sin diferencias estadísticas entre meses, pero destacando mayo en donde se registró los mayores promedios de área de lesión. A partir de este período las áreas de lesión disminuyeron progresivamente hasta noviembre, diciembre y enero, donde se registraron los promedios de lesión más bajos. En el año 2006 la mayor actividad se registró en los meses de mayo, junio y julio, sin diferencias estadísticas entre meses; no obstante, fue en julio en donde se registraron los mayores promedios de área de lesión. A partir de agosto, los promedios de área de lesión disminuyeron paulatinamente, registrándose sus valores mínimos en diciembre.

En general, el promedio global de las áreas de lesión para ambas especies de *Phytophthora* (Tabla 4.1.), muestra que la especie *P. citrophthora* obtuvo valores promedio de área de lesión más grandes que la especie *P. parasitica* en todas las evaluaciones, aunque en Hernandina no resultó significativa la diferencia en el primer año de estudio.

b. Fluctuación estacional en el desarrollo de lesiones

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) mostraron efectos significativos (P<0,05) del desarrollo estacional de lesiones en relación a las especies de *Phytophthora* inoculadas. Para este análisis sólo se tomaron en cuenta los datos de área de lesión registrados entre octubre de 2004 a septiembre de 2006. En la Tabla 4.2 se muestran los promedios estacionales acumulados de área de lesión para ambas especies de *Phytophthora*.

Tabla 4.2. Promedios estacionales de área de lesión causada por especies de *Phytophthora* en cultivares de cítricos en ensayos de inoculaciones en campo.

Estaciones ^X	Área de lesión (cm ²)							
	<i>P. citrophthora</i>				<i>P. parasitica</i>			
	Fortune	Hernandina	Lane-Late	Promedio	Fortune	Hernandina	Lane-Late	Promedio
Otoño	5,75 ^Y b ^Z	5,28 b	4,89 b	5,31	2,20 a	2,86 a	1,77 a	2,28
Invierno	1,67 a	2,23 a	1,68 a	1,86	0,10 a	0,36 a	0,30 a	0,25
Primavera	11,40 c	10,78 c	10,03 c	10,74	8,44 b	6,14 b	5,77 b	6,78
Verano	4,78 ab	3,03 a	4,34 b	4,05	6,77 b	11,33 c	7,78 b	8,96
Promedio	5,90	5,33	5,24		4,38	5,17	3,91	

^X Otoño (septiembre, octubre y noviembre); invierno (diciembre, enero y febrero); primavera (marzo, abril y mayo); verano (junio, julio y agosto).

^Y Cada valor es media de 60 repeticiones.

^Z Números seguidos de la misma letra en la columna no son significativamente diferentes según el análisis LSD (P<0,05).

En la **Tabla 4.2** se puede observar que los mayores promedios de área de lesión en los diferentes cultivares de cítricos inoculados con *P. citrophthora* se producen durante los meses primaverales (marzo, abril y mayo), seguido de los meses otoñales (septiembre, octubre y noviembre), los meses estivales (junio, julio y agosto) y, por último los meses invernales (diciembre, enero y febrero). Estos resultados también muestran que los promedios de área de lesión entre otoño y verano no son marcadamente diferentes.

En los cultivares Hernandina y Lane-Late inoculados con *P. parasitica*, los mayores promedios de área de lesión se produjeron durante los meses estivales, seguido de cerca por los meses primaverales, otoñales y, por último, los meses invernales. Sin embargo, en el cultivar Fortune los mayores promedios de área de lesión se produjeron durante los meses primaverales, aunque no difirieron estadísticamente de los meses de verano. Al igual que con los otros cultivares, los promedios más bajos de área de lesión se registraron en otoño e invierno, sin diferencias significativas entre ambas estaciones.

El promedio total de área de lesión por cultivar de cítricos en función de la especie de *Phytophthora* inoculada mostró que el cultivar Fortune inoculado con *P. citrophthora* presentó un mayor promedio acumulado de área de lesión que el cultivar Hernandina y éste a su vez que el cultivar Lane-Late. Con *P. parasitica* los mayores promedios acumulados de área de lesión se registraron en Hernandina, seguido por Fortune y, por último, Lane-Late.

2. Ensayo de laboratorio

Los valores de área de lesión (cm²) de los cultivares estudiados aparecen representados en la **Tabla 10.20 (Anexos)** y **Figura 4.2**. El tratamiento testigo no mostró síntomas de la enfermedad a lo largo del período de inoculaciones. Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) mostraron efectos significativos ($P < 0,05$) del desarrollo estacional de lesiones en relación a las especies de *Phytophthora* inoculadas en varetas bajo condiciones controladas. Para este análisis sólo se tomaron en cuenta los datos de área de lesión registrados entre octubre de 2004 a septiembre de 2006.

P. citrophthora

Las lesiones desarrolladas en varetas del cultivar Fortune (**Tabla 10.20**, en anexos y **Figura 4.2**) fueron bastante heterogéneas en todo el ensayo. Los picos de lesión más altos se encontraron en los meses de enero - febrero y agosto - septiembre en el primer año, y enero - febrero y junio - agosto en el segundo año. Los promedios de longitud de lesión más bajos fueron variables en función del año, pero con la tendencia a ser en los meses de marzo a mayo y de noviembre a diciembre de cada año.

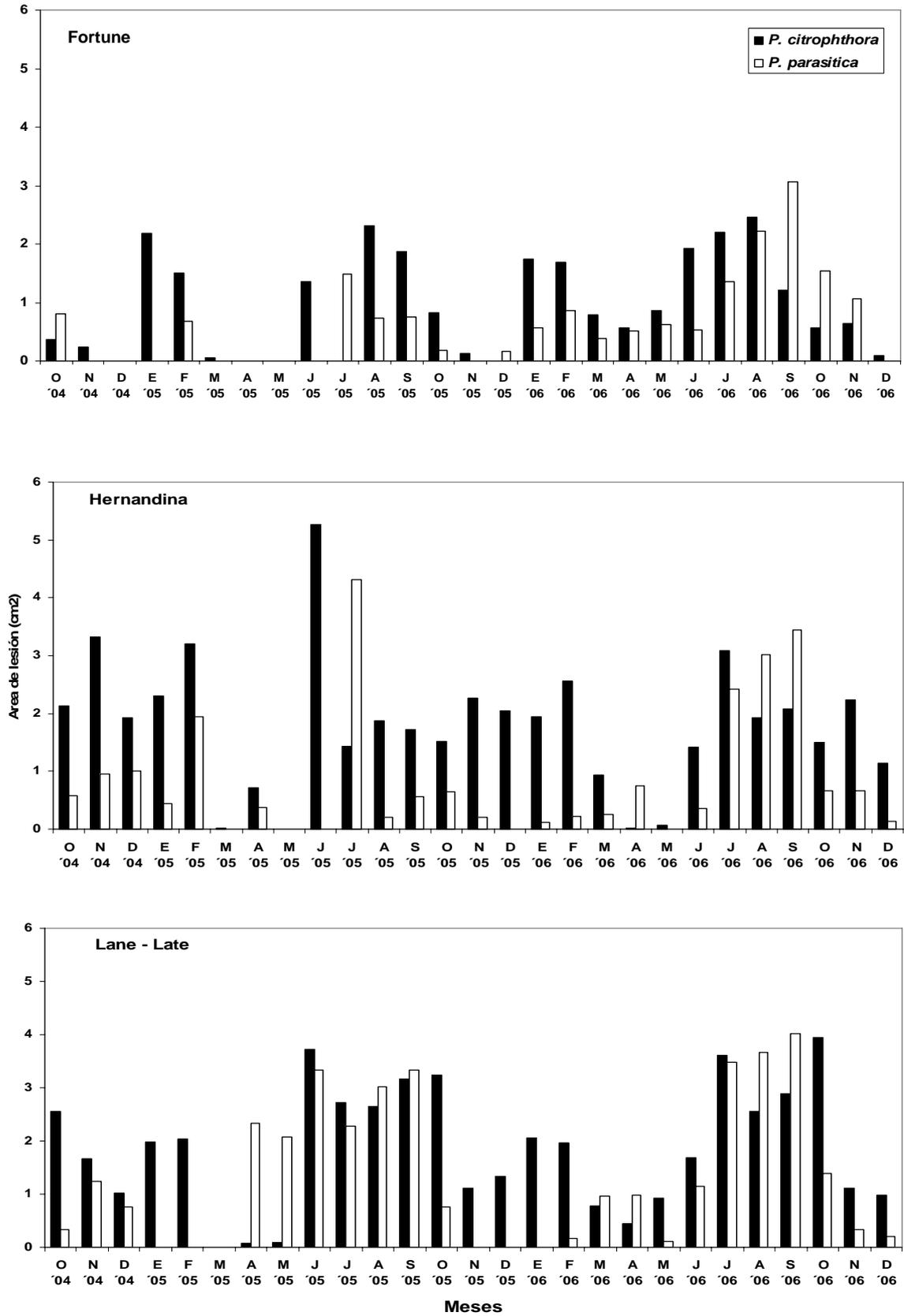


Figura 4.2. Evolución mensual del tamaño de las lesiones (cm²) en tres variedades de cítricos inoculadas en laboratorio con dos especies de *Phytophthora*.

Las áreas de lesión sobre los cultivares Hernandina y Lane - Late fueron más homogéneas durante el ensayo, y al igual que con Fortune, los valores promedios de área de lesión más bajos se encontraron en los meses de marzo a mayo de cada año. En la **Tabla 4.3** se muestran los promedios estacionales acumulados de área de lesión para ambas especies de *Phytophthora*. No se detectó ningún modelo estacional de desarrollo de lesiones. El cultivar Fortune presentó los menores promedios de área de lesión.

Tabla 4.3. Promedios estacionales acumulados de área de lesión causada por especies de *Phytophthora* en cultivares de cítricos en inoculaciones de ramas *in vitro*.

Estaciones ^x	Área de lesión (cm ²)							
	<i>P. citrophthora</i>				<i>P. parasitica</i>			
	Fortune	Hernandina	Lane-Late	Promedio	Fortune	Hernandina	Lane-Late	Promedio
Otoño	0,68 ^Y a ^Z	2,17 b	2,42 bc	1,76	0,87 ab	0,95 ab	1,36 b	1,06
Invierno	1,19 ab	2,33 b	1,73 b	1,75	0,38 a	0,63 a	0,16 a	0,39
Primavera	0,38 a	0,30 a	0,39 a	0,36	0,26 a	0,23 a	1,08 b	0,52
Verano	1,71 b	2,50 b	2,83 c	2,35	1,05 ab	1,72 ab	2,82 c	1,86
Promedio	0,99	1,83	1,84		0,64	0,88	1,36	

^x Otoño (septiembre, octubre y noviembre); invierno (diciembre, enero y febrero); primavera (marzo, abril y mayo); verano (junio, julio y agosto).

^y Cada valor es media de 60 repeticiones.

^z Números seguidos de la misma letra en la columna no son significativamente diferentes según el análisis LSD (P<0,05).

P. parasitica

En función del cultivar y del año de inoculación, se encontró que en general los promedios de área de lesión más altos fueron en los meses de julio, agosto y septiembre, y los valores más bajos en los meses de marzo, abril y mayo de cada año (**Tabla 10.20** y **Figura 4.2**). No se detectó ningún modelo estacional de desarrollo de lesiones. El cultivar Fortune presentó los menores promedios de área de lesión.

4.3.2. Influencia de los factores ambientales en la susceptibilidad de los cítricos a *P. citrophthora* y *P. parasitica*.

Factores medioambientales

La **Tabla 4.4** y la **Figura 4.3** muestran los valores de los factores ambientales y su relación con las áreas de lesión de ambas especies de *Phytophthora* a lo largo del estudio.

La temperatura media promedio (T^a m promedio) alcanzó valores máximos en junio de 2005 (21,6 °C), julio de 2006 (25,2 °C) y agosto 2006 (23,4 °C), y mínimos en enero de 2005 (4,8 °C) y febrero de 2005 (6° C). Los valores de precipitación fueron muy heterogéneos durante todo el ensayo, siendo en los meses de diciembre de 2004 y 2005 donde se produjeron las mayores

precipitaciones (151,2 y 381,0 mm, respectivamente). Los periodos de lluvia más estables se registraron en los meses de primavera y otoño de cada año. La humedad relativa media promedio (HR m promedio) fluctuó entre 60 y 81 % en todo el experimento, alcanzando valores máximos en noviembre y diciembre de 2004 (80,1 y 80,8 %) y mínimos en abril de 2005 y marzo de 2006 (67,2 y 61,7 %, respectivamente). La fluctuación del agua libre fue también bastante heterogénea, encontrándose valores máximos en diciembre de 2004 (378 h) y mayo de 2005 (388,8 h), llegando a valores mínimos en febrero de 2005 y marzo de 2006 (226 y 163 horas, respectivamente).

Las condiciones climáticas registradas en la zona de estudio guardan estrecha relación con los climas húmedos mesotérmicos, caracterizados por veranos calurosos y secos, climas típicos de zonas mediterráneas de acuerdo con el sistema de clasificación climática de Koeppen (Lutgens y Tarbuck, 2004).

Tabla 4.4. Valores promedios mensuales de algunos factores ambientales registrados durante el estudio.

Meses	Temperatura media (°C)			Humedad relativa (%)			Pluviometría (mm)	Agua libre (hs)
	máximas	promedio	mínimas	máximas	promedio	mínimas		
Octubre 04	21,6	17,0	15,6	92,0	71,2	55,0	0,1	322,0
Noviembre	16,2	9,8	9,5	100,0	80,8	65,0	4,6	348,3
Diciembre	14,0	7,8	3,0	100,0	80,1	59,0	151,2	378,0
Enero 05	12,5	4,8	2,6	99,0	73,8	56,0	2,0	280,0
Febrero 05	14,7	6,0	4,9	98,0	72,6	51,0	84,0	226,0
Marzo 05	19,1	9,9	6,8	93,0	74,2	57,0	10,0	273,0
Abril 05	17,7	13,6	14,6	97,0	67,2	53,0	14,3	264,0
Mayo 05	22,3	17,0	14,4	91,0	75,8	48,0	36,0	388,8
Junio 05	24,4	21,6	17,1	82,0	72,5	58,0	20,0	344,8
Julio 05	26,9	22,7	23,3	80,0	78,6	49,0	11,0	268,8
Agosto 05	25,1	22,0	21,5	76,0	77,2	41,0	1,2	334,3
Septiembre	23,2	19,0	17,2	99,0	76,0	55,0	20,0	320,0
Octubre 05	21,3	17,1	15,5	91,0	68,7	53,0	8,3	335,0
Noviembre	16,4	11,3	10,3	100,0	75,0	58,0	76,5	341,0
Diciembre	15,5	7,9	3,9	99,0	76,5	49,0	381,0	364,0
Enero 06	11,9	5,0	2,2	100,0	72,4	64,0	3,0	315,0
Febrero 06	15,1	6,7	4,3	97,0	69,9	60,0	76,5	265,0
Marzo 06	18,6	13,3	5,5	99,0	61,7	41,0	35,0	163,0
Abril 06	17,6	15,2	13,2	96,0	70,7	52,0	37,0	316,0
Mayo 06	21,7	18,1	14,5	85,0	71,4	49,0	34,4	370,0
Junio 06	24,4	21,0	16,7	82,0	72,2	57,0	12,3	321,0
Julio 06	26,8	25,2	23,2	83,0	69,2	55,0	2,1	314,0
Agosto 06	24,9	23,4	21,5	77,0	69,2	36,0	8,2	277,0
Septiembre	23,6	20,9	17,8	98,0	74,3	49,0	22,1	368,0
Octubre 06	21,8	17,8	15,7	89,0	75,6	47,0	28,5	364,0
Noviembre	16,4	11,4	10,1	100,0	77,2	66,0	85,0	269,0
Diciembre	15,7	7,9	3,4	99,0	77,7	51,0	17,6	295,0

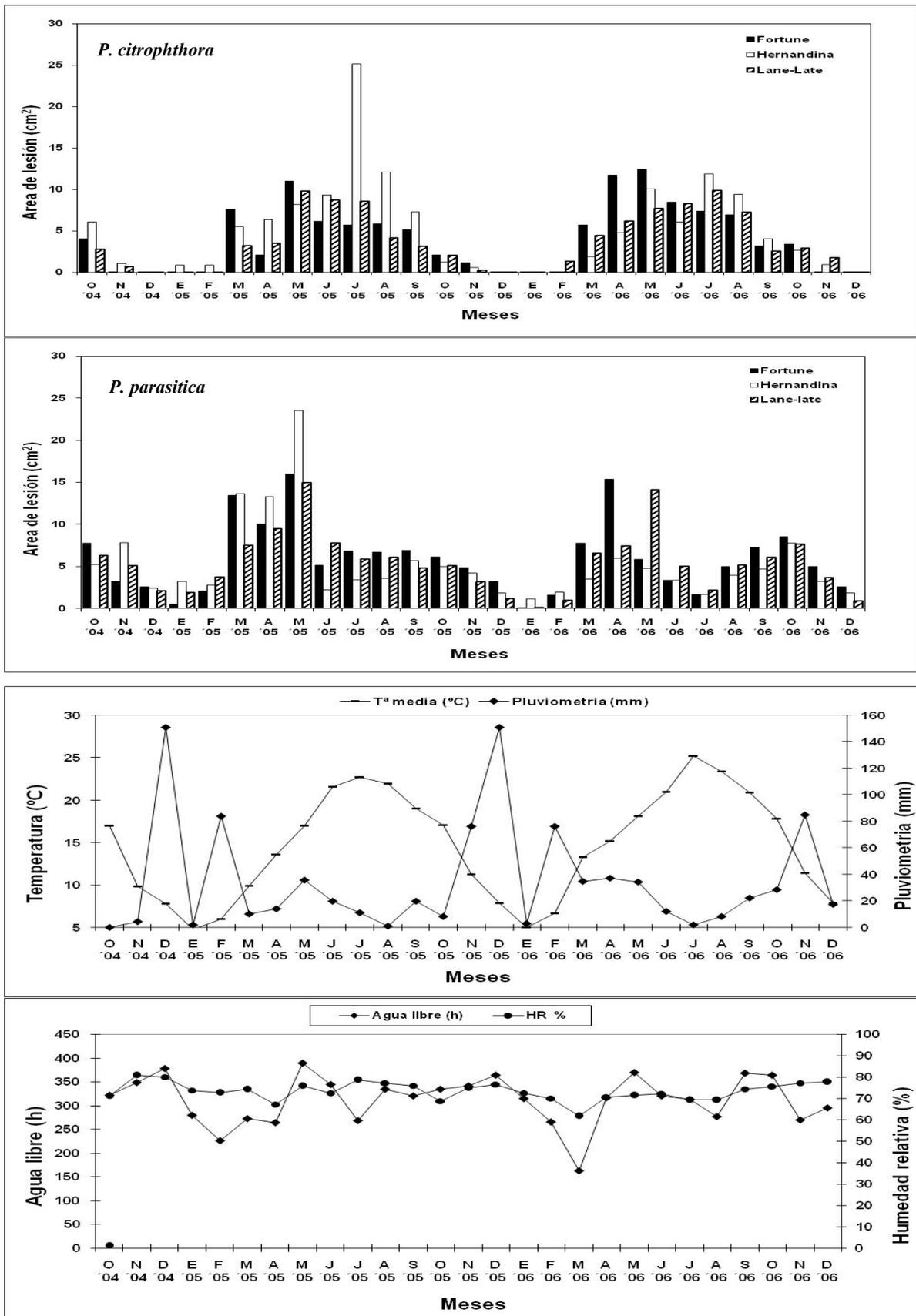


Figura 4.3. Fluctuación en los valores de los promedios del área de lesión en ensayos de campo en cultivares de cítricos inoculados con especies de *Phytophthora* y su relación con los factores medioambientales.

Correlación entre los factores medioambientales estudiados y el área de la lesión en variedades de cítricos en campo.

a. *P. citrophthora*

El análisis de regresión múltiple no mostró correlación ($P > 0,05$) entre los factores medioambientales y el tamaño de lesión desarrollado en los cultivares de cítricos inoculados cuando se analizaron en conjunto los datos de los 27 meses de ensayo (**Tabla 4.5**). Las diferentes transformaciones de datos no incrementaron mayormente la cantidad de variabilidad explicada. Tampoco se encontró correlación mediante regresiones simples entre las variables medioambientales y los tamaños de lesión de períodos anuales y bianuales (Datos no mostrados).

Tabla 4.5. Significancia de la regresión múltiple de la relación entre variables meteorológicas y el área de lesión en ramas de variedades de cítricos inoculadas con *P. citrophthora* en 27 meses de inoculaciones.

Cultivar de cítricos y variables independientes	Valor de <i>P</i> *
Fortune	
Agua libre	0,6344
HR m. máximas	0,5735
HR m. promedio	0,5642
HR m. mínimas	0,1103
Pluviometría	0,3755
T ^a m. máximas	0,1067
T ^a m. promedio	0,1142
T ^a m. mínimas	0,1107
Hernandina	
Agua libre	0,3268
HR m. máximas	0,9464
HR m. promedio	0,8545
HR m. mínimas	0,5974
Pluviometría	0,3568
T ^a m. máximas	0,5192
T ^a m. promedio	0,6916
T ^a m. mínimas	0,5151
Lane - Late	
Agua libre	0,2521
HR m. máximas	0,0751
HR m. promedio	0,4334
HR m. mínimas	0,0731
Pluviometría	0,1511
T ^a m. máximas	0,0780
T ^a m. promedio	0,0786
T ^a m. mínimas	0,0842

* ANOVA, probabilidad para la ecuación de regresión

Sin embargo, cuando se analizó mediante regresión simple un período específico dentro del ciclo anual del cultivo, por ejemplo, de septiembre a mayo de cada año (otoño, invierno, primavera) se obtuvo una correlación significativa ($P < 0,05$) con algunos valores de la temperatura y el porcentaje mensual de humedad relativa (HR) (Tabla 4.6). El número de horas de agua libre en la copa del árbol y la cantidad de lluvia no fueron significativas en ningún periodo de análisis y en ningún cultivar. La relación entre la HR y la lluvia con el área de lesión fue negativa (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Significancia de la regresión simple de la relación entre variables meteorológicas y el área de lesión en ramas de variedades de cítricos inoculadas con *P. citrophthora* en los intervalos de octubre a mayo de 2004 a 2005 y de septiembre a mayo de 2005 a 2006.

Cultivares de cítricos y variables independientes	Análisis de regresión simple ^Z					
	Octubre 2004* – May 2005			Septiembre 2005 – May 2006		
	Pendiente	r ²	Valor P	Pendiente	r ²	Valor P
Cultivar Fortune						
Agua libre	0,02105	0,045	0,6119	-0,00731	0,011	0,8035
HR media máximas	-1,32325	0,719	0,0078	-0,97689	0,413	0,0432
HR media promedio	-0,35119	0,074	0,5120	-0,30925	0,088	0,4744
HR media mínimas	-0,52191	0,220	0,2407	-0,32220	0,252	0,2041
Pluviometría	-0,03312	0,095	0,4576	-0,00782	0,043	0,6214
T ^a media máximas	1,39318	0,741	0,0060	0,69652	0,479	0,0478
T ^a media promedio	0,92300	0,566	0,0312	0,63909	0,453	0,0572
T ^a media mínimas	0,70231	0,430	0,0773	0,53358	0,368	0,1104
Cultivar Hernandina						
Agua libre	0,03881	0,094	0,4591	0,00389	0,022	0,7213
HR media máximas	-1,33654	0,447	0,0697	-0,17793	0,294	0,1650
HR media promedio	-0,21343	0,017	0,7592	-0,08007	0,042	0,6235
HR media mínimas	-0,63797	0,201	0,2656	-0,11026	0,862	0,0009
Pluviometría	-0,04477	0,105	0,4317	-0,00536	0,146	0,3499
T ^a media máximas	1,49884	0,523	0,0426	0,41225	0,602	0,0235
T ^a media promedio	1,03267	0,432	0,0764	0,32213	0,828	0,0017
T ^a media mínimas	0,83046	0,367	0,1114	0,30412	0,862	0,0009
Cultivar Lane – Late						
Agua libre	0,02107	0,080	0,4952	0,00700	0,010	0,8094
HR media máximas	-0,87602	0,557	0,0332	-0,70306	0,653	0,0152
HR media promedio	-0,25318	0,068	0,5301	-0,30507	0,088	0,4752
HR media mínimas	-0,46696	0,312	0,1501	-0,35857	0,321	0,1434
Pluviometría	-0,02604	0,104	0,4361	-0,01252	0,113	0,4148
T ^a media máximas	1,00941	0,688	0,0108	0,85727	0,775	0,0023
T ^a media promedio	0,73771	0,640	0,0171	0,81634	0,757	0,0049
T ^a media mínimas	0,61797	0,589	0,0260	0,62966	0,527	0,0418

^Z Valor de P, ANOVA, probabilidad para la ecuación de regresión; r². proporción de la variación explicada.

* No se incluyó septiembre en las regresiones pues el registro de datos comenzó en octubre de 2004.

En función del r² de los parámetros significativos de la regresión, se seleccionaron los factores que se ajustaron mejor en predecir la dinámica estacional de *P. citrophthora*. En el primer y segundo período de regresión (octubre '04 - mayo '05 y septiembre '05 - mayo '06) los factores HR m. máximas y T^a m. máximas fueron las variables que mejor se ajustaron en los cultivares

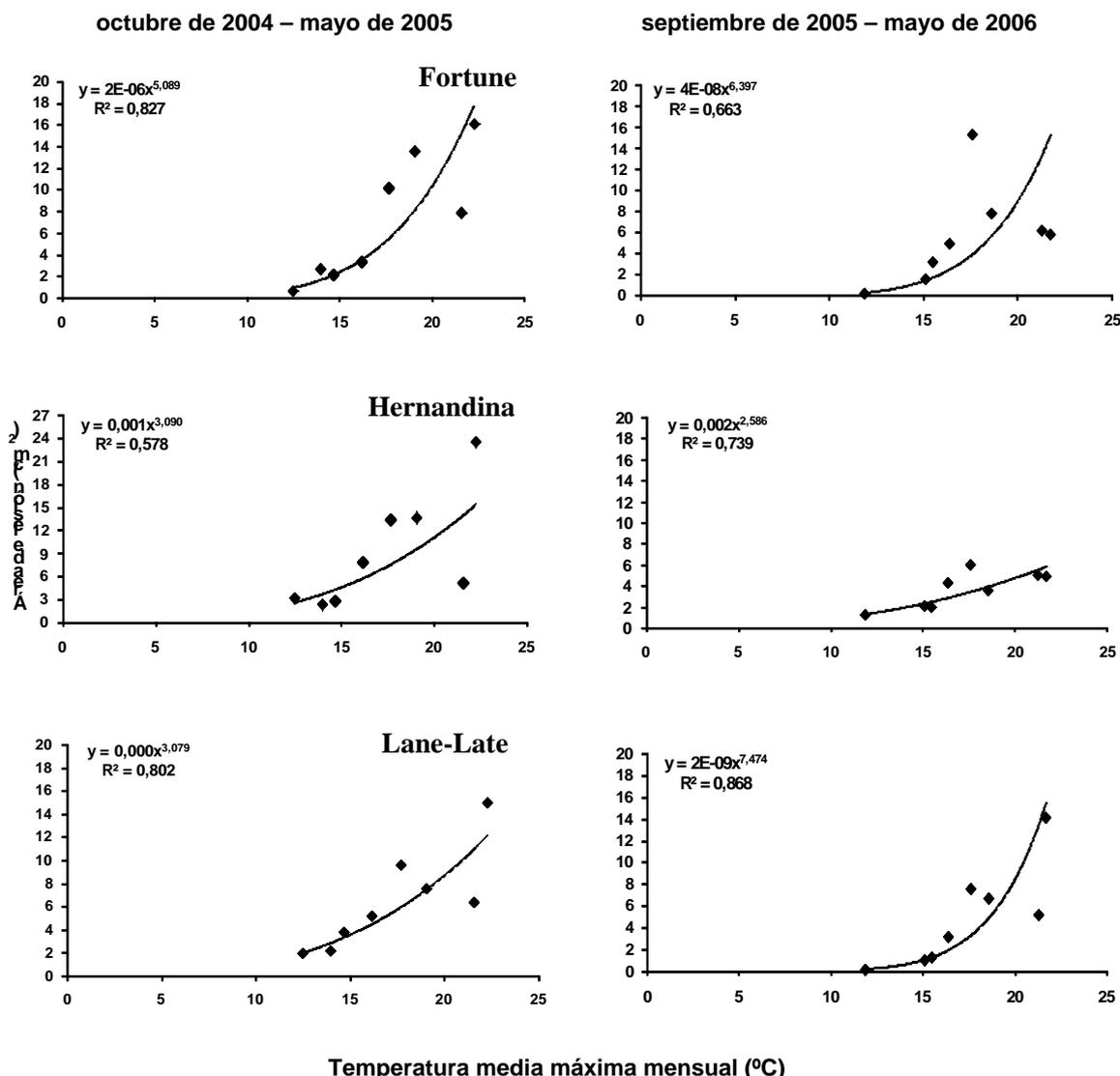
Fortune y Lane-Late. En el cultivar Hernandina en el primer periodo de regresión, sólo resultó significativa la T^a m. máximas. En el segundo periodo de regresión, la HR m. mínimas y T^a m. mínimas fueron los factores que se ajustaron mejor para predecir la estacionalidad de las lesiones en este cultivar. En los diversos cultivares y periodos de estudio, el r^2 más alto se obtuvo en el cultivar Fortune en el primer periodo de regresión.

El ploteo de datos mostró que las relaciones curvilíneas fueron más apropiadas para explicar la asociación entre las variables estudiadas. La ecuación que se ajustó mejor para explicar la infección de *P. citrophthora* en todos los cultivares de cítricos y en ambos periodos de estudio se obtuvo con el modelo potencial ($y = bx^a$), donde y es el área de la lesión en cm², x es la temperatura media en °C, a son unidades de área de lesión por unidad de temperatura y b es un parámetro que describe la inclinación de la pendiente (**Figura 4.4, Tabla 4.7**). El porcentaje de variación explicado por los modelos de cada ecuación de regresión en los distintos cultivares estudiados varió de 57,8 a 86,8 % (**Figura 4.4, Tabla 4.7**).

b. *P. parasitica*

El análisis de regresión múltiple en 27 meses de ensayos mostró correlación ($P < 0,05$) entre los valores de la temperatura y la humedad relativa con el promedio del área de lesión de todos los cultivares de cítricos inoculados con *P. parasitica* (**Tabla 4.8**). Todos los factores relacionados a la temperatura (T^a m máximas, media y mínimas) resultaron altamente significativos, indicando la gran influencia de este factor medioambiental en el desarrollo de las lesiones por esta especie de *Phytophthora*. La correlación también mostró que la HR es otro factor medioambiental importante en el desarrollo lesiones; sin embargo, solamente resultaron significativos los valores extremos (HR m máximas y mínimas). El agua libre y la pluviometría no resultaron ser factores significativos en el desarrollo de lesiones, indicando su irrelevancia en la dinámica estacional de infección por *P. parasitica*.

Con la finalidad de seleccionar la variable medioambiental dentro de la temperatura y HR de mayor influencia sobre el desarrollo de lesiones, se realizó un análisis de regresión simple entre las áreas de lesión y los factores que resultaron significativos en el análisis de regresión múltiple. Aunque todos los factores correlacionados resultaron significativos (**Tabla 4.9**), los resultados mostraron que la T^a m. máximas y HR m. máximas fueron las variables que mejor se ajustaron para predecir la fluctuación estacional de *P. parasitica* en cítricos al obtener los valores de r^2 más alto en cada regresión. Los ajustes obtenidos (**Tabla 4.10**) indican que la ecuación potencial ($y = bx^a$) es la más adecuada para describir la infección estacional de esta especie de *Phytophthora* (**Figura 4.5**). El porcentaje de variación explicado por los modelos de cada ecuación de regresión en los distintos cultivares estudiados varió de 71 a 73 % (**Tabla 4.10**).



Temperatura media máxima mensual (°C)

Figura 4.4. Relación entre el promedio de temperaturas máximas mensuales (°C) y el área promedio de lesión mensual (cm²) de los distintos cultivares en los intervalos de octubre a mayo de cada año en inoculaciones con *P. citrophthora*. Las ecuaciones corresponden a los ajustes de las regresiones con los valores de r^2 más altos.

Tabla 4.7. Datos de regresión simple para la relación entre la temperatura (x) y área de lesión (y) de ramas en variedades de cítricos inoculadas con *P. citrophthora* en los intervalos de octubre a mayo de 2004 a 2005 y de 2005 a 2006.

Cultivares de cítricos y modelo de regresión	Datos de regresión ^Z					
	a		b		r ²	
	O'04 - M '05	O'05 - M '06	O'04- M '05	O'05 - M '06	O'04 - M '05	O'05 - M '06
(y = bx ^a)						
Fortune	5,089	6,397	2 ⁻⁶	4 ⁻⁸	0,827	0,663
Hernandina	3,090	2,586	0,001	0,002	0,578	0,739
Lane - Late	3,079	7,474	0,000	2 ⁻⁹	0,802	0,868

^Z a, b, coeficientes de regresión; r², proporción de la variación explicada.

Tabla 4.8. Significancia de la regresión múltiple entre variables meteorológicas y el área de lesión en ramas de variedades de cítricos inoculadas con *P. parasitica* en 27 meses de inoculaciones.

Cultivar de cítricos y variables independientes.	Valor de P *
Fortune	
Agua libre	0,4473
HR m máximas	0,0010
HR m media	0,1665
HR m mínimas	0,0307
Pluviometría	0,1049
Temperatura m máximas	0,0003
Temperatura m media	0,0002
Temperatura m mínimas	0,0019
Hernandina	
Agua libre	0,9499
HR m máximas	0,0000
HR m media	0,8459
HR m mínimas	0,0576
Pluviometría	0,0833
Temperatura m máximas	0,0000
Temperatura m media	0,0000
Temperatura m mínimas	0,0000
Lane - Late	
Agua libre	0,6555
HR m máximas	0,0000
HR m media	0,1844
HR m mínimas	0,0709
Pluviometría	0,0829
Temperatura m máximas	0,0000
Temperatura m media	0,0000
Temperatura m mínimas	0,0000

* ANOVA, probabilidad para la ecuación de regresión

Tabla 4.9. Significancia de la regresión simple entre algunas variables meteorológicas y el área de lesión en ramas de variedades de cítricos inoculadas con *P. parasitica*.

Cultivares de cítricos y variables independientes	Análisis de regresión simple^Z		
	Pendiente	r²	Valor P
Fortune			
HR media máximas	-0,29470	0,358	0,0010
HR media mínimas	-0,22858	0,173	0,0307
T ^a media máximas	0,40913	0,429	0,0003
T ^a media mínimas	0,33041	0,325	0,0019
Hernandina			
HR media máximas	-0,53977	0,587	0,0000
HR media mínimas	-0,29043	0,136	0,0576
T ^a media máximas	0,99211	0,622	0,0000
T ^a media mínimas	0,64746	0,610	0,0000
Lane - Late			
HR media máximas	-0,31978	0,577	0,0000
HR media mínimas	-0,16568	0,124	0,0709
T ^a media máximas	0,42765	0,641	0,0000
T ^a media mínimas	0,36248	0,535	0,0000

^Z Valor de P, ANOVA, probabilidad para la ecuación de regresión (P<0,05); r², proporción de la variación explicada.

Tabla 4.10. Datos de regresión para la relación entre variables meteorológicas (x) y área de lesión (y) de ramas en variedades de cítricos inoculadas con *P. parasitica* en 27 meses de inoculaciones.

Cultivares de cítricos y modelo de regresión	Datos de la regresión lineal ^Z		
	a	b	r ²
<i>P. parasitica</i> ($y = bx^a$)			
Fortune	7,0208	1 ⁻⁹	0,709
Hernandina	6,1991	2 ⁻⁸	0,709
Lanelate	6,1135	2 ⁻⁸	0,734

^Z a, b, coeficientes de regresión; r², proporción de la variación explicada; Valor de P, ANOVA, probabilidad para la ecuación de regresión (P<0,05).

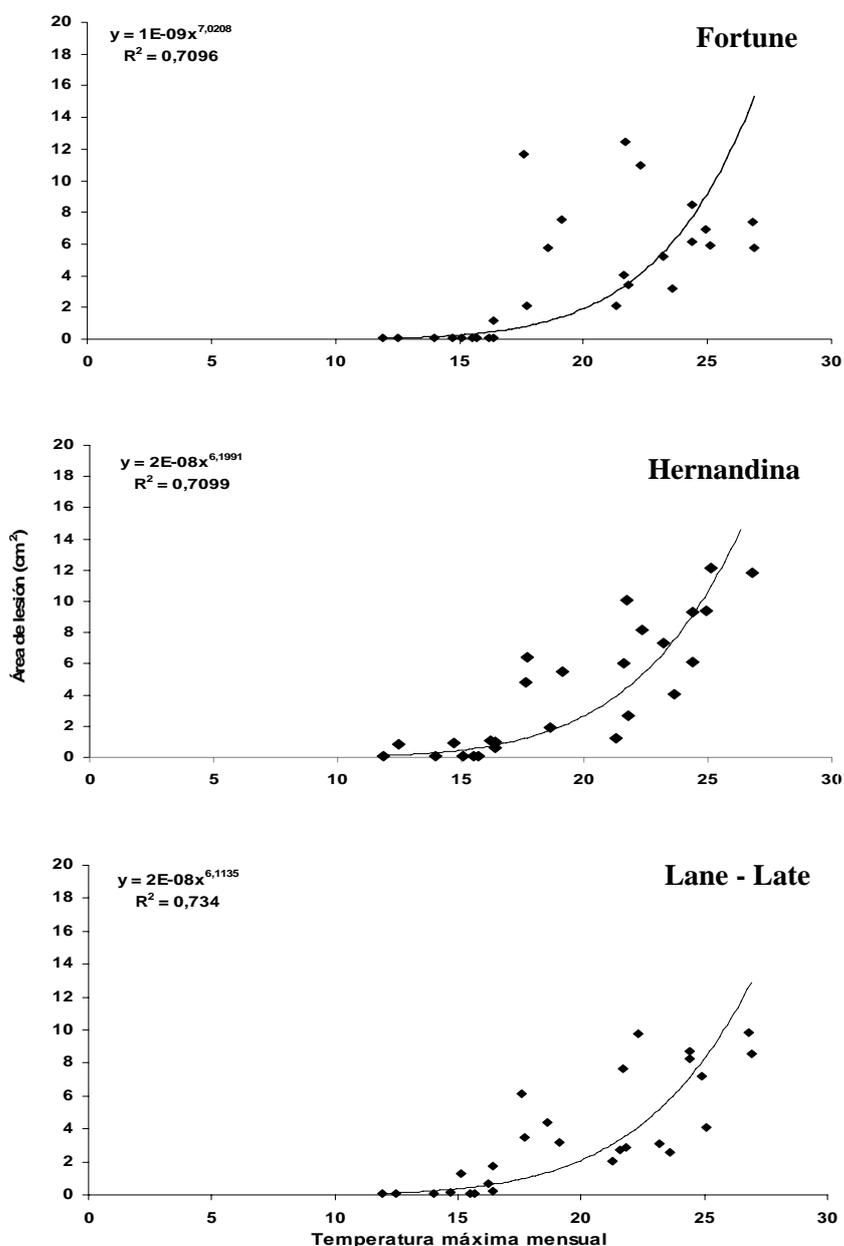


Figura 4.5. Relación entre la temperatura máxima mensual (°C) y el área promedio de área de lesión mensual (cm²) de tres cultivares de cítricos en 27 meses de inoculaciones con *P. parasitica*. Las ecuaciones corresponden a los ajustes de las regresiones con los valores de r² más altos.

4.3.3. Influencia de algunos componentes del hospedante en la susceptibilidad de los cítricos a *P. citrophthora* y *P. parasitica*.

Contenido relativo de agua en la corteza de cítricos

Los valores del contenido relativo de agua en la corteza (CRA) medido en los diversos cultivares de cítricos evaluados se representan en la **Tabla 4.11**. Los cultivares mostraron diversas oscilaciones en el % de CRA a lo largo del ensayo. El % promedio de CRA en la corteza de los cultivares Lane - Late y Hernandina fueron similares entre sí y éstos a su vez superiores al del cultivar Fortune a lo largo de todo el experimento. En Fortune, el CRA fluctuó entre 63,8 % (octubre de 2004) y 87,7 % (agosto de 2006), los valores más bajos en el CRA se registraron en los meses de otoño, y los más altos en los meses de verano de cada año. El CRA en Hernandina fluctuó entre valores de 67,6 % (septiembre de 2005) y 91,9 % (febrero de 2005); en este cultivar no se pudo establecer períodos concretos de alto o bajo contenido de CRA. En el cultivar Lane - Late el CRA fluctuó entre 76,3 % (septiembre de 2005) y 91,7 (noviembre de 2004) (**Figura 4.6**).

Correlación entre el CRA y las áreas de lesión de cultivares de cítricos en campo

Se encontró una correlación significativa ($P < 0,05$) entre el CRA y los promedios de área de lesión de los cultivares Fortune y Lane - Late inoculados tanto con *P. citrophthora* como con *P. parasitica*, pero no en el cultivar Hernandina cuando se analizó en conjunto los datos de los 27 meses de ensayo (**Tabla 4.12**). La correlación encontrada en los cultivares que resultaron significativos indica que los aumentos y disminuciones en el CRA se correspondieron con aumentos y disminuciones en las áreas de lesión de cada especie de *Phytophthora*. A pesar de esta correspondencia, los valores de r^2 obtenidos no fueron muy altos, siendo 48 % el r^2 máximo para *P. citrophthora* obtenido en el cultivar Lane-Late y 45 % para *P. parasitica* obtenido en Fortune. La transformación de datos no incrementó significativamente la cantidad de variabilidad explicada, ni tampoco el análisis de datos en períodos anuales (Datos no mostrados).

Cuando se realizó un ploteo de datos entre los valores del CRA y lesiones por *P. citrophthora* y el consecuente análisis de regresión en el período comprendido entre octubre a mayo de cada año, se obtuvo un aumento significativo en los valores de r^2 . Este aumento fue mayor cuando se analizaron los datos mediante relaciones curvilíneas (**Tabla 4.14**). El ajuste obtenidos mostró que la ecuación polinómica ($y = ax^2 + bx + c$) fue la más adecuada para describir la relación entre variables. El porcentaje de variación explicado en cada ecuación de regresión en los distintos cultivares estudiados varió de 16,9 a 89,8 % (**Tabla 4.14; Figura 4.7**). Para *P. parasitica* los mejores ajustes se lograron en períodos anuales entre octubre a septiembre de cada año, siendo la ecuación potencial ($y = bx^a$) la más adecuada para describir la relación entre variables. El porcentaje de variación explicado por los modelos de las ecuaciones en los distintos cultivares estudiados varió de 26,2 a 85,8 % (**Tabla 4.15; Figura 4.8**).

Correlación entre el CRA y las áreas de lesión de cultivares de cítricos en laboratorio

El análisis de regresión entre el CRA y los promedios de área de lesión en los cultivares de cítricos inoculados con *P. citrophthora* y *P. parasitica* en laboratorio, muestran que no hubo correlación entre las variables estudiadas (**Tabla 4.13**). Bajo condiciones controladas, los aumentos y disminuciones en el CRA de estos cultivares no se correspondieron con un mayor o menor desarrollo de las lesiones de ambas especies de *Phytophthora*.

Tabla 4.11. Valores promedios mensuales del contenido relativo de agua en cultivares de cítricos.

Meses	Contenido Relativo de Agua (CRA) %		
	Fortune	Hernandina	Lane-Late
Octubre 04	73,8	86,2	88,6
Noviembre 04	65,0	83,0	83,7
Diciembre 04	64,8	82,0	80,2
Enero 05	64,0	82,0	81,6
Febrero 05	74,4	81,9	83,9
Marzo 05	84,7	79,3	86,7
Abril 05	77,8	81,3	89,2
Mayo 05	77,9	81,6	91,2
Junio 05	80,3	82,4	87,7
Julio 05	71,1	79,5	84,4
Agosto 05	65,2	70,3	85,6
Septiembre 05	74,9	67,6	90,3
Octubre 05	72,2	74,6	88,7
Noviembre 05	67,6	76,6	83,1
Diciembre 05	65,2	71,1	81,1
Enero 06	64,1	73,7	80,3
Febrero 06	69,7	75,5	80,1
Marzo 06	72,5	80,6	80,8
Abril 06	79,6	87,6	82,4
Mayo 06	73,9	88,0	91,5
Junio 06	84,4	90,9	86,4
Julio 06	86,8	89,3	87,1
Agosto 06	77,7	90,0	84,1
Septiembre 06	74,7	86,1	80,2
Octubre 06	76,8	80,6	82,6
Noviembre 06	67,4	81,6	81,4
Diciembre 06	69,4	87,7	80,6
Promedio	73,18	81,15	84,57

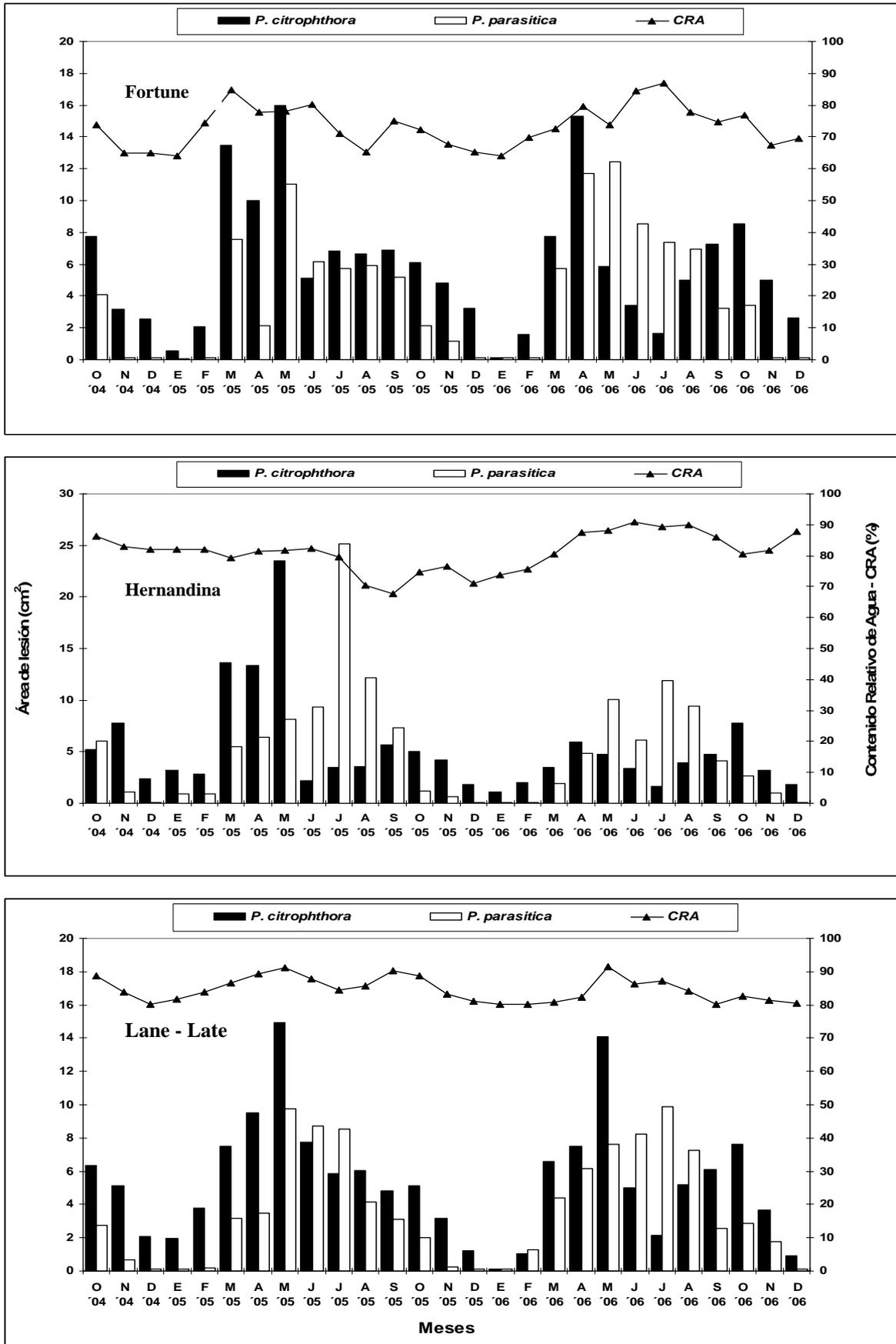


Figura 4.6. Fluctuación en los promedios del área de lesión de cultivares de cítricos inoculados con *P. citrophthora* y *P. parasitica* en campo, y su relación con el contenido relativo de agua de estos cultivares.

Tabla 4.12. Análisis de regresión simple del efecto del contenido relativo de agua (CRA) de los cultivares de cítricos en estudio y el área de lesión causadas por *P. citrophthora* y *P. parasitica* en campo en 27 meses de inoculaciones.

Factores de estudio y especie de <i>Phytophthora</i>	Datos de la regresión lineal ^z		
	Pendiente	r ²	Valor de P
<i>P. citrophthora</i>			
Fortune	0,288017	0,215	0,0148
Hernandina	0,009922	0,016	0,9494
Lane - Late	0,674714	0,479	0,0001
<i>P. parasitica</i>			
Fortune	0,397166	0,451	0,0001
Hernandina	0,114514	0,015	0,5325
Lane - Late	0,518361	0,324	0,0019

^z r², proporción de la variación explicada; Valor de P, ANOVA, probabilidad para la ecuación de regresión (P<0,05).

Tabla 4.13. Análisis de regresión simple del efecto del contenido relativo de agua (CRA) de los cultivares de cítricos en estudio y el área de lesión causadas por *P. citrophthora* y *P. parasitica* en laboratorio en 27 meses de inoculaciones.

Factores de estudio y especie de <i>Phytophthora</i>	Datos de la regresión lineal ^z		
	Pendiente	r ²	Valor de P
<i>P. citrophthora</i>			
Fortune	0,015878	0,015	0,5368
Hernandina	-0,012208	0,004	0,7473
Lane - Late	0,015082	0,023	0,8114
<i>P. parasitica</i>			
Fortune	0,022744	0,039	0,3173
Hernandina	0,056052	0,091	0,1263
Lane - Late	0,107488	0,085	0,1400

^z r², proporción de la variación explicada; Valor de P, ANOVA, probabilidad para la ecuación de regresión (P<0,05).

Tabla 4.14. Datos de regresión simple para la relación entre el contenido relativo de agua (x) y área de lesión (y) de ramas en variedades de cítricos inoculadas con *P. citrophthora* en los intervalos de octubre a mayo de 2004 a 2005 y de 2005 a 2006.

Cultivares de cítricos y modelo de regresión	Datos de regresión ^z							
	a		b		c		r ²	
	O'04 - M'05	O'05 - M'06	O'04 - M'05	O'05 - M'06	O'04 - M'05	O'05 - M'06	O'04 - M'05	O'05 - M'06
(y = ax ² + bx + c)								
Fortune	0,002	0,047	0,241	-5,910	-24,99	186,9	0,689	0,869
Hernandina	0,239	-0,005	-41,08	0,994	1770	-43,72	0,169	0,525
Lane - Late	0,090	0,061	-14,54	-9,780	584,6	388,60	0,898	0,608

^z a, b, c; coeficientes de regresión; r², proporción de la variación explicada.

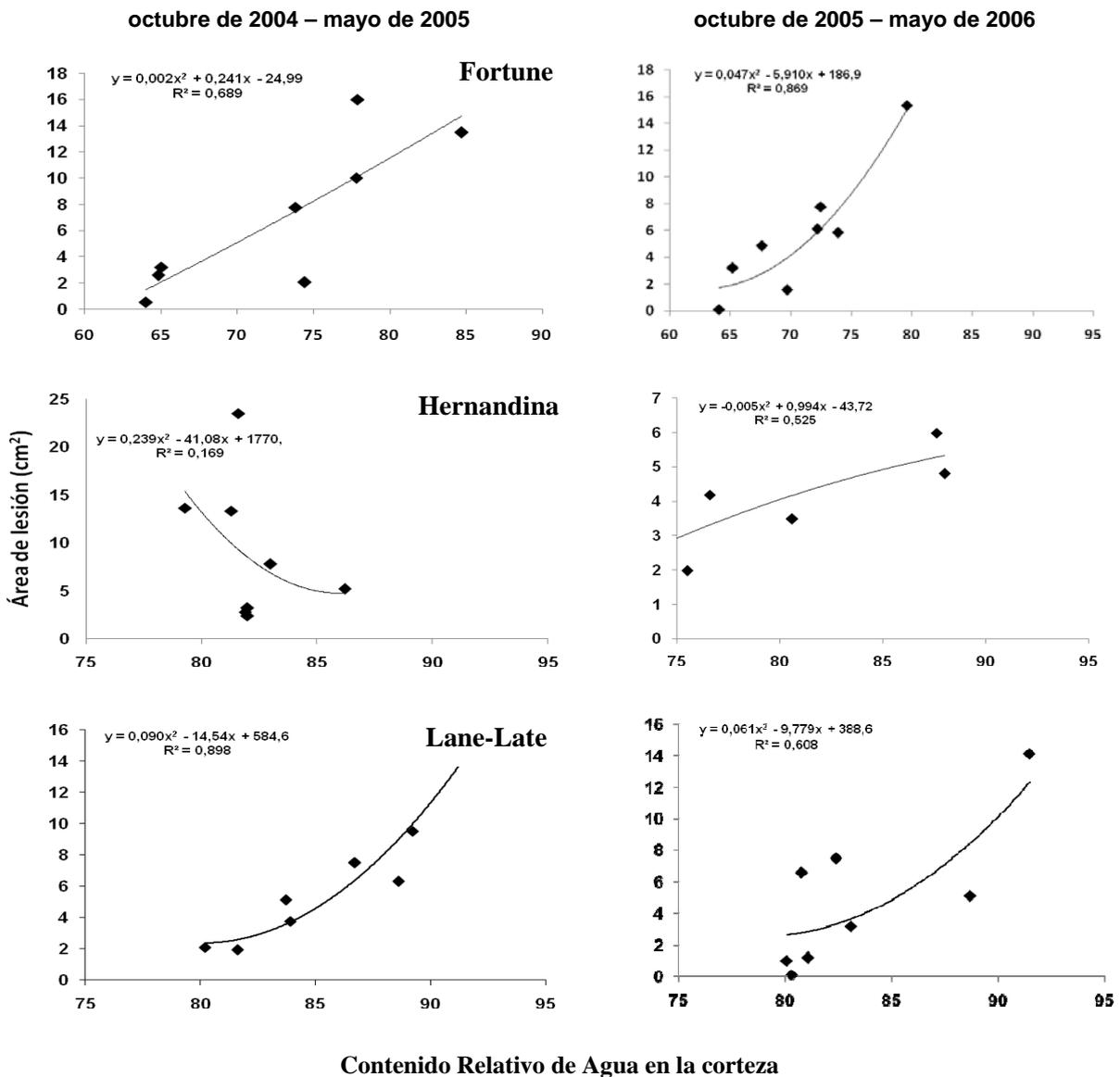


Figura 4.7. Relación entre el contenido relativo de agua (CRA - %) de la corteza de tres cultivares de cítricos y el área promedio de área de lesión mensual (cm²) en inoculaciones con *P. citrophthora*. Las ecuaciones corresponden a los ajustes de las regresiones con los valores de r² más altos.

Tabla 4.15. Datos de regresión para la relación entre el contenido relativo de agua (x) y el área de lesión (y) en ramas en variedades de cítricos inoculadas con *P. parasitica* en periodos anuales de octubre – septiembre.

Cultivares de cítricos y modelo de regresión	Datos de regresión ^Z					
	a		b		r ²	
	O'04 - S '05	O'05 - S '06	O'04 - S '05	O'05 - S '06	O'04 - S '05	O'05 - S '06
($y = bx^a$)						
Fortune	13,50	16,08	1 ⁻²⁵	2 ⁻³⁰	0,401	0,639
Hernandina	7,29	19,10	3 ¹⁴	5 ⁻³⁷	0,111	0,858
Lane - Late	33,96	19,80	3 ⁻⁶⁶	2 ⁻³⁸	0,621	0,262

^Z a, b, coeficientes de regresión; r², proporción de la variación explicada; Valor de P, ANOVA, probabilidad para la ecuación de regresión (P<0,05).

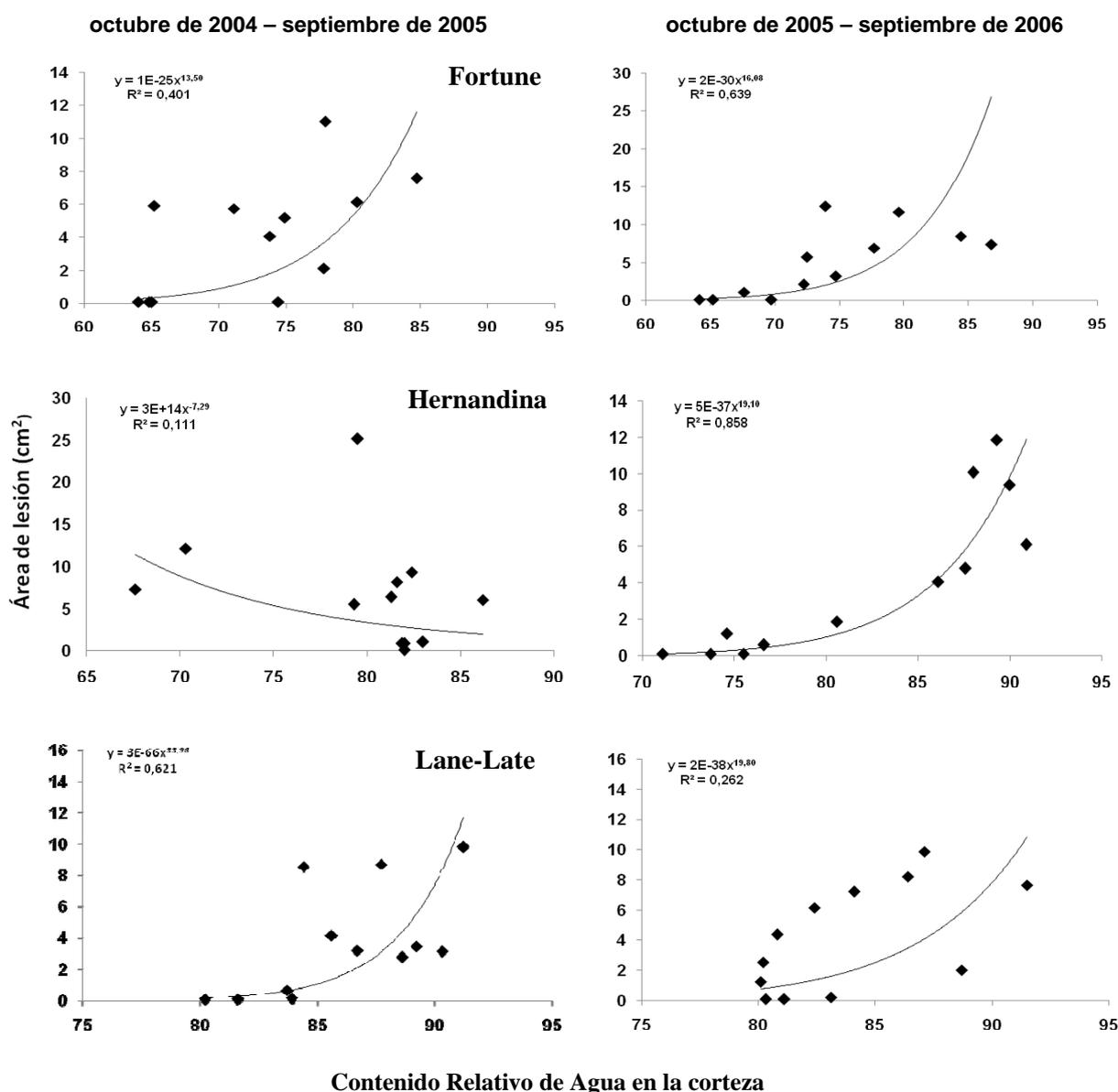


Figura 4.8. Relación entre el contenido relativo de agua (CRA - %) de la corteza de tres cultivares de cítricos y el área promedio de área de lesión mensual (cm²) en inoculaciones con *P. parasitica*. Las ecuaciones corresponden a los ajustes de las regresiones con los valores de r² más altos.

4.4. DISCUSIÓN

4.4.1. Fluctuación estacional de la susceptibilidad de los cítricos frente a especies de *Phytophthora*

Ensayo de campo

El desarrollo de lesiones en los cultivares Fortune, Hernandina y Lane – Late inoculados con *P. citrophthora* varió significativamente durante el estudio y presentó un modelo estacional de infecciones. Estas por lo general fueron más altas entre los meses de marzo a mayo y octubre de cada año, indicando que posibles aplicaciones de fungicidas para el control de infecciones por *P. citrophthora* tendrían que ser en éste período. En términos generales y dependiendo del cultivar de cítricos, los mayores promedios de área de lesión se produjeron durante los meses primaverales (marzo, abril y mayo), seguido de los otoñales (septiembre, octubre y noviembre), estivales (junio, julio y agosto) y, por último los invernales (diciembre, enero y febrero). En todos los cultivares estudiados se observó que las mayores áreas de lesión coincidieron con el período de brotación de los árboles, que comúnmente se producía entre abril y mayo de cada año.

Con *P. parasitica*, en todos los cultivares se detectaron lesiones principalmente desde la primavera al otoño (de abril a octubre), y dependiendo del cultivar estudiado y del año de inoculación, los valores de área de lesión más altos fueron desde mayo hasta agosto de cada año. Al margen de la estacionalidad en la infección por ambas especies de *Phytophthora*, *P. citrophthora* presentó mayor promedio de área lesión que *P. parasitica* durante todo el ensayo. Este resultado concuerda con lo observado en los capítulos anteriores que manifiestan la dominancia y la mayor importancia de *P. citrophthora* sobre *P. parasitica* en las áreas citrícolas españolas.

Tuset (2000) señala que la mayor actividad parasitaria de especies de *Phytophthora* se produce cuando la temperatura media del ambiente oscila entre los 18-24 °C, lo que sucede con normalidad durante los meses de septiembre, octubre, noviembre, abril, mayo y primeras semanas de junio. Erwin y Ribeiro (1996) manifiestan que en los climas mediterráneos, la especie *P. citrophthora* es activa durante el otoño, invierno y primavera, pero no durante el verano.

Aparentemente, las temperaturas suaves que se dan durante los meses primaverales favorecen el ataque de *P. citrophthora* produciéndose los mayores promedios de área de lesión en este período. El cálculo de la temperatura óptima para los aislados de *P. citrophthora* realizado en el capítulo 3, muestra que algunas cepas presentaron temperaturas óptimas alrededor de los 22,0 °C. Los datos de campo de este apartado indican que la temperatura media en la que se producen los mayores tamaños de lesión se encuentra alrededor de 17 °C en la estación primaveral, un aumento de las temperaturas de este óptimo no se corresponde con un aumento en el tamaño de lesión. En

este sentido, *P. citrophthora* puede actuar mejor a temperaturas relativamente más bajas y que son las que se presentan en los meses primaverales.

En regiones de clima mediterráneo, *P. citrophthora* puede aislarse de cítricos con mayor facilidad en épocas de temperatura suave y *P. parasitica* en verano (Magnano di San Lio *et al.*, 1988; Ippolito *et al.*, 1992; Erwin y Ribeiro, 1996). Esta estacionalidad probablemente esté relacionada al rango de temperaturas óptimas para el crecimiento de estas especies de *Phytophthora*. Para *P. citrophthora* se han registrado temperaturas cardinales de 6 - 32 °C, con un óptimo de 26 °C (Dirac *et al.*, 2003) y para *P. parasitica* una mínima de 8 °C, el óptimo entre 28 y 32 °C y una máxima de 35 °C (Erwin y Ribeiro, 1996).

Dirac *et al.* (2003), en un estudio sobre infección estacional de raíces de cítricos, indican que las infecciones por *P. parasitica* son más abundantes en verano, mientras que las infecciones por *P. citrophthora* lo son en invierno. Matheron *et al.* (1997) encontraron que *P. citrophthora* era pobremente aislada tanto de suelo como de raíces afectadas de árboles cítricos en los meses de verano. Sus estudios mostraron que en estos meses la densidad poblacional del patógeno presentaba valores muy bajos o nulos en comparación a otras estaciones del año. Ellos sugirieron que este fenómeno era consecuencia de las altas temperaturas del suelo que se registran durante este período, suficiente para inducir dormancia en propágulos de *P. citrophthora*. En contraste, Dirac y Menge (2002) indicaron que el bajo porcentaje de infección de raíces de cítricos por *P. citrophthora* durante el verano, al menos en parte, más que por la temperatura del suelo u otros factores abióticos, se debe a la fisiología de la planta o a los microorganismos del suelo asociados con las raíces de cítricos.

Los resultados obtenidos de nuestro estudio en cuanto a la estacionalidad de infecciones por *P. citrophthora* muestran que durante los meses de verano se registra una disminución considerable de los promedios de área de lesión en ramas, similar al patrón estacional descrito en infecciones de raíces. Sin embargo, evidentemente esta disminución en los valores de área de lesión en ramas no está influenciada por los microorganismos del suelo como se ha sugerido para infecciones de raíces, evidenciando la influencia de factores relacionados a la fisiología o componentes de la planta en la estacionalidad de las infecciones.

Todos los cultivares mostraron un patrón definido de infección a través de las diferentes estaciones con ambas especies de *Phytophthora*. Aunque el acumulado de área de lesión fue significativamente más grande para *P. citrophthora* que para *P. parasitica* en todos los cultivares estudiados, se encontró que el cultivar más susceptible a la infección por *P. citrophthora* fue Fortune y para *P. parasitica* el cultivar Hernandina. Posiblemente estas variaciones podrían explicarse por diferencias fisiológicas, bioquímicas y genéticas inherentes a cada cultivar de cítrico. De estos resultados también se puede concluir que clementinas (Hernandina) e híbridos de Clementina (Fortune), presentaron mayores promedios de infección por ambas especies de *Phytophthora* que las naranjas (Lane-Late).

Ensayos de laboratorio

Los ensayos de inoculación de varetas de cítricos en laboratorio se hicieron con la finalidad de obtener información sobre el uso de esta metodología para la evaluación de cultivares de cítricos frente a infecciones por especies de *Phytophthora*. Asimismo, para establecer las mejores fechas durante el año para realizar este tipo de ensayos y el grado de fiabilidad de la misma en comparación con lo obtenido en campo. Los resultados muestran que no hubo un patrón definido de infección durante el experimento y que en la mayoría de los casos los resultados no concordaban con los obtenidos en campo. Cultivares como Fortune que resultaron bastante afectados en campo por infecciones de ambas especies de *Phytophthora* fueron menos susceptibles a la infección *in vitro*. Por el contrario, Lane-Late que obtuvo los menores promedios acumulados de área de lesión *in vivo*, presentó aquí los mayores promedios acumulados de infección.

En tal sentido, esta metodología bajo nuestras condiciones no sería apropiada para evaluar cultivares de cítricos frente a especies de *Phytophthora* debido a que no muestra correlación con lo que sucede realmente en campo. Con la información obtenida tampoco se pudo valorar ni predecir la susceptibilidad estacional de las especies de *Phytophthora*. Para ambas especies, los valores más bajos de lesión se produjeron en los meses de marzo – mayo, épocas en las cuales se obtuvieron los mayores valores de área de lesión en los correspondientes ensayos en campo. No se encontró en forma definida ningún pico consistente de infección.

Matheron y Matejka (1989) en un estudio realizado durante 24 meses de inoculaciones con *P. citrophthora* y *P. parasitica* sobre estrías y varetas de cítricos en Arizona encontraron un patrón estacional de desarrollo de lesiones. Sus resultados mostraron que los promedios de lesión significativamente menores se obtuvieron en los meses de diciembre a febrero, no encontraron diferencias entre longitudes de lesión entre los períodos de marzo a mayo y de septiembre a noviembre, y el pico de infección más alto para ambas especies se encontró en los meses de verano, de junio a agosto. En contraposición, Browne y Mircetich (1996), en un estudio para establecer el efecto del mes de inoculación de especies de *Phytophthora* sobre árboles y varetas de manzano en California, encontraron que los resultados obtenidos en varetas no produjeron una predicción fiable de la susceptibilidad a la infección: las varetas fueron más susceptibles a una especie de *Phytophthora* en concreto que otra, obteniéndose en campo lo opuesto.

En nuestro ensayo, las diferencias tan significativas respecto a lo obtenido en campo podría deberse a cambios en la fisiología de los tejidos al producirse el corte de las varetas. Matheron y Matejka (1989) concluyeron que la resistencia a la colonización por *P. citrophthora* del tejido floemático extraído de árboles cítricos, podría ser alterado por cambios en la fisiología del tejido producido por la separación física desde la planta en crecimiento. Los resultados de nuestro estudio indicarían además que la temperatura no tendría una influencia directa en el desarrollo de las

lesiones, en tanto que ésta variable fue constante durante el experimento y aún así se registraron fluctuaciones en el desarrollo de lesiones en varetas.

Dirac *et al.* (2003), encontraron un resultado similar de fluctuación errática en los tamaños de lesión en función del tiempo en porciones de raíces cortadas inoculadas tanto con *P. citrophthora* como con *P. parasitica* bajo condiciones constantes de temperatura. Ellos sugirieron que la temperatura no debería ser considerada dentro de los factores medioambientales con influencia en el desarrollo de lesiones o infecciones en raíces. Esto sugiere que existen factores asociados al hospedante que podrían influir en la susceptibilidad estacional en las infecciones, como por ejemplo el papel de algunas fitoalexinas o cambios en los contenidos de carbohidratos en la planta. Browne y Mircetich (1995) indicaron que debido a las diferencias existentes entre las condiciones ambientales en ensayos en campo y laboratorio, las diferencias observadas en los resultados no pueden ser atribuidas a un factor en particular.

4.4.2. Influencia de los factores ambientales en la susceptibilidad de los cítricos a *P. citrophthora* y *P. parasitica*

P. citrophthora

Los resultados obtenidos en este ensayo indicaron que la humedad relativa y la temperatura fueron los únicos factores medioambientales asociados estrechamente a las infecciones de los cultivares de cítricos por ambas especies de *Phytophthora*. Sin embargo, con *P. citrophthora* no se encontró correlación entre el área de lesión de los tres cultivares de cítricos estudiados con ningún factor medioambiental cuando se analizaron los datos de los 27 meses de inoculaciones.

No obstante, se obtuvo una correlación significativa cuando se analizaron los datos de la temperatura y la HR entre los valores del área de lesión registradas otoño, invierno y primavera (septiembre a mayo) de cada año. Esto indicaría que la temperatura y la HR estarían estrechamente asociadas al desarrollo de las lesiones hasta antes de la entrada del verano, en donde un incremento de la temperatura y HR del aire en estos meses no se correlaciona con un crecimiento en las áreas de lesión en los hospedantes.

Los resultados mostraron que existe una alta correlación entre el promedio de área de lesión por *P. citrophthora* y la temperatura y HR media de las máximas mensuales. No hay antecedentes sobre la influencia de los promedios mensuales de la temperatura y la HR sobre la severidad de las infecciones por *Phytophthora* en cítricos. El estudio de Luque *et al.* (2002) mostró que hubo una correlación positiva entre el crecimiento de las lesiones y la temperatura media mínima en inoculaciones de *P. cinnamomi* en *Quercus suber*; sin embargo, no encontraron ninguna relación con los valores de la HR. Sánchez-Hernández *et al.* (2003) correlacionaron significativamente las temperaturas medias y mínimas en las semanas previas a la toma de muestra

con el % de aislamiento de *P. cinnamomi* a partir de suelo, sugiriendo que este patógeno se aísla con facilidad a temperaturas medias y mínimas elevadas.

La fluctuación estacional observada en las lesiones indica que la temperatura podría tener un papel importante en el desarrollo de las lesiones en períodos concretos; por tanto, un análisis de correlación podría no ser el método más adecuado para relacionar ambas variables. Temperaturas elevadas en los meses estivales no son proporcionales a un aumento en el promedio del área de lesión en infecciones con *P. citrophthora*; asimismo, temperaturas muy bajas durante los meses invernales no son proporcionales a valores de cero en el desarrollo de lesiones. El - Hamalawi y Menge (1995) argumentaron que cuando existe una débil correlación entre la temperatura media durante el año y el tamaño de la lesión, indica que los valores más bajos en el promedio del área de lesión no se deben a condiciones ambientales adversas para el desarrollo del patógeno, sino más bien a factores fisiológicos y nutricionales de la planta.

Dirac *et al.* (2003) sostienen que la fisiología o microbiología asociada con las raíces de los cítricos (secreción de fitoalexinas o los microorganismos de la rizosfera), al menos parcialmente, explican la estacionalidad de la infección en campo, y no el clima, la temperatura u otros factores abióticos. Browne y Mircetich (1995) citan que algunos factores específicos que gobiernan los cambios estacionales en la susceptibilidad a *Phytophthora* spp., permanecen desconocidos. Ambos autores sostienen que las actividades relacionadas con el crecimiento del hospedante podrían estar asociadas con los incrementos en la severidad de la enfermedad.

Los árboles cítricos pueden secretar una fitoalexina denominada escoparona (6,7 - dimetoxicumarina), que inhibe la infección de *P. citrophthora* durante el verano. Afek y Sztejnberg (1988) estudiaron la producción de escoparona por la corteza de los cítricos y la correspondiente resistencia a la gomosis causada por *P. citrophthora*. Esta fitoalexina se encuentra naturalmente a bajas concentraciones en la corteza de los árboles y en la piel de los frutos cítricos (Tatum y Berry, 1977; Afek y Sztejnberg, 1988), pero rápidamente incrementa sus concentraciones después de una inoculación con *P. citrophthora* (Afek *et al.*, 1986). Aritmo y Homma (1988) señalaron que los árboles cítricos producen gran cantidad de escoparona a 25 °C, pero a medida que la temperatura disminuye, los niveles de esta sustancia se reducen, alcanzando valores nulos a 10 ó 5 °C.

En este sentido, la escoparona no puede influir en el crecimiento de *P. citrophthora* durante los meses invernales debido a que las temperaturas del suelo y del aire en invierno son demasiado bajas para su producción, por lo que la infección de *P. citrophthora* no es inhibida durante este período (Dirac *et al.*, 2003). No obstante, los bajos promedios de área de lesión obtenidos en los meses de verano en árboles inoculados con *P. citrophthora* pueden deberse a la mayor producción de escoparona durante este periodo, donde las temperaturas medias podrían activar la producción de dicha fitoalexina. Afek y Sztejnberg (1993) manifiestan que entender cómo afectan las altas temperaturas a los mecanismos de resistencia presentes en los árboles cítricos, podría ayudar a explicar las variaciones estacionales en la susceptibilidad a *P. citrophthora*.

Este mismo fenómeno pudo haber influido en las áreas de lesión obtenidas en laboratorio con las varetas por la influencia de la fitoalexina escoparona citada anteriormente. Afek *et al.* (1986) sostienen que en ensayos *in vitro*, esta fitoalexina inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos al encontrarse en bajas concentraciones en la corteza de los árboles cítricos. Por tanto, existe la posibilidad que esta sustancia influya en el crecimiento del patógeno en las varetas inoculadas en laboratorio al ser la temperatura de incubación favorable para la producción de esta fitoalexina.

P. parasitica

Con esta especie, los resultados muestran que en todos los cultivares de cítricos los únicos factores ligados estrechamente a las infecciones fueron la humedad relativa media de las máximas y la temperatura media de las máximas.

Aparentemente, estos factores en conjunto explicarían la dinámica estacional de las infecciones por *P. parasitica*. El hecho de que la pluviometría no haya resultado un parámetro significativo en la regresión, está relacionado con que las mayores áreas de lesión producidas por esta especie se producen en épocas de verano, en donde se registran las menores descargas de lluvia del año.

Todos los cultivares de cítricos inoculados con *P. parasitica* se ajustaron a un modelo potencial para explicar la relación existente entre el área de lesión y la temperatura. El modelo potencial ha sido utilizado frecuentemente en patología vegetal para explicar la dispersión de patógenos (Fitt *et al.*, 1987; Mundt, 1995), o para describir los cambios estacionales de *Botryosphaeria stevensii* en alcornoque (Luque *et al.*, 2002).

4.4.3. Influencia de algunos componentes del hospedante en la susceptibilidad de los cítricos a *P. citrophthora* y *P. parasitica*.

Contenido relativo de agua en la corteza de cítricos

Para ambas especies de *Phytophthora* se encontró una correlación significativa entre el área de lesión y el contenido relativo de agua en los cultivares Fortune y Lane – Late. Las regresiones efectuadas entre el CRA y las lesiones desarrolladas en el cultivar Hernandina no fueron significativas cuando se relacionó el período total de inoculaciones. En los cultivares que resultaron significativos, a pesar de alguna aparente correspondencia, la relación entre las variables fue débil debido a que sólo pudieron explicar del 21 al 48 % de la variabilidad. Sin embargo, cuando se hicieron regresiones comprendidas entre el período de octubre a mayo de cada año con *P. citrophthora*, se encontró significación y un r^2 más alto en todos los cultivares, inclusive con el

cultivar Hernandina en donde previamente no se había encontrado correlación. Probablemente el riego de las parcelas o eventos de lluvia tengan influencia en el CRA de la corteza y haya influido en la variabilidad de datos del CRA para obtener r^2 más ajustados en las regresiones. No todos los cultivares de cítricos fueron influenciados por las mismas variables medioambientales o sus propios componentes estructurales en relación a la fluctuación estacional de las lesiones. Esto se deduce de la gran variabilidad encontrada en la significancia de las correlaciones entre el CRA y las lesiones de los cultivares de cítricos estudiados.

Otros investigadores han encontrado resultados similares a los aquí obtenidos entre el contenido relativo de agua y el tamaño de las lesiones causadas por *Phytophthora* spp. (Tippett *et al.*, 1987; Robin *et al.*, 1994; Browne y Mircetich, 1996). Bier (1964) sostiene que el contenido relativo de agua podría ser utilizado como un índice clínico para indicar el nivel de turgencia de las células y la actividad fisiológica de la corteza viva, lo cual podría también explicar la fluctuación en la susceptibilidad a *Phytophthora* spp.

Sin embargo, otros investigadores no encontraron correlación entre el contenido relativo de agua y el tamaño de las lesiones. Luque *et al.* (2002) encontraron que las lesiones causadas por *Phytophthora* spp. no estaban significativamente relacionadas con ningún cambio estacional en el contenido de agua. Argumentaron que la falta de relación entre el tamaño de la lesión y el contenido relativo de agua podría deberse a diferencias en cada hospedante, a las características del patógeno o a los detalles del procedimiento de inoculación.

Capítulo 5

**Dispersión de *Phytophthora* por vectores
invertebrados**

CAPÍTULO 5. DISPERSIÓN DE *Phytophthora* spp. POR VECTORES INVERTEBRADOS

5.1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las fuentes de inóculo y los mecanismos de dispersión de los patógenos es fundamental para el desarrollo de estrategias efectivas de control. Dentro del género *Phytophthora*, los mecanismos de dispersión de la mayoría de las especies están cercana o directamente relacionados con el movimiento del agua.

Los mecanismos de dispersión de especies tales como *P. sojae*, *P. parasitica*, *P. cinnamomi* y *P. capsici* están relacionadas con el movimiento del inóculo a las raíces y de las raíces al inóculo dentro del suelo, y a través de la diseminación del inóculo en superficie por el agua (Reynolds *et al.*, 1986; Shew, 1987; Ristaino *et al.*, 1993; Workneh *et al.*, 1998).

Especies como *P. cactorum*, *P. palmivora* y *P. syringae* se diseminan desde el suelo a las hojas, tallos y frutos del hospedante mediante salpicaduras de agua (Madden *et al.*, 1992; Erwin y Ribeiro, 1996). Mediante este mismo mecanismo, *P. citrophthora* y *P. parasítica* pueden afectar a frutos de cítricos cuando éstos se encuentran cerca del suelo (Graham *et al.*, 1998). La especie *P. infestans* tiene la capacidad de diseminarse a través del aire después de haber esporulado sobre las lesiones en hojas de plantas de patata y tomate (Zwankhuizen *et al.*, 1998). Otras muchas especies de *Phytophthora* como *P. ramorum* o *P. palmivora* son diseminadas por humanos incluyendo el movimiento del suelo, o por la actividad de invertebrados (Davidson *et al.*, 2002; Konam y Guest, 2004).

Los insectos y otros invertebrados no han sido usualmente contemplados como vectores de *Phytophthora*; sin embargo, un amplio número de ellos tales como las moscas del género *Sciara* (Murphy y McKay, 1927), *Drosophila* (Hunter y Buddenhagen, 1969), el escarabajo *Scyphophorus interstitialis* Gyll. y hormigas (Peregrine, 1969; Turner, 1972; Newhook y Jackson, 1977; Taylor y Griffin, 1981; McGregor y Moxon, 1985) han sido citados por su asociación en el transporte de propágulos de *Phytophthora*. Por el contrario, los caracoles han sido raramente citados como vectores de este patógeno (Turner, 1964; Kueh y Khew, 1982; El-Hamalawi y Menge, 1996).

Hormigas y caracoles son comunes en los campos de cítricos y se desconoce su relevancia en la diseminación de propágulos de *Phytophthora* bajo estas condiciones. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio es estudiar el papel que pudieran desempeñar estos organismos en el transporte y dispersión de inóculo de especies *Phytophthora* desde el suelo hacia la parte aérea de los árboles.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Prospección de parcelas

El ensayo se llevó a cabo en 15 parcelas comerciales de mandarinas clementinas de los cultivares Hernandina, Arrufatina y Clemenules, e híbridos de clementina de la variedad Fortune, ubicadas en la provincia de Valencia. Todas las parcelas estaban afectadas severamente por el síndrome de chancro en ramas ocasionado por *P. citrophthora*.

A intervalos semanales en primavera (abril - mayo) y otoño (septiembre – noviembre) de 2005, se procedió a la captura de caracoles y de hormigas en las citadas parcelas (**Tabla 5.1**).

Los caracoles se capturaron cogiéndolos con pinzas a partir de la superficie del tronco (**Figura 5.1.a**), de las zonas de inserción de las ramas (**Figura 5.1.b**) y de las ramas primarias y secundarias de cada árbol (**Figura 5.1.c**). Simultáneamente a la colecta de caracoles, se procedió a la captura de hormigas de la superficie del tronco, de las zonas de la copa del árbol y de hormigueros cercanos a árboles; para ello se utilizó un aspirador atrapa insectos y pinceles.

Todas las parcelas en estudio eran regadas mediante riego por goteo.

Tabla 5.1. Parcelas visitadas para la colección de caracoles y hormigas. Primavera – otoño, 2005

Parcela	Localización	Variedad	Patrón	Edad (años)	Número de organismos colectados		
					<i>H. aspersa</i>	<i>R. decollata</i>	Hormigas
1	Montesa	Fortune	Citrango Troyer	5	14	7	15
2	Montesa	Clemenules	Citrango Troyer	8	14	11	17
3	Canals	Fortune	Citrango Carrizo	6	13	8	20
4	Tabernes Val.	Hernandina	Naranja amargo	9	14	3	14
5	Montserrat	Clemenules	Citrango Carrizo	7	14	12	21
6	Montserrat	Fortune	Citrango Carrizo	7	13	9	15
7	Montserrat	Arrufatina	Citrango Carrizo	5	21	4	19
8	Guadassuar	Fortune	Citrango Carrizo	8	11	8	14
9	Pedreguer	Hernandina	Volkameriana	4	16	6	18
10	Ribaroja	Clemenules	Citrumelo	6	12	8	16
11	Ribaroja	Fortune	Citrango Carrizo	5	15	9	15
12	Ribaroja	Clemenules	Citrango Carrizo	6	11	7	16
13	Betera	Hernandina	Naranja amargo	7	12	5	13
14	LLiria	Arrufatina	Citrango Carrizo	4	16	7	17
15	Picassent	Hernandina	Citrumelo	8	24	11	23

5.2.2. Influencia de las hormigas en el transporte de inóculo de *P. citrophthora*

Una vez en laboratorio las hormigas capturadas se sembraron en número de 5 sobre medio selectivo PARBPH. Las placas se incubaron en estufa a 24 °C en oscuridad durante 72 horas, y de las colonias desarrolladas en este medio se extrajeron puntas de crecimiento hifal las cuales se transfirieron a medio de cultivo PDA para su identificación.



Figura 5.1. Colección de caracoles de parcelas de cítricos

5.2.3. Influencia de los caracoles en el transporte de inóculo de *P. citrophthora*

a. Ensayos de campo

Transporte de inóculo sobre el cuerpo del caracol

Una vez en laboratorio, se extrajo el cuerpo del caracol de la concha mediante pinzas estériles y se diseccionó en cinco porciones aproximadamente del mismo tamaño. Porciones de la concha y el cuerpo se sembraron en medio selectivo PARBPH. Las placas se incubaron en estufa a 24 °C en oscuridad durante 72 horas y de las colonias desarrolladas se extrajeron puntas de crecimiento hifal, las cuales se transfirieron a medio de cultivo PDA. La identificación de los aislados se realizó sobre la base de sus características morfológicas y fisiológicas cuyos procedimientos se describieron en los capítulos 2 y 3.

Influencia de las heces de caracol en la diseminación del inóculo

Al momento de la captura de los caracoles, se realizó también la colecta de sus excrementos de las mismas zonas de captura de los individuos en el árbol. Una vez en laboratorio, las heces frescas colectadas se sembraron directamente en medio de cultivo PARBPH, incubándose en estufa a 24 °C por 72 horas.

b. Ensayos bajo condiciones controladas

Transmisión de *P. citrophthora* por las heces de caracol

Se utilizaron varetas de cítricos de la variedad Hernandina de 25 cm de largo por aproximadamente 2,0 cm de diámetro. Las varetas se inocularon con un aislado de *P. citrophthora* (Phy 033), originalmente aislado de chancros en ramas de árboles cítricos, siguiendo la metodología de inoculación descrita en el capítulo 4 (Apartado 4.2.5). Las varetas inoculadas se colocaron en cajas de plástico de 30 x 15 x 10 cm, y se incubaron en estufa a 24 °C. Se utilizó un total de 6 cajas con 10 varetas en su interior cada una. El contenido de las cuatro cajas se inoculó con discos de agar con el patógeno y las dos restantes con agar estéril para ser posteriormente utilizadas como controles.

Después que desarrollaron las lesiones sobre las varetas inoculadas (a los 6 días de incubación) a cada vareta se le eliminó las partes sanas dejando sólo las porciones infectadas. Veinticinco ejemplares del caracol marrón europeo *Helix* (= *Cyptoomphalus*) *aspersa* Müller (**Figura 5.2.a**) entre jóvenes y adultos, se colocaron en el interior de cada caja, dos cajas conteniendo varetas inoculadas por el patógeno y una con varetas testigo. En las cajas restantes, se liberaron en igual número caracoles de la especie *Rumina decollata* L. (**Figura 5.2.b**). Los caracoles de ambas especies se habían recolectado de parcelas de viña, y previo a su liberación sobre el material vegetal se les había mantenido en ayuno por espacio de 10 días.

Después de un tiempo prudencial para que los caracoles de ambas especies se alimentaran sobre los respectivos tratamientos (aproximadamente 4 - 5 horas), éstos se colectaron, se sumergieron dos veces en agua destilada estéril, se secaron en papel de filtro y se colocaron en placas Petri de vidrio estéril para la colección de heces. Las heces frescas colectadas se sembraron en medio de cultivo PARBPH, incubándose en estufa a 24 °C por 72 horas.

Influencia de los caracoles en el transporte de inóculo de especies de *Phytophthora* desde el suelo hacia la parte aérea de plántones de cítricos en invernadero

Condiciones del experimento

Como inóculo se utilizó el aislado de *P. citrophthora* Phy 033, y un aislado de *P. palmivora*, Phy 207, aislado a partir del cuerpo de un caracol. Caracoles de la especie *H. aspersa* se colectaron de campos de cítricos y se mantuvieron en crianza separada por espacio de 3 semanas alimentándoseles con hojas tiernas de vid. Diez días antes de su liberación sobre los plántones de cítricos en invernadero, se les mantuvo en ayuno. Como material vegetal se utilizaron plántones de cítricos de aproximadamente 1,20 m de altura y 4 años de edad contenidos en macetas, de los cultivares Clemenules, Nova y Fortune injertados sobre citrange Carrizo.

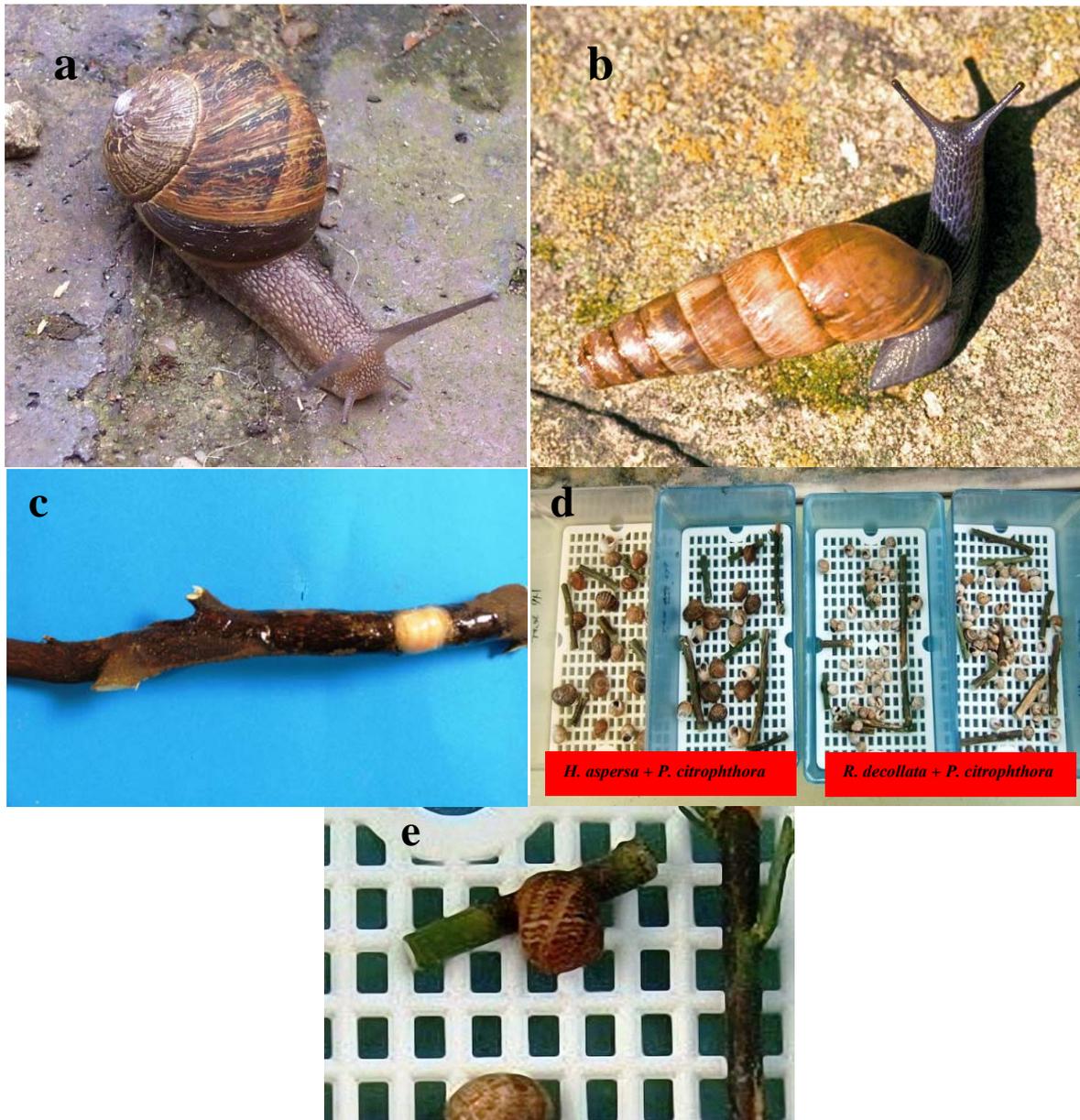


Figura 5.2. Especies de caracoles colectadas y proceso de infección de varetas de cítricos. a. *H. aspersa*; b. *R. decollata*; c. Varetas infectadas con *P. citrophthora*; d. Tratamientos entre especies de caracoles y e). Caracol *H. aspersa* alimentándose de ramas infectadas con *P. citrophthora*.

Preparación del sustrato a inocular

Alrededor de 2 kg de un sustrato que contuvo una mezcla de 75% de turba y 25 % de arena (vol/vol.), se esterilizó en autoclave 2 veces. El sustrato esterilizado y enfriado se distribuyó en una bandeja de plástico de 50 x 35 x 15 cm, y se inoculó incorporando uniformemente sobre la bandeja 250 g de un sustrato de avena y jugo V8 colonizado por *Phytophthora*. Una vez incorporado el sustrato se inundó la bandeja con agua estéril y se mantuvo de esta manera por espacio de tres días a una temperatura de 24 °C. Por cada especie de *Phytophthora* se utilizó una bandeja de infestación.

Establecimiento del experimento

Al cuarto día desde la incorporación del inóculo de *Phytophthora* al sustrato en las bandejas, se colocó en cada una de ellas alrededor de 100 caracoles. Las bandejas se taparon por espacio de 24 horas para confinarlos y favorecer el contacto con el sustrato infestado.

Una semana antes de comenzar el experimento, los árboles de cítricos de las diferentes variedades se mantuvieron sin regar en invernadero a una temperatura de 24 °C. En total se utilizaron 4 plantas de cada cultivar por especie de *Phytophthora*. Todas las plantas se regaron un día antes de la liberación de los caracoles con la finalidad de provocar la formación de micro heridas sobre el tronco y ramas de los árboles por efecto de la turgencia de las células.

Liberación de los caracoles

A las 24 horas de confinamiento, casi la totalidad de los caracoles se encontraban inmersos en el sustrato de la bandeja. Con la finalidad de ponerlos activos, se roció toda la bandeja con agua mediante una regadera. Una vez que los caracoles se pusieron en movimiento, y/o salieron del sustrato, se les capturó mediante una pinza estéril y se puso un total de 10 de ellos sobre la base del tronco de cada plantón de cítrico de los diferentes cultivares. Un plantón se consideró positivo en la liberación de los caracoles cuando los diez caracoles liberados subieron por el tronco. Este procedimiento se realizó para ambas especies de *Phytophthora*. Después del segundo día de la liberación de los caracoles, en intervalos diarios y dos veces al día se regó el follaje y las bancadas de las macetas. Durante el experimento, el compartimento del invernadero en el cual se condujo el ensayo estuvo a 24 ± 2 °C y con 95 - 100 % de humedad relativa.

Evaluación

Se realizó 10 días después de la liberación de los caracoles y se hizo en función de las lesiones desarrolladas sobre cada árbol que se tradujeron en oscurecimiento de la corteza, vestigios de exudación de gomas y/o formación de chancros.

Las lesiones desarrolladas sobre cada árbol se subdividieron en: desarrolladas en el tercio inferior (base del tronco sin considerar el patrón), tercio medio (desde la mitad de la longitud del tronco hasta antes de la bifurcación de las ramas), y tercio superior (ramas primarias y secundarias). Porciones de tejido afectado de las lesiones desarrolladas se sembraron en medio PARBPH para corroborar la identidad de la especie de *Phytophthora*.

Este experimento se realizó dos veces en forma consecutiva, el primer ensayo se llevó a cabo en los meses de mayo - junio de 2006 y el segundo en los meses agosto - septiembre 2006.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Influencia de las hormigas en el transporte de inóculo de *P. citrophthora*

Las hormigas capturadas fueron de la especie *Lasius grandis* Forel. Durante el período de ensayo se colectaron alrededor de 250 hormigas, de las cuales en 8 de ellas (3,2 %) (Tabla 5.2) se aislaron oomicetos en el medio selectivo PARBPH (Figura 5.3.). Todas estas colonias se identificaron posteriormente como aislados de *Pythium* spp.

Tabla 5.2. Parcelas de cítricos de las cuales se aislaron especies de oomicetos a partir de caracoles y hormigas.

Parcela	Localización	Número de oomicetos aislados					
		<i>H. aspersa</i>		<i>R. decollata</i>		Hormigas	
		<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>
1	Montesa	0 ^Y	0 ^Z	0	0	0	0
2	Montesa	1	0	0	0	0	0
3	Canals	0	0	0	0	2	0
4	Tabernes Val.	2	1	0	0	0	0
5	Montserrat	2	2	2	0	2	0
6	Montserrat	5	3	1	1	0	0
7	Montserrat	2	0	3	2	0	0
8	Guadassuar	2	0	0	0	0	0
9	Pedreguer	3	1	1	0	3	0
10	Ribaroja	0	0	0	0	0	0
11	Ribaroja	1	0	2	1	0	0
12	Ribaroja	0	0	0	0	0	0
13	Betera	0	1	0	0	0	0
14	Lliria	4	0	0	0	0	0
15	Picassent	2	2	2	0	1	0

^YOomicetos aislados a partir del cuerpo del caracol.
^ZOomicetos aislados de los excrementos del caracol.



Figura 5.3. Aislamiento de *Pythium* spp. a partir del cuerpo de las hormigas en medio selectivo PARBPH.

5.3.2. Influencia de los caracoles en el transporte de inóculo de *P. citrophthora*

a. Ensayos de campo

Transporte de inóculo sobre el cuerpo del caracol

En las diferentes épocas de muestreo y estaciones, se colectaron un total de 335 caracoles de las 15 parcelas en estudio, 220 ejemplares pertenecieron a la especie *H. aspersa*, y 115 a la especie *R. decollata* (**Tabla 5.1**). Del total de caracoles de la especie *H. aspersa*, en 35 de ellos (15,91%) se aislaron oomicetos en medio selectivo PARBPH (**Tabla 5.2; Figura 5.4.a**). De la especie *R. decollata* no se llegó a aislar oomicetos. Las especies identificadas pertenecían a los géneros *Pythium* (24 aislados) y *Phytophthora* (11 aislados) (**Figura 5.4.b**).

El estudio de las características morfológicas, fisiológicas y moleculares de los aislados obtenidos permitieron identificar a las especies de *Phytophthora* como *P. citrophthora* (10 aislados y *P. palmivora* (1 aislado). Este último aislado se utilizó posteriormente en las pruebas de infestación de caracoles.

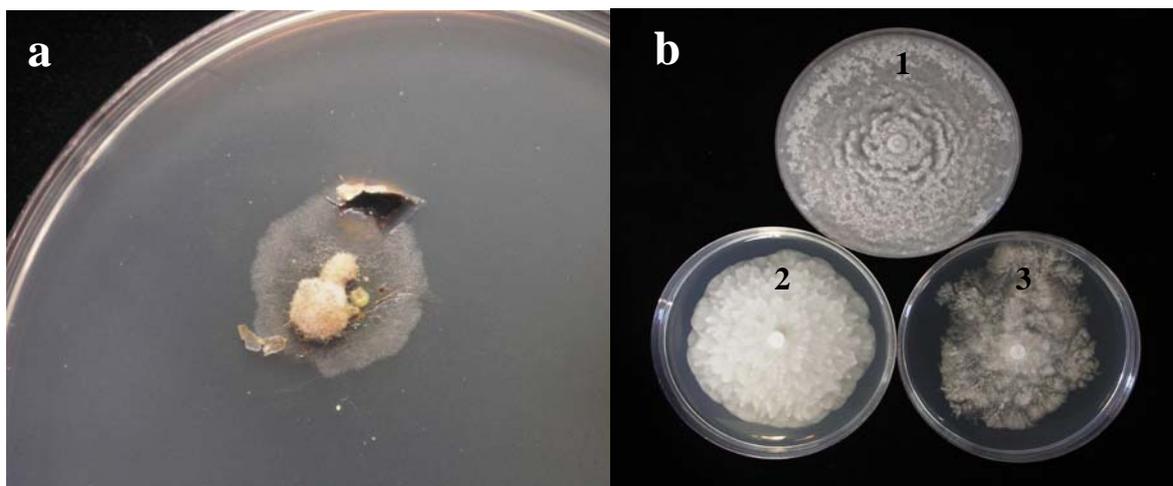


Figura 5.4. Aislamiento de oomicetos del cuerpo de los caracoles. a. Desarrollo de colonias a partir de porciones del cuerpo del caracol en medio selectivo PARBPH. **b.** Patrón de crecimiento de las colonias aisladas en medio PDA. **1.** *Pythium* sp, **2.** *P. citrophthora*, **3.** *P. palmivora*.

Influencia de las heces de caracol en la diseminación del inóculo

Durante el período de recogida de caracoles en campo, se colectó alrededor de 50 porciones de excrementos de caracol a partir de las cuales se aislaron 14 cepas de oomicetos. Diez de ellas se identificaron como *Pythium* spp. y cuatro de ellas como *P. citrophthora* (**Tabla 5.2**).

b. Ensayos bajo condiciones controladas

Transmisión de *P. citrophthora* por las heces de caracol

1. *Helix aspersa*

De caracoles de esta especie se recuperaron un total de 67 porciones de excremento de las dos bandejas en estudio. La siembra de los excrementos en medio selectivo dio como resultado que a partir de 53 de ellos (79,1 %) se desarrollaron colonias (**Figura 5.5**). Las colonias desarrolladas se repicaron a medio PDA y se confirmó el re-aislamiento de *P. citrophthora* mediante la observación del patrón de crecimiento y características asexuales de los aislados.



Figura 5.5. Colonias de *P. citrophthora* desarrolladas a partir de excrementos de caracol en medio PARBPH.

2. *Rumina decollata*

De esta especie de caracol solamente pudo recuperarse 8 porciones de excremento de ambas cajas aún después de un prolongado tiempo de espera. Ninguno de los excrementos sembrados en medio selectivo desarrolló colonias de *Phytophthora*.

Influencia de los caracoles en el transporte de inóculo de especies de *Phytophthora* desde el suelo hacia la parte aérea de plantones de cítricos en invernadero.

Se detectaron diferencias de incidencia de infecciones tanto a nivel de cultivares como de la época en que se realizó el ensayo con las especies de *Phytophthora* estudiadas. En términos generales, los síntomas observados en todas las variedades ensayadas fueron gomosis (**Figura 5.6.a**), o ennegrecimiento y ruptura de la corteza (**Figura 5.6.b**). Cada una de las manifestaciones de estos síntomas se atribuyó como un punto de infección. A partir de estos puntos de infección pudo reaislarse las respectivas especies de *Phytophthora* en estudio.

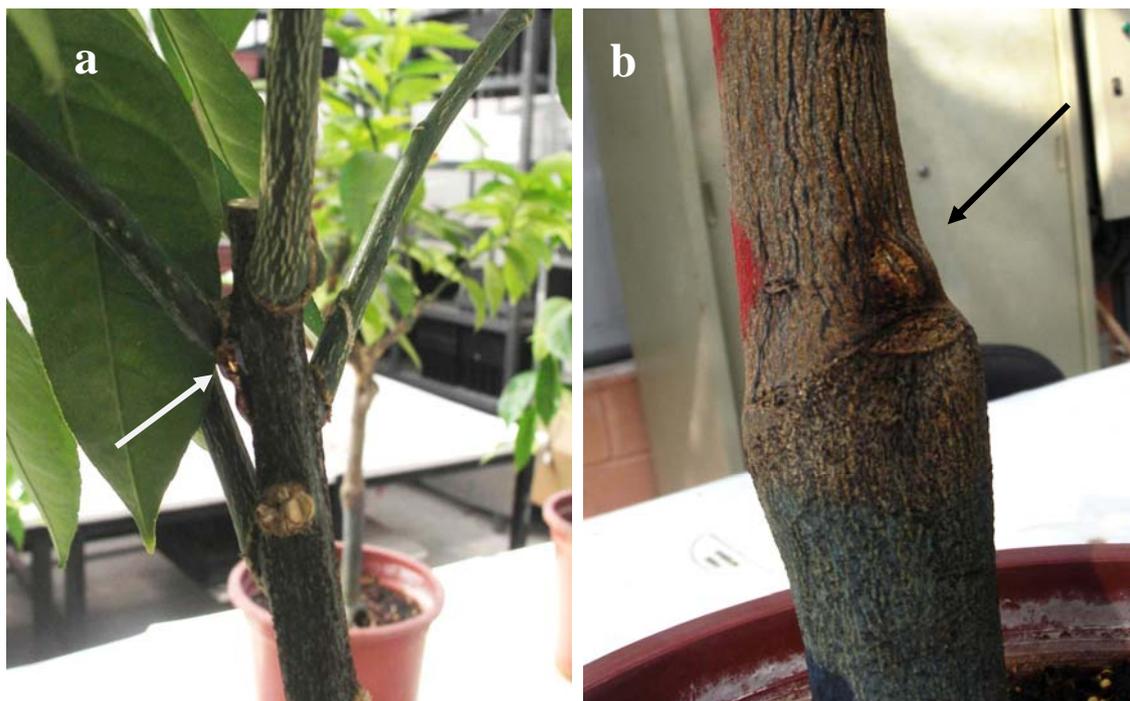


Figura 5.6. Manifestación de síntomas de infección por *P. citrophthora* transportada por caracoles en plantas de mandarina Fortune. En flechas. **a).** Exudación de gomas, **b).** Ennegrecimiento y ruptura de la corteza.

1. *P. citrophthora*

El cultivar Fortune mostró mayor número de lesiones que los otros cultivares en los dos experimentos (**Tabla 5.3**). En el primer ensayo (mayo – junio) se encontró en este cultivar alrededor del 69 % (20/29) de puntos de infección de todo el experimento. En el segundo ensayo (agosto – septiembre), el número de puntos de infección fue menor al ensayo anterior, pero con una incidencia claramente mayor también en este cultivar (10/13, 76,9). En la sub división de los puntos de infección por árbol, en el primer ensayo se estimó que 4 de ellos (20 %) se centraron en el tercio inferior de los árboles; 10 (50 %) se produjeron en el tercio medio y, las 6 restantes (30 %) se produjeron en el tercio superior (**Figura 5.7**). Los resultados del segundo ensayo confirmaron que el tercio medio fue la zona más común de infección, observándose 5 puntos de infección (50 %), el tercio inferior con 3 puntos de infección (30 %), y el tercio superior con 2 puntos de infección (20 %).

En el cultivar Clemenules, se observó que en ambos experimentos sólo el 50 % de los árboles resultaron infectados (**Tabla 5.3**). En el primer experimento se encontró 20,7 % (6/29) de las infecciones, y en el segundo experimento 23,1 % de los puntos de infección del ensayo. Los puntos de infección más habituales fueron en el tercio medio con 3 (50 %), seguido del tercio superior con 2 (33,3) y por último el tercio inferior con 1 punto de infección (16,7 %). En el segundo experimento sólo se encontraron tres puntos de infección en el tercio medio.

Tabla 5.3. Incidencia de lesiones ocasionadas por *P. citrophthora* en el ensayo de liberación de caracoles sobre diversos cultivares de cítricos.

Cultivar	Número de lesiones desarrolladas por árbol												Total
	Árbol 1			Árbol 2			Árbol 3			Árbol 4			
	TI	TM	TS	TI	TM	TS	TI	TM	TS	TI	TM	TS	
Primer ensayo (mayo - junio 2006)													
Clemenules	1	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	6
Fortune	2	1	3	0	3	1	0	2	1	2	4	1	20
Nova	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3
Total	4	2	3	2	5	1	0	4	3	2	4	1	29
Segundo ensayo (agosto - septiembre 2006)													
Clemenules	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3
Fortune	0	0	0	2	0	0	1	2	0	0	3	2	10
Nova	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	2	0	2	1	0	1	2	0	0	3	2	13

TI, TM, TS: Tercio inferior, medio y superior.



Figura 5.7. Lesiones en ramas y gomosis ocasionada por *P. citrophthora* en el tercio superior de árboles de la variedad Fortune en ensayos en invernadero con caracoles.

Árboles del cultivar Nova en el primer ensayo presentaron igualmente el 50 % de los árboles infectados. En este cultivar se produjeron el 10,3 % de las infecciones encontradas en el experimento (**Tabla 5.3**). En el tercio medio se detectaron 2 puntos de infección, y en el tercio inferior 1 punto de infección. No se encontraron puntos de infección en el tercio superior. En el segundo ensayo, con este cultivar no se encontró ningún árbol infectado (**Tabla 5.3**). *P. citrophthora* se reaisló de todos los puntos de infección.

2. *P. palmivora*

Ensayos de liberación de caracoles infestados con *P. palmivora* resultaron en un bajo porcentaje de incidencia de infección en cultivares de cítricos en los dos ensayos realizados (**Tabla 5.4**). Solamente se detectaron dos puntos de infección en el primer ensayo, uno en el cultivar Clemenules y el otro en el cultivar Fortune, ambos observados en el tercio inferior de la planta. En el segundo ensayo no se detectó infección en ningún cultivar.

Tabla 5.4. Incidencia de lesiones ocasionadas por *P. palmivora* en el ensayo de liberación de caracoles sobre diversos cultivares de cítricos.

Cultivar	Número de lesiones desarrolladas por árbol												Total
	Árbol 1			Árbol 2			Árbol 3			Árbol 4			
	TI	TM	TS	TI	TM	TS	TI	TM	TS	TI	TM	TS	
Primer ensayo (mayo - junio 2006)													
Clemenules	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Fortune	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nova	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Segundo ensayo (agosto - septiembre 2006)													
Clemenules	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fortune	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nova	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

5.4. DISCUSIÓN

5.4.1. Influencia de los caracoles en el transporte de inóculo de *P. citrophthora* en condiciones naturales

En los experimentos llevados a cabo para determinar el papel que ejercen los caracoles en el transporte de inóculo desde el suelo hacia los árboles, se ha constatado que sólo la especie *H. aspersa* tiene la capacidad de transportar propágulos tanto de *Phytophthora* como de *Pythium*.

En campos de cítricos y otros cultivos, con temperaturas suaves y lluvias en primavera y otoño, el caracol encuentra condiciones ideales para su proliferación, pudiendo ascender por el arbolado y provocar daños en la parte aérea (Melero, 2004). Este aumento en la población de caracoles sobre la copa del árbol en primavera y otoño coincide con las épocas del año en que los ataques de *P. citrophthora* son mayores.

Phytophthora spp. son endémicos en los cítricos a nivel mundial y se mantienen en el suelo esperando condiciones ambientales favorables (alto grado de humedad y temperatura) para iniciar su actividad (Erwin y Ribeiro, 1996; Timmer y Menge, 2002). Los caracoles adultos de la especie *H. aspersa* realizan su puesta en el suelo, enterrando los huevos. Del huevo sale un individuo que elige una planta hospedante y asciende por ella, alimentándose y desarrollándose. Posteriormente bajan al suelo para hacer la puesta. Los caracoles necesitan humedad para mantenerse activos; si no encuentran condiciones favorables de humedad, pueden quedar aletargados hasta que éstas aparezcan. Los puntos de riego por goteo suelen ser un centro de atracción y concentración de poblaciones, pudiendo pasar de aquí al arbolado.

Coincidentemente, *P. citrophthora* que es una especie habituada a climas mediterráneos, con climas suaves y precipitaciones en primavera, despliega su actividad en estas épocas del año. Por tanto, estas coincidencias en el hábitat y condiciones ambientales óptimas para la proliferación de las poblaciones tanto de caracoles como las de *P. citrophthora*, muestran una relación ecológica ideal. Este estudio indica que los caracoles pueden jugar un papel muy importante en la transmisión de inóculo desde el suelo a las partes aéreas de la planta.

Los resultados obtenidos indican además que los excrementos de caracoles recolectados contienen propágulos viables de *P. citrophthora*, lo que confirma su resistencia a la secreción digestiva del caracol, hecho que ya había sido observado anteriormente por El-Hamalawi y Menge (1994) con la especie *P. citricola* en plantas de aguacate.

La ausencia de aislamiento de especies de oomicetos a partir del caracol *R. decollata* puede deberse a que posiblemente esta especie dentro de sus hábitos de subsistencia no esté frecuentemente relacionada con el suelo, que es la fuente principal de infestación con propágulos de *Phytophthora*, o a partir de las lesiones producidas por este patógeno en raíces, tronco y ramas.

En el ensayo realizado para determinar la capacidad de *R. decollata* en el transporte de propágulos de *Phytophthora* en sus excrementos, la baja cantidad de excremento obtenida indicaría que este caracol se alimentó escasamente del material vegetal puesto a su disposición. La falta de desarrollo de colonias de *Phytophthora* a partir de las heces indicaría que el caracol no se alimentó de zonas infectadas o que los propágulos de *Phytophthora* no lograron pasar a través de su tracto digestivo.

R. decollata es un caracol que se alimenta pobremente de vegetales, por lo que se le considera en agricultura como una plaga menor (Brantlinger 1953); no obstante, es omnívoro pues se alimenta principalmente de huevos y de otros caracoles. Por esta razón en varias zonas cítricas a nivel mundial se les ha introducido como biocontroladores de *H. aspersa* como predadores (Fisher *et al.* 1980). *R. decollata* a diferencia de *H. aspersa* es más activo a finales de primavera y durante el verano, permaneciendo enterrado en el suelo hasta que las temperaturas son más altas. Es poco probable que esta especie esté relacionada con el transporte activo de propágulos de *P. citrophthora* dado que sus épocas de mayor actividad no coinciden con las del patógeno.

P. palmivora es otra de las especies asociadas al transporte por *H. aspersa*; esta especie es muy importante en cítricos de zonas tropicales a nivel mundial. Tuset (1977) aisló *P. palmivora* de cítricos; no obstante, bajo las condiciones de clima mediterráneo, con escasa pluviometría en verano no es una especie de importancia.

El hecho de haberse encontrado varias especies de oomicetos asociadas al cuerpo de los caracoles indica que estos moluscos pueden comportarse como agentes estrechamente ligados al transporte de propágulos y por lo tanto de gran relevancia en epidemiología. Magnano di San Lio y Pennisi (1984) encontraron que el caracol *Agriolimax agrestis* L. estuvo asociado a una epifitía de aguado de frutos de naranjo dulce en Italia. De acuerdo a sus observaciones, este caracol fue capaz de transportar directa o indirectamente propágulos de *P. citrophthora* desde los frutos infectados en el suelo hacia los frutos de la copa de los árboles. Hardy (2004) en relación al aguado de frutos cítricos, indica que los caracoles pueden transportar propágulos de *P. citrophthora* de los frutos infectados a los frutos sanos en la copa de los árboles.

El caracol gigante africano *Achatina fulica* es una especie introducida en las islas Hawaii del Pacífico norte en la década de 1980 (Raut, 1982). Actualmente es una plaga agrícola muy importante en la zona y es capaz de transportar propágulos de *P. palmivora* sobre su cuerpo y en el interior de sus heces produciendo graves enfermedades en papaya y cacao (Raut y Baker, 2002).

En este estudio se ha comprobado que *H. aspersa* es capaz de transportar propágulos de *P. citrophthora* en el interior de su aparato digestivo y expulsarlos con los excrementos. Por su naturaleza, los excrementos son un sustrato idóneo para prolongar la viabilidad del inóculo fúngico y darle las condiciones necesarias para que se produzca el desarrollo del propágulo a partir de este sustrato. Por el movimiento del caracol, los propágulos pueden ser transportados desde el punto inicial en el cual fue adquirido al alimentarse el caracol como, por ejemplo, raíces infectadas en el

suelo o de lesiones en tronco, a otras zonas de la planta como las ramas. Esta evidencia confirma que este molusco puede ser un agente importante en el transporte de *P. citrophthora* y posiblemente relacionado en la epidemiología del síndrome de afección en ramas de cítricos. Serán necesarios estudios posteriores a nivel de campo para la confirmación o rechazo de esta hipótesis.

5.4.2. Influencia de las hormigas en el transporte de inóculo de *P. citrophthora*

Los resultados obtenidos muestran que las hormigas de la especie *L. grandis* que es la especie de hormigas más abundante presente en los campos de cítricos valencianos (Vanaclocha *et al.*, 2005) podrían actuar también como transmisores de especies de oomicetos pero en mucha menor escala. El exudado o goma producido en las lesiones ocasionadas por infecciones de *Phytophthora* spp en árboles cítricos es comúnmente azucarado y contiene propágulos de *Phytophthora* viables (datos no mostrados). Las hormigas son fácilmente atraídas por las exudaciones gomosas de las lesiones, las cuales pueden contener clamidosporas y/o micelio del patógeno susceptible de ser transportado. Por tanto, al estar en contacto con el inóculo podrían adquirirlo y transportarlo hacia otras zonas del árbol o hacia otros árboles ocasionando nuevos puntos de infección, o llevar el inóculo nuevamente al suelo. El-Hamalawi y Menge (1994) observaron que hormigas de la especie *Iridomyrmex humilis* Mayr. fueron capaces de diseminar la enfermedad denominada “chancro del tallo del aguacate” ocasionado por *P. citricola*. Las hormigas fueron atraídas por los exudados azucarados producidos por las lesiones, adquirieron propágulos viables del patógeno presentes en los exudados y los distribuyeron a otras zonas de la planta y hacia otras plantas.

Los resultados de nuestro estudio indican que la tasa de transmisión de propágulos de oomicetos por *L. grandis* es muy baja, pareciendo, por tanto, poco relevante en el transporte de propágulos de *Phytophthora* desde el suelo hacia los árboles en campos de cítricos. A pesar de que las hormigas pasan gran parte de su vida en contacto con el suelo cerca de los árboles cítricos, sus hormigueros se ubican en suelos secos y aireados en donde probablemente la cantidad de propágulos de *Phytophthora* es baja. En contraste, fueron capaces de adquirir propágulos de *Pythium* spp. lo que hace suponer que podrían ser potenciales transmisores de especies de *Phytophthora* del suelo hacia la copa de los árboles si existiese en el suelo una alta densidad de propágulos de especies de *Phytophthora*. Su papel como diseminadoras de propágulos a partir de puntos de infección en el árbol no ha sido estudiado y es necesario estudios al respecto para valorar el papel que juegan estos insectos y los moluscos en el transporte del inóculo de *P. citrophthora* sobre las partes aéreas de los árboles.

5.4.3. Influencia de los caracoles en el transporte de inóculo de especies de *Phytophthora* desde el suelo hacia los árboles en condiciones de invernadero

Los resultados obtenidos confirman el mecanismo de transporte de inóculo de especies de *Phytophthora* por parte de los caracoles. Los diferentes ensayos realizados indican que *P. citrophthora* tiene la capacidad de colonizar la corteza de los cítricos probablemente a través de microheridas generadas sobre la corteza de los árboles. A través de estas heridas se produciría la colonización de los tejidos del hospedante mediante propágulos de *Phytophthora* que pueden ser clamidosporas, micelio o esporangios transportados desde el sustrato hacia la planta por medio de los caracoles. El cultivar Fortune fue quien obtuvo los porcentajes más altos de incidencia de infección, seguido del cultivar Clemenules y, por último, de Nova. En estos ensayos la zona de infección más común fue el tercio medio de la planta. Este hecho podría estar estrechamente relacionado con el hábito de alimentación del caracol, el cual comúnmente en la mayoría de ocasiones se le observó alimentándose de las zonas pertenecientes a este tercio de la planta. La época de realización del ensayo fue también importante aunque se mantuvo esta misma tendencia en las zonas de infección. A pesar de que los dos ensayos se realizaron en invernadero bajo condiciones controladas, en el primer ensayo (primavera) se obtuvo porcentajes de infección más altos que en el segundo (verano).

Con respecto a la especie *P. palmivora* los resultados indican que bajo las condiciones en las cuales se condujo el experimento hubo poca infección de plantas. Este hecho pudo deberse a dos situaciones: los caracoles podrían haber sido pobremente infestados con propágulos infectivos de esta especie, o bien esta especie podría tener una baja capacidad infectiva de plantas de cítricos a través de la corteza, o ambos casos.

Los esporangios son los principales agentes de infección de *P. palmivora*; éstos son caducos y pueden ser transportados por el viento o por las salpicaduras de agua (Taylor y Griffin, 1981; Erwin y Ribeiro, 1996; Konam y Guest, 2004). Los propágulos susceptibles de ser transportados por caracoles son estructuras de conservación tales como clamidosporas y micelio. Estas estructuras epidemiológicamente no son importantes y probablemente tendrían capacidad limitada de afectar corteza. De hecho, las principales enfermedades ocasionadas por *P. palmivora* en cítricos como “quemado de plantas”, muerte de brotes y aguado de frutos (Erwin y Ribeiro, 1996) involucran infecciones aéreas por parte de esporangios.

Apartado III

Control

Capítulo 6

**Evaluación de la eficacia de fungicidas
sistémicos en el control de *Phytophthora
citrophthora* en ramas de cítricos**

CAPÍTULO 6: EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE FUNGICIDAS SISTÉMICOS EN EL CONTROL DE *Phytophthora citrophthora* EN RAMAS DE CÍTRICOS

6.1. INTRODUCCIÓN

El manejo de enfermedades causadas por especies de *Phytophthora* en cítricos a nivel mundial se basa en una integración de diversas estrategias de control. Estas estrategias incluyen métodos culturales tales como evitar el exceso de humedad en las plantaciones, debido a que favorecen el desarrollo de poblaciones del patógeno en el suelo, y facilitar su drenaje. Es frecuente también el uso de riego localizado, la plantación en mesetas, y la formación de cubetas alrededor del tronco. Otra medida cultural importante incluye injertos altos para evitar el enterramiento de la zona de la variedad e impedir el contacto directo de su corteza con el suelo infestado. Sin embargo, la medida más ampliamente usada para este tipo de enfermedades es el uso de patrones tolerantes o resistentes a la enfermedad. El objetivo primordial de estas medidas de control es evitar daños por especies de *Phytophthora* sobre el sistema radicular y las zonas bajas del árbol.

El síndrome de afección de ramas de árboles cítricos plantea una reevaluación y un cambio en las prácticas de manejo cultural diseñadas para enfermedades ocasionadas por *Phytophthora*, debido a que las estrategias anteriormente expuestas no han sido diseñadas, en principio, para este tipo de afecciones. Un factor significativo en la epidemiología de esta enfermedad es la rapidez en la expresión de síntomas y la muerte de los árboles afectados después de la infección. Por esta razón, las alternativas de lucha química son esenciales para su manejo, debido a que otros tipos de prácticas no proporcionarían un control aceptable. No existen antecedentes sobre prácticas de manejo cultural o resistencia genética aplicables a esta enfermedad.

Los fungicidas sistémicos desarrollados para el control de oomicetos tales como el metalaxil y el fosetil de aluminio han proporcionado la mayor eficacia para el control de enfermedades ocasionadas por *Phytophthora* a nivel mundial (Davis, 1982; Matheron y Matejka 1988; Matheron y Porchas, 2002; Dirac *et al.*, 2003). En España, se han utilizado estos fungicidas para el control de enfermedades de cítricos tales como la pudrición de la raíz y el cuello, gomosis, y “aguado” de frutos causadas por *P. citrophthora*. En 2004 se introdujo el mfenoxam (enantiómero-R del metalaxil) en reemplazo del metalaxil como una nueva herramienta para el manejo de enfermedades ocasionadas por *Phytophthora*.

En contraste con la importancia de los cítricos en España, existen muy pocos trabajos que estudien la eficacia de los fungicidas en el control de enfermedades ocasionadas por *Phytophthora*. Tuset (1983b) encontró que aplicaciones de fosetil-Al y metalaxil a dosis de 1,5 y 4,0 g i.a. L⁻¹ fueron efectivas en el control de la pudrición de la raíz y el cuello causadas por *P. nicotianae*. No

tenemos conocimiento de otros trabajos posteriores que evalúen la eficacia de productos antioomicetos sobre *P. citrophthora* en España.

Dada la importancia de este nuevo síndrome y la preocupación de los agricultores por encontrar una solución al problema, en el presente estudio se pretende: (i) evaluar la eficacia de los fungicidas sistémicos fosetil de aluminio y metalaxil, tradicionalmente utilizados en cítricos y, de fungicidas antioomicetos de nueva generación en el control de esta enfermedad, (ii) seleccionar la técnica de aplicación más apropiada para el control de la enfermedad, (iii) perspectivas de mejora del control mediante una secuencia de aplicación de fungicidas.

6.2. EFICACIA PREVENTIVA DE FUNGICIDAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO (ENSAYO 1).

6.2.1. INTRODUCCIÓN

Este ensayo tuvo como finalidad evaluar *in vivo* la eficacia de productos fungicidas antioomicetos bajo condiciones controladas en invernadero y seleccionar la técnica de aplicación más adecuada para el control de *P. citrophthora*.

6.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones del experimento

El experimento se realizó en un invernadero de las instalaciones del Servicio de Sanidad Vegetal de Silla (Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana) en el año 2004. El invernadero estuvo equipado con reguladores de temperatura y humedad y, durante el ensayo, las condiciones fueron de 22-26 °C de temperatura y un 90% de humedad relativa. Como material vegetal se utilizaron plantas en maceta de dos años de edad del cultivar Fortune injertadas sobre patrón citrange Carrizo.

Para las inoculaciones, se utilizaron dos aislados de *P. citrophthora*: Phy 033 (provincia de Huelva) y Phy 051 (Comunidad Valenciana). Estos aislados se obtuvieron de chancros en ramas de árboles de mandarina clementina cultivares Clemenules y Hernandina, respectivamente. Estas cepas se seleccionaron en un ensayo previo de agresividad de aislados (Capítulo 2).

Se utilizaron los productos fosetil-Al [Aliette WG (granulado dispersable en agua) 80% p/p - Bayer Cropscience], metalaxil [Ridomil (polvo mojable) 25% p/p de metalaxil - Syngenta] y el producto experimental EXP 11074B [fosetil-Al; y AEC638206 (materia activa experimental - granulado dispersable en agua) - Bayer Cropscience].

Los productos y dosis empleados en el ensayo se muestran en la **Tabla 6.1**. Los fungicidas se aplicaron siguiendo tres técnicas: pulverización foliar, pintado a tronco y ramas y vía riego:

- Mediante pulverización foliar se aplicó un volumen promedio de 100 ml de caldo fungicida por plantón, utilizando una mochila pulverizadora hidráulica de presión previa. Los productos aplicados mediante esta técnica fueron el fosetil-Al y el producto experimental.
- Mediante pintado se hizo una aplicación tópica en el tallo en toda su longitud mediante pinceles. Los productos aplicados mediante esta técnica fueron el fosetil - Al y el metalaxil.
- La aplicación por riego se hizo directamente al sustrato de cada maceta. Previamente, se calculó el volumen de retención de agua de cada maceta y en función de este ensayo se aplicó 400 ml de caldo fungicida por planta. Mediante esta técnica se aplicaron el fosetil-Al, metalaxil y el producto experimental.

Tabla 6.1. Ensayo 1 (Invernadero): Productos y dosis empleadas.

Técnica	Producto ¹		Dosis
Riego	(FR)	fosetil-Al	2,4 g m.a./árbol
	(MR)	metalaxil	0,075 g m.a./árbol
	(ER)	EXP11074B: -fosetil-Al -AEC638206	2,72 g m.a./árbol 0,176 g m.a./árbol
Pintado	(FT)	fosetil-Al	60 g m.a./L
	(MT)	metalaxil	80 g m.a./L
Pulverización foliar	(FF)	Fosetil-Al	24,0 g m.a./L
	(EF)	EXP11074B: -fosetil-Al	25,2 g m.a./L
		-AEC638206	2,36 g m.a./L

¹ Aliette WG (fosetil-Al 80%); Ridomil (metalaxil 25%); EXP11074B (fosetil-Al 68% + AEC638206 4,4%).

Proceso de inoculación de plantas

Una vez aplicados los diferentes tratamientos fungicidas a las plantas, se realizaron las inoculaciones en intervalos de 10, 20, 30 y 40 días después de la aplicación. Las plantas se inocularon de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 2 (Apartado 2.2.5).

Se evaluó el área de las lesiones a partir del punto de inoculación 20 días después de cada inoculación (**Figura 6.1**), siguiendo el proceso de evaluación de áreas de lesión desarrollado en el capítulo 2 (Apartado 2.2.5) mediante el programa Assess APS.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar con tratamiento a 8 niveles (7 tipos de tratamiento + 1 testigo no tratado con fungicidas) (**Tabla 6.1**), 2 aislados, 5 repeticiones (plantones) por tratamiento y 4 momentos de inoculación. En total se utilizaron para este ensayo 320 plantones de cítricos.

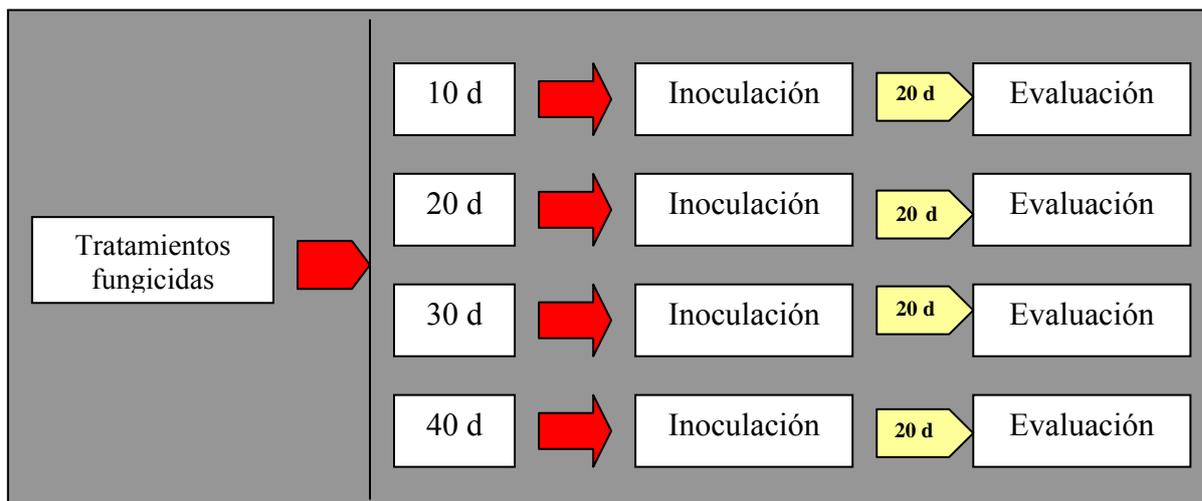


Figura 6.1. Esquema del ensayo de invernadero a plántulas de cítricos.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como área de lesión en cm^2 , evaluando dos factores de estudio: tratamientos y aislados utilizados. Las áreas de lesión de los factores en estudio se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA), fijando el nivel de significación en $P < 0,05$. Con los factores que resultaron significativos en el análisis ANOVA se realizó un test de separación de medias utilizando el análisis de Fisher de la mínima diferencia significativa (LSD). El programa estadístico utilizado para estos análisis fue el Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics. Inc. Rockville – Maryland, USA).

Adicionalmente, se incluyó los valores promedios del porcentaje de control de cada tratamiento. Este dato se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Control} = 100 - [(\text{Área de lesión} \times 100) / \text{Área de lesión del testigo}].$$

6.2.3. RESULTADOS

Según el análisis de la varianza (95 % de confianza), existieron diferencias estadísticas significativas entre los factores estudiados (tratamientos y aislados) y sus respectivas interacciones en las 4 evaluaciones efectuadas (**Tabla 6.2**).

El tratamiento **EF** presentó el mayor porcentaje de control en todas las evaluaciones efectuadas, seguido del tratamiento **FT** cuando se analizó en conjunto el efecto de los dos aislados utilizados sobre los tratamientos. En la **Figura 6.2** se observa que los mejores niveles de control se obtuvieron en la primera evaluación, destacando los tratamientos **EF**, **FF** y **FT**. En la segunda evaluación el % de control fue menor, siendo los tratamientos **EF**, **FT** y **MT** los más efectivos, destacando estos mismos tratamientos en la tercera y cuarta evaluación. Los tratamientos **FR**, **ER** y **MR**, presentaron los % de control más bajos de todo el experimento.

Tabla 6.2. Efecto preventivo de tratamientos fungicidas en árboles de 2 años de edad de la var. Fortune, inoculados con dos aislados de *P. citrophthora* bajo condiciones de invernadero.

Fuente	Valor de P																			
	Días después del tratamiento			Días después del tratamiento																
	10	20	30	10	20	30														
Efectos Principales																				
A : Tratamiento	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000														
B : Aislado	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000														
Interacción																				
A x B	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000														
Tratamientos^v	Días después del tratamiento																			
	10	20	30	10	20	30														
	% control	% control	% control	% control	% control	% control														
EF	95,90 ^w	0,06 ^x	e ^y	0,13	c	82,50	0,29	0,34	b	87,34	0,37	e	0,24	d	87,08	0,33	d	0,32	b	
FF	93,55	0,17	e	0,11	c	46,06	1,53	b	0,39	b	77,27	0,73	d	0,37	d	68,77	1,10	c	0,46	ab
FT	91,04	0,21	de	0,19	bc	76,72	0,45	cd	0,39	b	87,31	0,34	e	0,27	d	85,35	0,23	d	0,54	ab
FR	85,76	0,51	cd	0,10	c	22,38	2,32	a	0,44	b	37,92	2,21	c	0,38	d	41,35	2,42	b	0,44	ab
MT	84,18	0,54	c	0,14	c	71,62	0,69	bc	0,33	b	81,37	0,50	de	0,40	cd	76,01	0,77	c	0,43	ab
ER	80,65	0,68	c	0,15	c	12,88	2,60	ab	0,50	b	49,66	1,82	bc	0,60	c	56,05	1,78	bc	0,37	ab
MR	61,72	1,31	b	0,34	b	28,58	1,71	b	0,84	b	43,86	1,22	c	1,50	b	34,63	2,58	a	0,58	a
T	2,10	a	2,39	a	2,77	a	2,40	a	2,83	a	2,40	a	2,45	a	2,40	a	2,40	a	2,72	a
Aislados																				
Phy 033	0,51 ^z	a	1,36	a	1,05	a	1,31	a	1,31	a	1,05	a	1,31	a	1,31	a	1,31	a	1,31	a
Phy 051	0,18	b	0,47	b	0,55	b	0,45	b	0,45	b	0,55	b	0,45	b	0,45	b	0,45	b	0,45	b

^v EF: Experimental Foliar; FR: Fosetil Riego; MT: Metalaxil Tronco; ER: Experimental Riego. FF: Fosetil Foliar; MR: Metalaxil Riego; FT: Fosetil Tronco.

^w % de control resultante de la combinación de los valores de los 2 aislados.

^x Área de lesión en cm². Cada valor es media de 5 repeticiones.

^y Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) a P<0,05.

^z Área de lesión en cm². Cada valor es media de 35 repeticiones exceptuando los valores del tratamiento testigo.

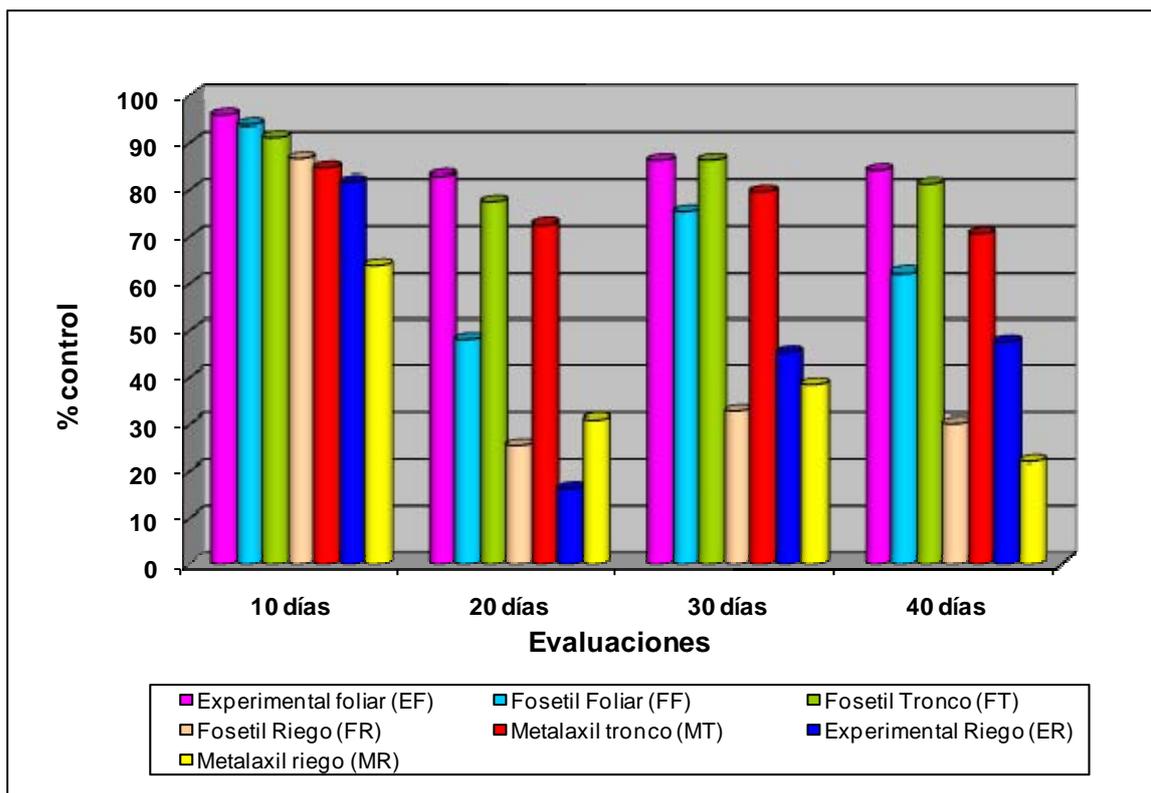


Figura 6.2. Porcentajes de control de los diferentes tratamientos en el ensayo de invernadero.

El estudio del factor aislado de acuerdo a la prueba de significación LSD ($P < 0,05$), mostró que hubo diferencias entre los aislados estudiados, en donde Phy 051 fue considerablemente más afectado por los tratamientos fungicidas que el aislado Phy 033 (Tabla 6.2; Figura 6.3). Esta afirmación se desprende de los datos de los promedios de área de lesión de los controles, donde se puede observar que ambos aislados tuvieron valores similares de área de lesión en Fortune. Con el aislado Phy 051 se obtuvieron áreas de lesión más homogéneas en todos los tratamientos. Con este aislado, el tratamiento MR obtuvo los promedios de porcentaje de control más bajos de todo el experimento, siendo superado solamente por el testigo en los valores promedios de área de lesión.

La interacción significativa de los factores en estudio indica que uno de los aislados fue más agresivo sobre determinados tratamientos que el otro. Por tal motivo, se hizo la significación para cada aislado individualmente en cada una de las evaluaciones.

En la primera evaluación (10 días después de la aplicación (dda)), el análisis de los valores del área promedio de lesión con el aislado Phy 033 muestra que los tratamientos EF, FF y FT presentaron los promedios de área de lesión más bajos, sin diferencias estadísticas entre ellos. El tratamiento FT fue estadísticamente similar a FR, y este último a su vez con MT y ER. El promedio de área de lesión más alto lo obtuvo el tratamiento MR, diferente estadísticamente a los demás tratamientos y con valores de área de lesión más cercanos al testigo. Con el aislado Phy 051 todos los tratamientos fueron estadísticamente similares a excepción de MR quien obtuvo el promedio de área de lesión más alto en relación al testigo.

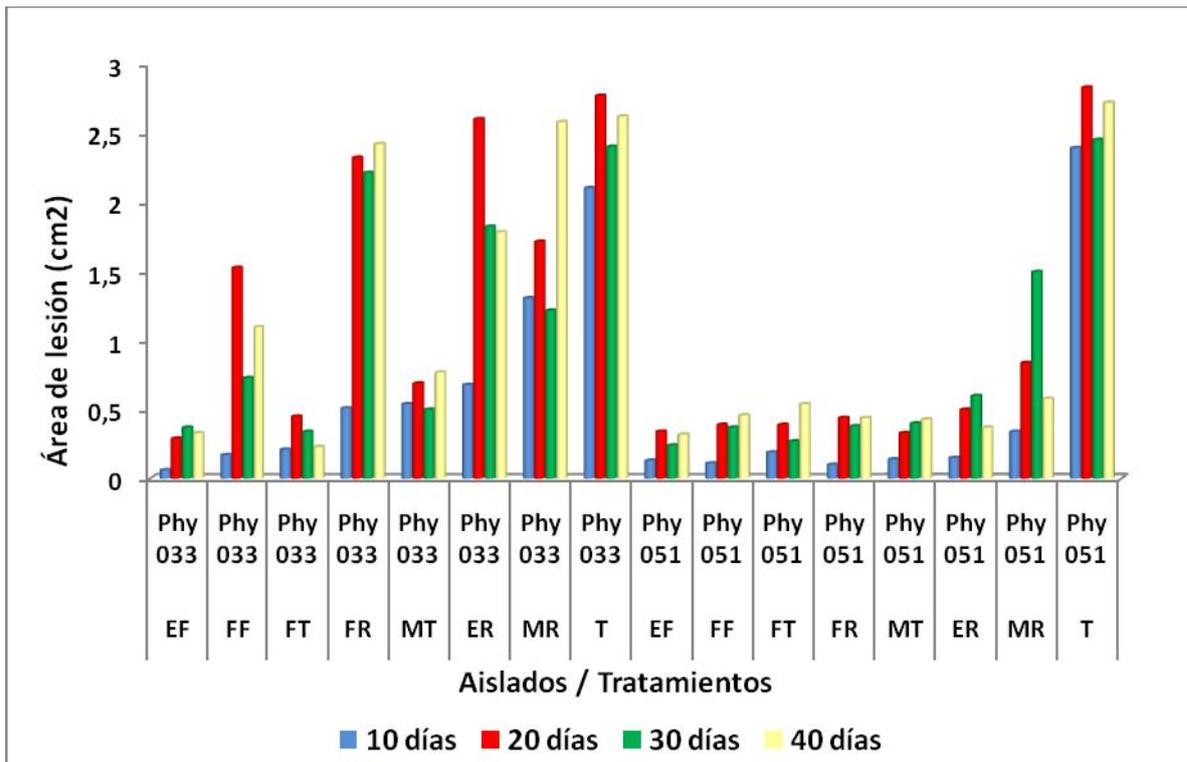


Figura 6.3. Resultados de evaluaciones en invernadero de la relación entre aislado y tratamiento.

En la segunda evaluación (20 dda), con el aislado Phy 033 los tratamientos EF y FT presentaron las áreas de lesión más bajas, sin diferencias estadísticas entre ellos. Las áreas de lesión más altas la obtuvieron los tratamientos FR y ER. Con el aislado Phy 051 no se obtuvo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos a excepción de MR quien presentó valores de área de lesión más cercanos al testigo.

En la tercera evaluación (30 dda), con el aislado Phy 033 los tratamientos con promedios de área de lesión más bajos fueron EF, FT y MT sin diferencias estadísticas entre ellos. Los tratamientos FR y ER presentaron promedios de área de lesión más altas y más cercanas al testigo sin diferencias significativas entre ambos. Con el aislados Phy 051 los tratamientos con área de lesión más bajos fueron EF, FF, FT, FR y MT, sin diferencias estadísticas, siendo MR el tratamiento que presentó promedios de área de lesión más altos en relación al testigo.

En la cuarta evaluación (40 dda), con el aislado Phy 033, los tratamientos EF y FT mostraron los valores de área de lesión más bajas, sin diferencias estadísticas entre ellos. En esta evaluación, el tratamiento MR presentó los valores de área de lesión más altos. Con el aislado Phy 051 se encontró que a excepción de MR que fue superado solamente por el testigo, los demás tratamientos no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellos.

6.3. EFICACIA DE FUNGICIDAS EN APLICACIONES PREVENTIVAS Y CURATIVAS A ÁRBOLES ADULTOS EN CONDICIONES DE CAMPO (ENSAYO 2).

6.3.1. INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el experimento anterior en invernadero, en el presente apartado se pretendió evaluar la eficacia de los fungicidas y la técnica de aplicación más eficaz para el control de *P. citrophthora* bajo condiciones de campo. En este ensayo también se evaluó el efecto preventivo y curativo de los fungicidas en el control del patógeno.

6.3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones del experimento

El experimento se llevó a cabo en dos parcelas de mandarina Clementina cv. Hernandina, ambas injertadas sobre patrón citrange Carrizo durante la época primavera – verano de 2004. Una de las parcelas estuvo ubicada en El Puig (provincia de Valencia) y la otra en Castellón con árboles de 6 y 16 años de edad respectivamente. Ambas parcelas fueron regadas por goteo.

Los aislados Phy 033 y Phy 051 de *P. citrophthora*, y los mismos fungicidas y formulaciones del ensayo previo en invernadero se utilizaron en este ensayo. Los productos y dosis empleadas se muestran en la **Tabla 6.3**. Estos se aplicaron siguiendo tres técnicas diferentes:

a. Aplicación vía pulverización foliar

Se realizó mediante un equipo de pulverización hidráulica (**Figuras 6.4a y 6.4b**). Previamente al tratamiento se realizó un calibrado del equipo en cada campo experimental con la finalidad de calcular el volumen de agua necesario para la pulverización de la copa del árbol. Los gastos originados mediante este sistema se muestran en las **Tablas 10.21 y 10.24 (en anexos)**.

Tabla 6.3. Ensayo 2 (Campo): Productos y dosis empleadas.

Técnica	Producto ¹	Dosis
Riego	(FR) fosetil-Al	20 g m.a./árbol
	(MR) metalaxil	2 g m.a./árbol
	(ER) EXP11074B: -fosetil-Al -AEC638206	20,4 g m.a./árbol 1,32 g m.a./árbol
Pintado	(FT) fosetil-Al	80 g m.a./L
	(MT) metalaxil	60 g m.a./L
Pulverización foliar	(FF) fosetil-Al	3,3 g m.a./L
	(EF) EXP11074B: -fosetil-Al	3,4 g m.a./L
	-AEC638206	0,52 g m.a./L

¹ Aliette WG (fosetil-Al 80%); Ridomil (metalaxil 25%); EXP11074B (fosetil-Al 68% + AEC638206 4,4%).

b. Aplicación vía pintado de tronco y ramas

Los fungicidas se aplicaron al tronco y las ramas de los árboles mediante brochas impregnadas con el producto. La zona pintada cubrió todo el diámetro del tronco y ramas en una longitud aproximada de 30 - 40 cm alrededor de la zona donde posteriormente debería ir la inoculación (**Figura 6.4c y 6.4d**). Los gastos originados mediante este sistema de aplicación se muestran en las **Tablas 10.25 y 10.28 (en anexos)**.

c. Aplicación vía sistema de riego

Esta aplicación se realizó mediante la conexión de los laterales de riego por goteo al depósito del equipo de pulverización. Para ello, se hizo un corte en cada lateral con la finalidad de introducir en su interior una unión en forma de T. A través de esta unión, la manguera a presión proveniente del depósito introdujo el caldo fungicida dentro de cada lateral de riego. La tercera salida de la unión en T se pinzó para que el caldo no se aplicara al resto de los árboles de la fila que no iban a ser tratados. Previo a la aplicación se realizó un riego para humedecer el bulbo y asegurar la eficiente distribución del caldo en el suelo. Tras la aplicación de fungicidas se continuó con la aplicación de agua durante 15 minutos (**Tablas 10.29 y 10.32 en anexos**).



Figura 6.4. Aplicación de fungicidas a árboles cítricos en campo. a. Pistola pulverizadora. b. Equipo de pulverización hidráulica. c. Pintado de tronco. d. Pintado de ramas.

Estrategias de aplicación de fungicidas

a. Estrategias preventivas

Se aplicaron los fungicidas y quince días después se inocularon 4 ramas por árbol en intervalos de 15 días entre inoculaciones. De esta manera, a los 15 días de la aplicación de los productos químicos se inoculó la 1ª rama de cada árbol, a los 30 días la 2ª, a los 45 la 3ª y a los 60 días la 4ª rama. La evaluación de los resultados se realizó 30 días después de cada inoculación (Figura 6.5). Paralelamente, en cada momento de inoculación de ramas, se extrajo una estría vertical de corteza de 10 x 3 cm de la zona del tronco de cada árbol. Cada estría se inoculó en el laboratorio e incubó en estufa a 24 °C durante cuatro días. Las aplicaciones de fungicidas para evaluar su actividad preventiva se realizaron el 6 mayo de 2004 para los experimentos realizados en Castellón y el 7 mayo para los experimentos de Valencia.

b. Estrategias curativas

Se inocularon en una misma fecha 4 ramas de cada árbol del experimento. Treinta días después de la inoculación se realizó la aplicación de los tratamientos fungicidas en cada parcela experimental (Castellón y Valencia). La evaluación de los resultados se realizó a los 15, 30, 60 y 90 días después de la aplicación los tratamientos (Figura 6.6). Las aplicaciones para evaluar las estrategias curativas de los fungicidas se realizaron el 10 de mayo de 2004 en la parcela de Castellón y el 17 de mayo en la parcela de Valencia.

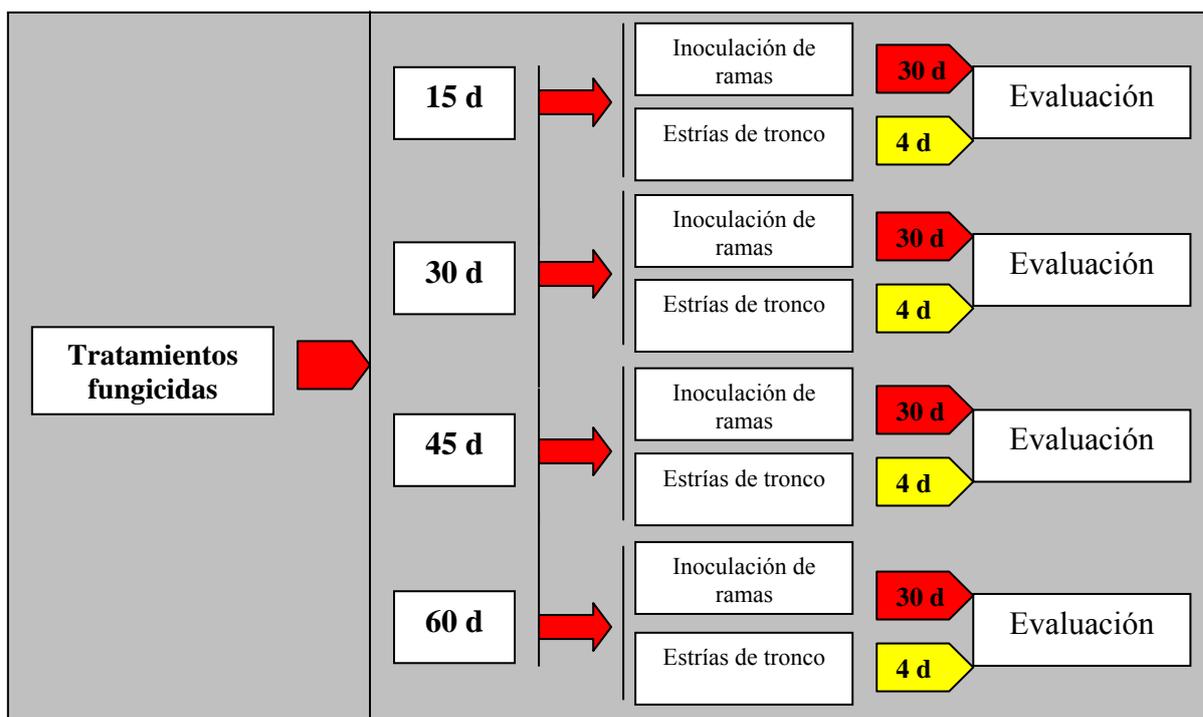


Figura 6.5. Esquema del ensayo de estrategias preventivas en campo (Ensayo 2004).

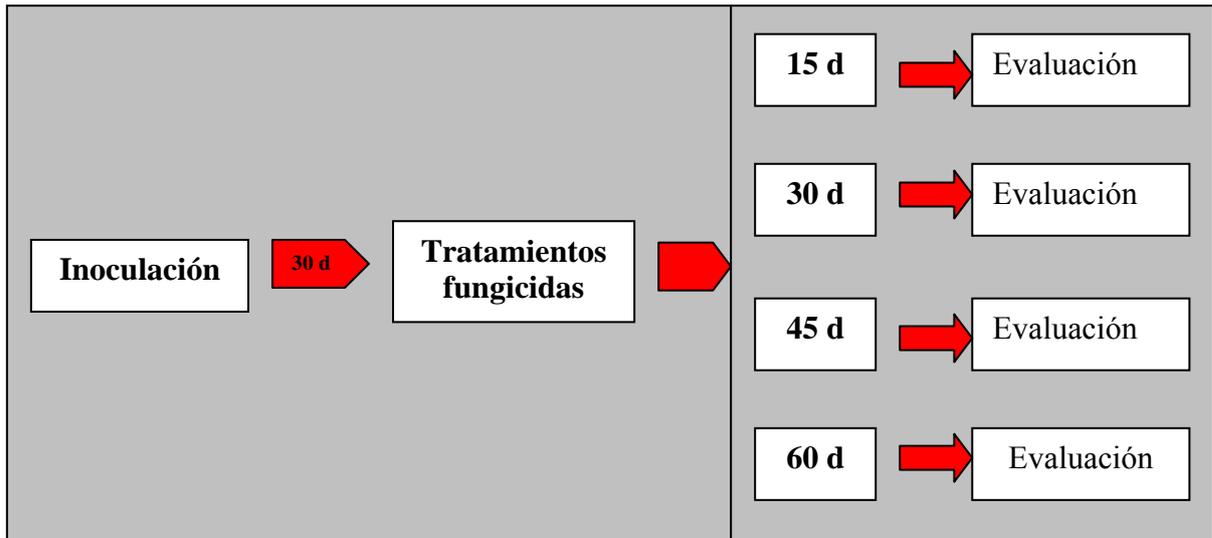


Figura 6.6. Esquema del ensayo de estrategias curativas en campo (Ensayo 2004).

Proceso de inoculaciones

1. Inoculación de ramas

Se seleccionaron ramas lignificadas de aproximadamente 2,5 cm de diámetro a las que se le aplicó superficialmente alcohol etílico de 96° (**Figura 6.7a**). Mediante un injertador se realizaron tres cortes sobre la corteza de la rama, dos paralelos entre sí de 1,5 cm de largo, y otro de 1 cm perpendicular a los anteriores (**Figura 6.7b**). Se levantó el trozo de corteza con el injertador y se introdujo en su interior un disco de 8 mm de diámetro de agar + micelio del aislado correspondiente en contacto directo con el cambium (**Figura 6.7c**). Posteriormente, se colocó un algodón humedecido con agua estéril sobre la herida (**Figura 6.7d**), se selló con parafilm (**Figura 6.7e**), y el conjunto se cubrió con papel de aluminio (**Figura 6.7f**).

La evaluación de resultados de las estrategias preventivas se hizo mediante una regla graduada midiendo la longitud total de la lesión en sentido ascendente y descendente a partir del punto de inoculación (**Figura 6.7g**). A esta lectura, se le restó el tamaño de la lesión inicial de la herida de inoculación, que era de 1,5 cm. Para las estrategias curativas sólo se consideró las lesiones en sentido descendente desde el punto de inoculación. En ambos ensayos se hizo el reaislamiento del patógeno a partir de lesiones en ramas utilizando el medio PARBPH.

2. Inoculación de estrías

La metodología de extracción e inoculación de estrías se adoptó de Matheron *et al.* (1985). Con un injertador y una plantilla de 10 cm de largo y 1,5 cm de ancho, se hicieron cortes en el tronco de los árboles tratados siguiendo el contorno de la plantilla. A continuación, se levantó la corteza cortada (**Figura 6.8a**), y se envolvió en papel absorbente humedecido. La herida producida se pintó con Mastix® para evitar la entrada de patógenos secundarios (**Figura 6.8b**).

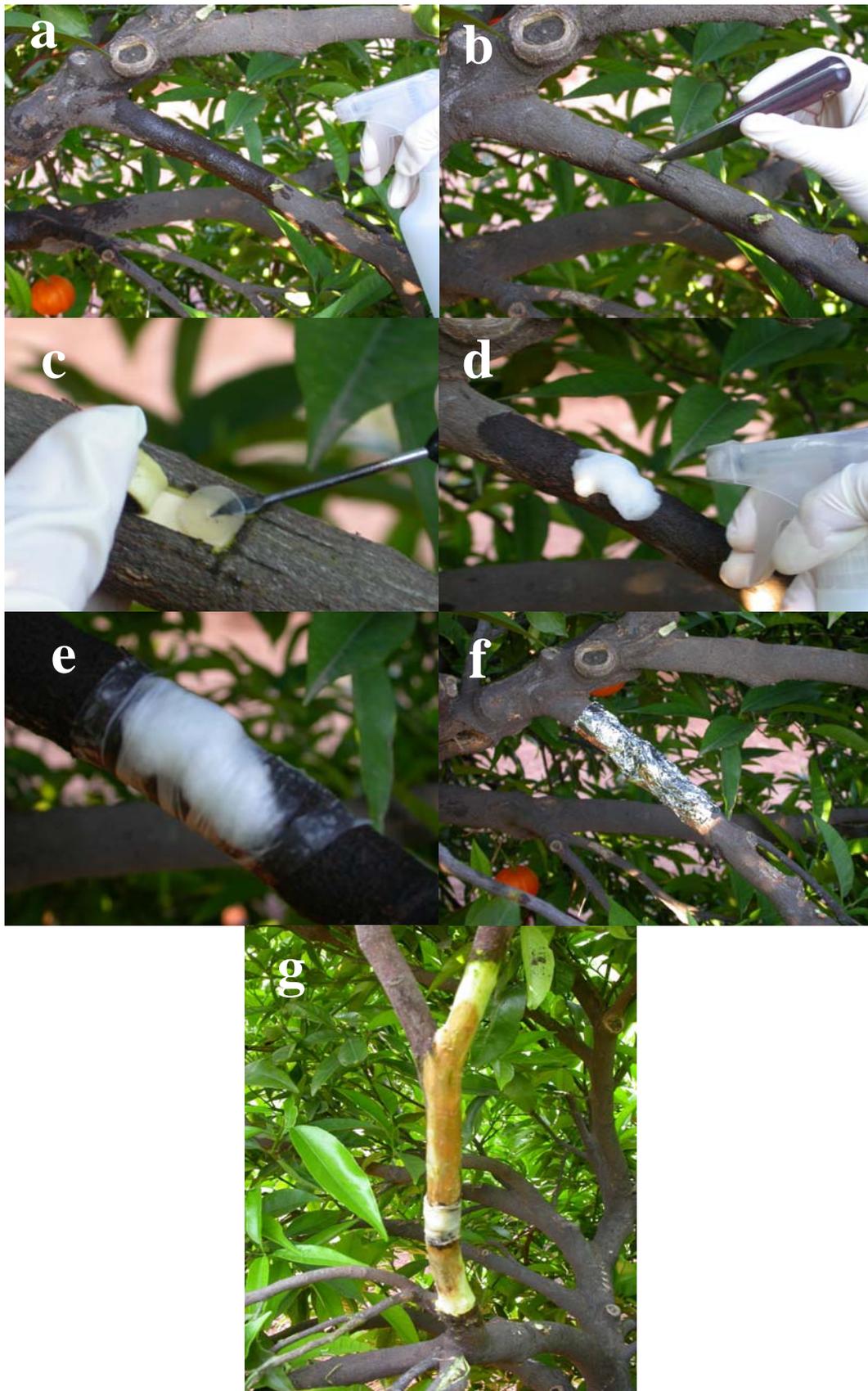


Figura 6.7. Proceso de inoculación de ramas en campo. **a.** Aplicación de alcohol con un pulverizador, **b.** Separación de la solapa de corteza, **c.** Introducción del disco de agar + micelio, **d.** Algodón humedecido con agua, **e.** Sellado con parafilm, **f.** Recubrimiento con papel de aluminio, **g.** Toma de medidas.

En el laboratorio, las estrías se dividieron longitudinalmente en dos, la primera de las porciones se inoculó situando un disco de agar + micelio sobre el centro de la superficie exterior de la corteza, y la segunda porción se inoculó sobre el centro de la superficie interior (**Figura 6.8c**). Después de las inoculaciones, los segmentos de corteza de incubaron en cámara húmeda durante 4 días a 24 °C. La evaluación se realizó a partir de la longitud de las lesiones desarrolladas sobre el tejido de la corteza midiendo la distancia comprendida entre las dos zonas de avance opuestas. (**Figura 6.8d**). A esta lectura, se le restó el tamaño del disco de inóculo inicial, que era de 5 mm.

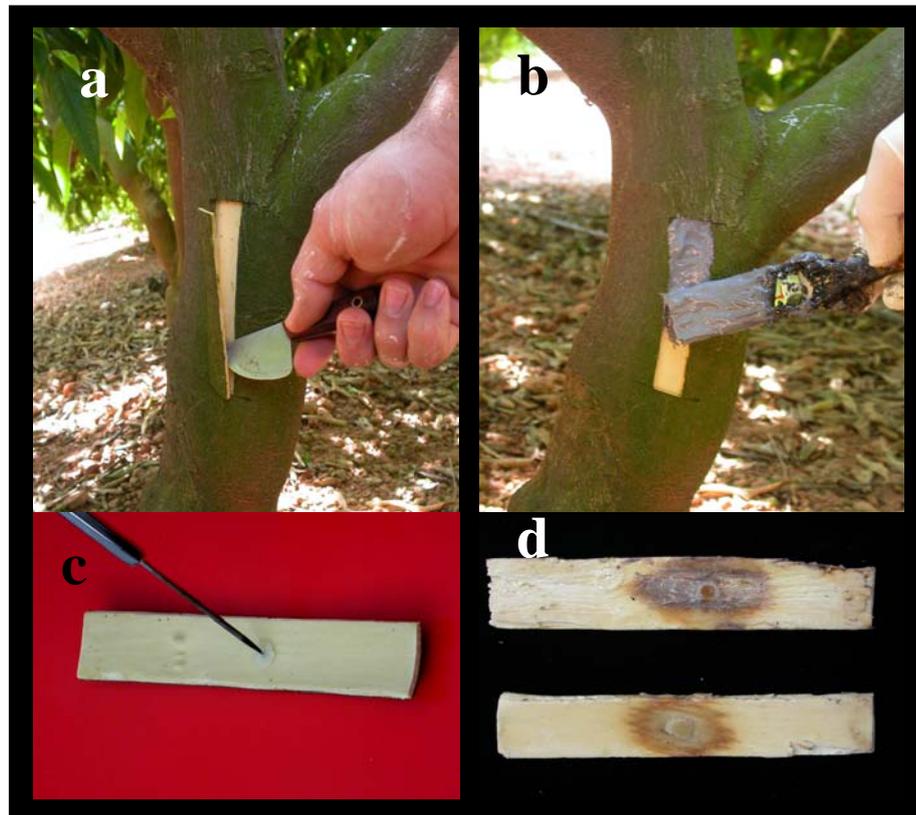


Figura 6.8. Proceso de extracción de estrías. a. Extracción de la estría, **b.** Pintado de la herida con pasta selladora, **c.** Inoculación de las estrías en laboratorio, **d.** Longitud de la lesión causada por el aislado.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño estadístico en bloques al azar con tratamiento a 8 niveles consistente en una combinación de fungicidas y metodologías de aplicación (7 combinaciones + 1 testigo) (**Tabla 6.3**), 2 aislados y 4 repeticiones (árboles) por tratamiento y 4 momentos de inoculación. En este ensayo se inocularon un total de doscientas cincuenta y seis ramas. Este número de inoculaciones se realizó tanto en los ensayos preventivos como en los curativos en cada campo experimental. Los bloques de los campos experimentales se colocaron perpendicularmente a la dirección de las líneas de goteros. Las parcelas elementales eran de un árbol, dejando otro como barrera para prevenir interferencias de tratamientos. Posteriormente a cada unidad se le asignó al azar un código con el aislado, y el nivel de tratamiento (**Figuras 10.1 y 10.2 en anexos**).

Condiciones medioambientales durante el experimento

En la **Figura 6.9** se representan las condiciones de lluvia y temperatura del campo de ensayo de Valencia en el intervalo en que se realizó el experimento. Los datos se obtuvieron de la estación metereológica de Ribaroja del Turia. Estos datos muestran una acumulación de la pluviometría entre la segunda quincena de abril y la primera de mayo con temperaturas entre los 12-17°C. Con el transcurso del tiempo hubo un aumento en la temperatura y una disminución de los regimenes de pluviometría, características típicas de climas mediterráneos de acuerdo al sistema de clasificación climática de Koeppen (Lutgens y Tarbuck, 2004).

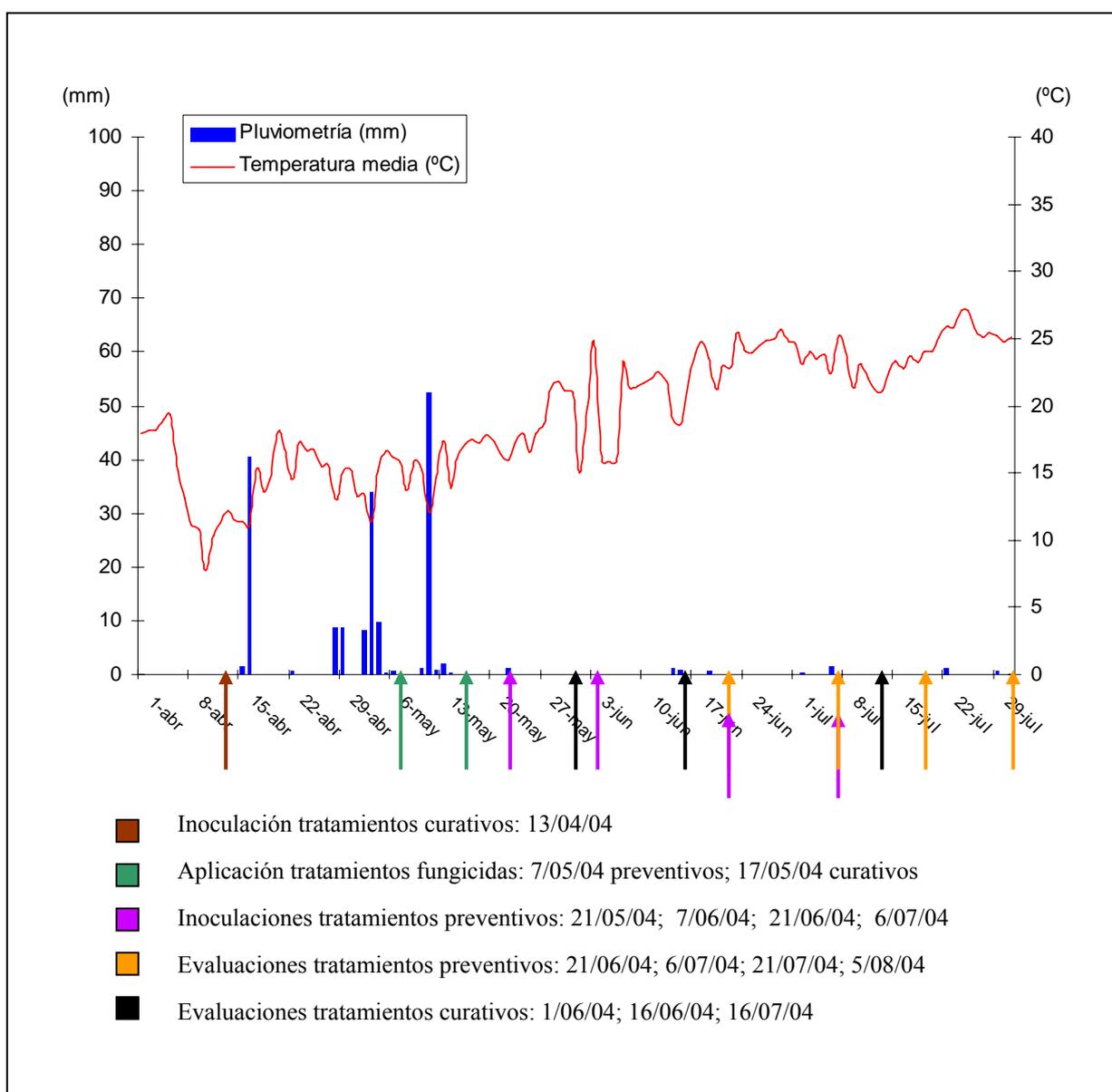


Figura 6.9. Condiciones ambientales registradas durante el ensayo de eficacia de fungicidas en Valencia.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como longitud promedio de lesión en cm, evaluando dos factores de estudio, tratamientos y aislado utilizado. Estos valores se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA), fijando el nivel de significación en $P < 0,05$. Con los factores que resultaron significativos en el análisis ANOVA se realizó un test de separación de medias utilizando el análisis de Fisher de la mínima diferencia significativa (LSD). El programa estadístico utilizado para estos análisis fue el Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics. Inc. Rockville – Maryland, USA).

Adicionalmente, se incluyó los valores promedios del porcentaje de control de cada tratamiento. Este dato se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Control} = 100 - [(\text{Longitud de lesión} \times 100) / \text{Longitud de lesión del testigo}].$$

Para el caso de los aislados y las estrías, no se calculó el % de control, solamente se realizó un análisis ANOVA y LSD directamente sobre los valores de longitud de la lesión.

6.3.3. RESULTADOS

ESTRATEGIAS PREVENTIVAS

1. Inoculación de ramas

a. Parcela de Valencia

De acuerdo al análisis de la varianza se encontró diferencias estadísticas significativas en el factor tratamiento en todas las evaluaciones, y en el factor aislado sólo en las dos primeras. No se encontró diferencias significativas en la interacción tratamiento x aislado (**Tabla 6.4**). De acuerdo a la prueba de significación LSD ($P < 0,05$) para el factor tratamiento, MT fue estadísticamente superior a los demás tratamientos en todas las evaluaciones al obtener promedios de longitud de lesión menores en relación al testigo inoculado. El tratamiento FT fue estadísticamente similar a MT en la primera y cuarta evaluación. En cuanto al % de control calculado, MT obtuvo los mayores porcentajes de control en todas las evaluaciones a excepción de la última evaluación en donde FT fue superior (**Tabla 6.4; Figura 6.10**).

El estudio del factor aislado mostró diferencias estadísticas significativas en las dos primeras evaluaciones. De acuerdo al análisis LSD ($P < 0,05$), el aislado Phy 033 obtuvo el mayor promedio de longitud de lesión en estas evaluaciones. En la tercera y cuarta evaluación, no se encontraron diferencias significativas entre ambos aislados (**Tabla 6.4**). Todos los reaislamientos del patógeno sobre medio selectivo realizados a partir de lesiones en ramas de este ensayo fueron exitosos.

Tabla 6.4. Ensayo 2: Evaluación del control en estrategias preventivas. Ensayo de inoculación de ramas en la parcela de Valencia.

Fuente	Valor de P							
	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación							
	15		30		45		60	
Ef. principales								
A : Tratamiento	0,0002		0,0014		0,0000		0,0056	
B : Aislado	0,0001		0,0362		0,6164		0,8458	
Interacción								
A x B	0,3407		0,7539		0,0608		0,8738	
Tratamientos ^v	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación							
	15		30		45		60	
	EF	ER	MR	FR	FF	FT	MT	T
EF	35,53 ^w	8,21 ^x ab ^y	50,05	3,90 b	57,83	2,49 b	41,86	3,03 b
ER	40,20	7,93 b	10,96	6,41 ab	6,06	5,44 a	19,91	3,85 ab
MR	49,00	6,44 b	36,30	4,73 b	39,24	3,60 ab	48,48	2,86 b
FR	47,62	6,60 b	12,21	6,75 ab	60,45	2,18 b	35,82	3,34 ab
FF	58,20	5,38 b	56,37	3,43 b	60,76	2,34 b	26,44	3,44 ab
FT	73,62	3,69 bc	50,24	3,35 b	57,37	2,41 b	61,09	1,66 c
MT	95,00	0,63 c	77,56	1,50 c	98,86	0,06 c	56,78	1,74 c
T	12,6 a		8,75 a		5,85 a		5,6 a	
Aislados								
Phy-033	7,28 ^z a		5,20 a		2,59 a		2,68 a	
Phy-051	3,82 b		3,39 b		2,39 a		3,01 a	

^v EF: Experimental Foliar; FR: Fosetil Riego; MT: Metalaxil Tronco; ER: Experimental Riego; FF: Fosetil Foliar; MR: Metalaxil Riego; FT: Fosetil Tronco. T: Control.

^w % control.

^x Longitud de lesión (cm). Cada valor es media de 4 repeticiones.

^y Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) a $P < 0,05$.

^z Longitud de lesión en cm. Cada valor es media de 28 repeticiones exceptuando los valores del tratamiento testigo.

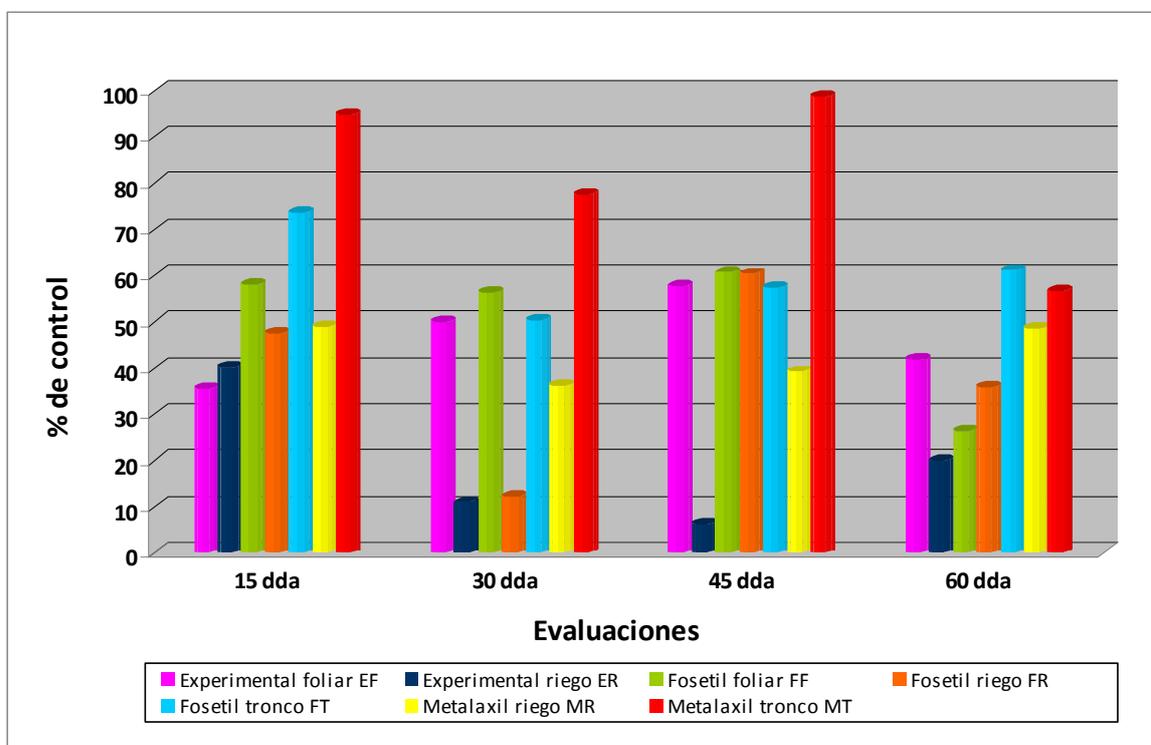


Figura 6.10. Ensayo 2: Estrategias preventivas. Porcentajes de control en el ensayo de inoculación en ramas en la parcela de Valencia.

b. Parcela de Castellón

El análisis de la varianza mostró diferencias significativas en el factor tratamiento en todas las evaluaciones, y en el factor aislado solamente en la tercera evaluación. No hubo diferencias significativas en la interacción tratamiento x aislado (**Tabla 6.5**). Según la prueba de significación LSD ($P < 0,05$) para el estudio del factor tratamiento, MT fue estadísticamente superior a los demás tratamientos en todas las evaluaciones (excepto en la tercera evaluación donde no difirió significativamente de FT) al obtener promedios de longitud de lesión inferiores. En todas las evaluaciones MT obtuvo los mayores porcentajes de control (**Tabla 6.5; Figura 6.11**). FT fue el segundo mejor tratamiento en función de sus menores promedios de longitud de lesión y % de control.

El estudio del factor aislado mostró diferencias significativas sólo en la tercera evaluación, en donde el aislado Phy 051 mostró un mayor promedio de longitud de lesión que el Phy-033. En las demás evaluaciones, ambas cepas no difirieron estadísticamente en sus medias de longitud de lesión (**Tabla 6.5**). Todos los reaislamientos del patógeno sobre medio selectivo realizados a partir de lesiones en ramas de este ensayo fueron exitosos.

Tabla 6.5. Ensayo 2: Evaluación del control en estrategias preventivas. Ensayo de inoculación de ramas en la parcela de Castellón.

Fuente	Valor de <i>P</i>									
	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación									
	15		30		45		60			
Ef. principales										
A : Tratamiento	0,0006		0,0000		0,0068		0,0000			
B : Aislado	0,0617		0,5909		0,0144		0,0933			
Interacción										
A x B	0,9764		0,1775		0,8612		0,2101			
Tratamientos ^v	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación									
	15		30		45		60			
ER	4,28 ^w	11,90 ^x a ^y	16,66	9,79 a	32,05	6,34 a	29,87	5,26 ab		
MR	19,82	9,99 a	23,88	8,94 ab	15,44	7,89 a	0,00	7,84 a		
FF	19,86	9,95 a	24,75	8,88 ab	21,98	7,28 a	35,92	4,79 ab		
FR	17,14	10,19 a	4,55	11,24 a	38,05	5,78 ab	9,89	6,26 ab		
EF	28,25	8,91 a	44,62	6,53 bc	40,73	5,53 ab	41,66	4,31 ab		
FT	32,89	8,41 a	50,79	5,78 c	52,42	4,44 bc	44,09	3,96 b		
MT	89,04	1,40 b	74,55	2,95 d	67,48	3,04 c	88,09	0,84 c		
T		12,4 a		11,80 a		9,33 a		7,90 a		
Aislados										
Phy-033	8,13 ^z a		7,98 a		7,06 a		5,21 a			
Phy-051	9,54 a		7,47 a		4,40 b		4,29 a			

^v EF: Experimental Foliar; FR: Fosetil Riego; MT: Metalaxil Tronco; ER: Experimental Riego; FF: Fosetil Foliar; MR: Metalaxil Riego; FT: Fosetil Tronco. T: Control.

^w % control.

^x Longitud de lesión (cm). Cada valor es media de 4 repeticiones.

^y Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) a $P < 0,05$.

^z Longitud de lesión en cm. Cada valor es media de 28 repeticiones exceptuando los valores del tratamiento testigo.

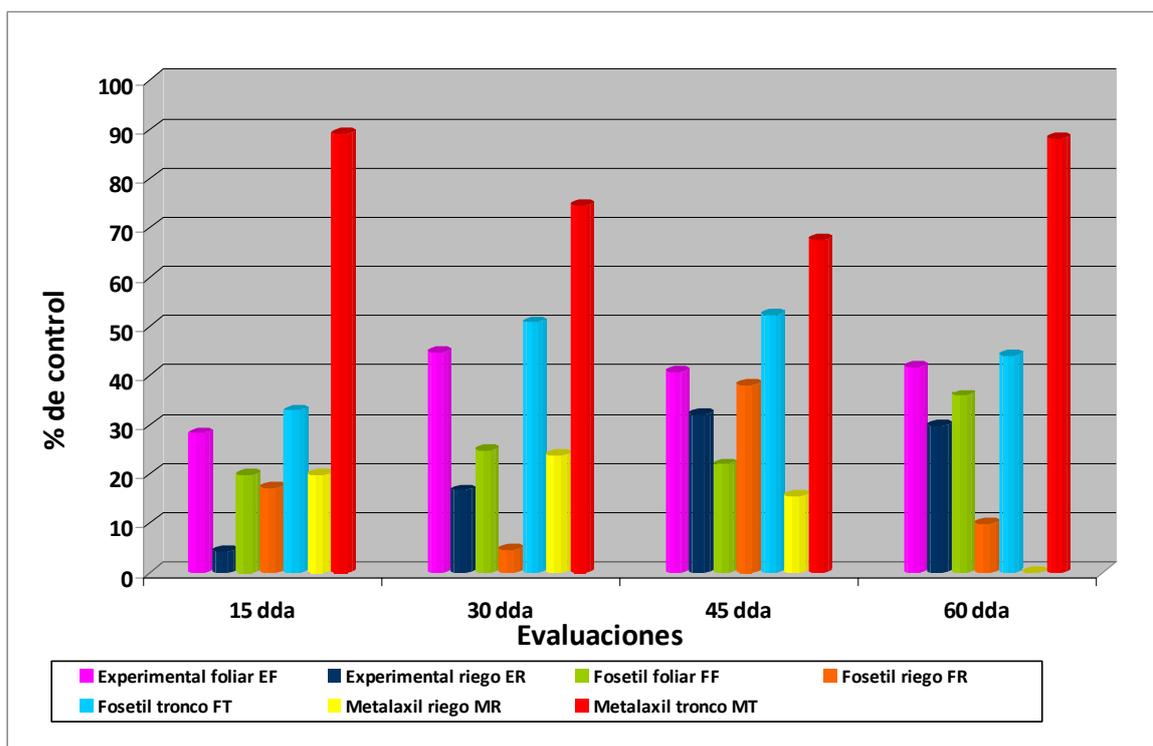


Figura 6.11. Ensayo 2: Estrategias preventivas. Porcentajes de control en el ensayo de inoculación en ramas en la parcela de Castellón.

2. Inoculación de estrías de corteza

En este experimento, se realizó las inoculaciones tanto sobre la epidermis como sobre el cambium. Las inoculaciones sobre la epidermis no resultaron en infecciones, por esta razón, los datos se refirieron exclusivamente a las inoculaciones sobre el cambium.

a. Parcela de Valencia

De acuerdo al análisis de la varianza, no se presentó diferencias significativas en el estudio del factor tratamiento en ninguna de las evaluaciones (**Tabla 6.6**); asimismo, el estudio del factor aislado sólo presentó diferencias en la segunda evaluación (30 dda) donde el aislado Phy 033 presentó un mayor tamaño promedio de lesión. La interacción tratamiento x aislado no fue significativa en ninguna de las evaluaciones.

b. Parcela de Castellón

De acuerdo al análisis de la varianza, los resultados obtenidos en este ensayo indicaron que en el factor tratamiento existieron diferencias significativas únicamente en la segunda y cuarta evaluación. En contraste, no se encontraron diferencias significativas en el estudio del factor aislado en ninguna de las evaluaciones ni en las interacciones de ambos factores (**Tabla 6.7**).

Tabla 6.6. Ensayo 2: Estrategias preventivas. Longitud de lesión en estrías inoculadas en la parcela de Valencia.

Fuente	Valor de <i>P</i>			
	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación			
	15	30	45	60
Ef. principales				
A : Tratamiento	0,2901	0,4797	0,7489	0,6609
B : Aislado	0,8218	0,0014	0,0868	0,2290
Interacción				
A x B	0,4564	0,4668	0,3760	0,2968
Tratamientos ^W	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación			
	15	30	45	60
ER	3,65 ^X a ^Y	1,96 a	1,85 a	1,28 a
MR	2,93 ab	1,56 a	1,81 a	1,58 a
FF	2,73 b	1,81 a	1,86 a	1,68 a
FR	2,71 b	1,83 a	1,99 a	1,66 a
EF	2,71 b	1,84 a	1,99 a	1,84 a
FT	2,63 b	1,78 a	1,90 a	1,61 a
MT	2,83 ab	1,60 a	1,70 a	1,86 a
T	2,76 b	2,01 a	2,08 a	1,66 a
Aislados				
Phy 051	2,91 ^Z a	1,54 b	1,83 a	1,76 a
Phy 033	2,87 a	2,01 a	2,04 a	1,62 a

^W EF: Experimental Foliar; FR: Fosetil Riego; MT: Metalaxil Tronco; ER: Experimental Riego; FF: Fosetil Foliar; MR: Metalaxil Riego; FT: Fosetil Tronco. T: Control.

^X Longitud de lesión (cm). Cada valor es media de 5 repeticiones.

^Y Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) a $P < 0,05$.

^Z Longitud de lesión en cm. Cada valor es media de 35 repeticiones exceptuando los valores del tratamiento testigo.

Tabla 6.7. Ensayo 2: Estrategias preventivas. Longitud de lesión en estrías inoculadas en la parcela de Castellón.

Fuente	Valor de <i>P</i>			
	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación			
	15	30	45	60
Ef. principales				
A : Tratamiento	0,1118	0,0226	0,6315	0,0169
B : Aislado	0,0775	0,8866	0,2410	0,5148
Interacción				
A x B	0,7542	0,5835	0,8657	0,3609
Tratamientos ^W	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación			
	15	30	45	60
FR	3,49 ^X a ^Y	3,36 a	1,29 a	1,30 bc
ER	3,30 a	2,96 ab	1,56 a	1,35 bc
T	2,90 a	2,88 b	1,44 a	1,83 ab
MR	3,05 a	2,75 b	1,19 a	1,14 c
FF	3,05 a	2,74 b	1,69 a	1,90 ab
FT	3,04 a	2,73 b	1,36 a	1,38 bc
EF	3,05 a	2,61 b	1,28 a	1,39 bc
MT	2,64 a	2,59 b	1,28 a	2,20 a
Aislados				
Phy 051	2,93 ^Z a	2,85 a	1,53 a	1,57 a
Phy 033	3,22 a	2,74 a	1,32 a	1,63 a

^W EF: Experimental Foliar; FR: Fosetil Riego; MT: Metalaxil Tronco; ER: Experimental Riego; FF: Fosetil Foliar; MR: Metalaxil Riego; FT: Fosetil Tronco. T: Control.

^X Longitud de lesión (cm). Cada valor es media de 5 repeticiones.

^Y Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) a $P < 0,05$.

^Z Longitud de lesión en cm. Cada valor es media de 35 repeticiones exceptuando los valores del tratamiento testigo.

1. Evolución de la longitud de las lesiones en ramas inoculadas en campo

La **Figura 6.12** muestra la disminución gradual de los promedios de longitud de lesión en ramas inoculadas en campo en función de las épocas de evaluación en ambas parcelas en estudio. Los promedios totales de lesión fueron más altos en la parcela de Castellón que en la de Valencia.

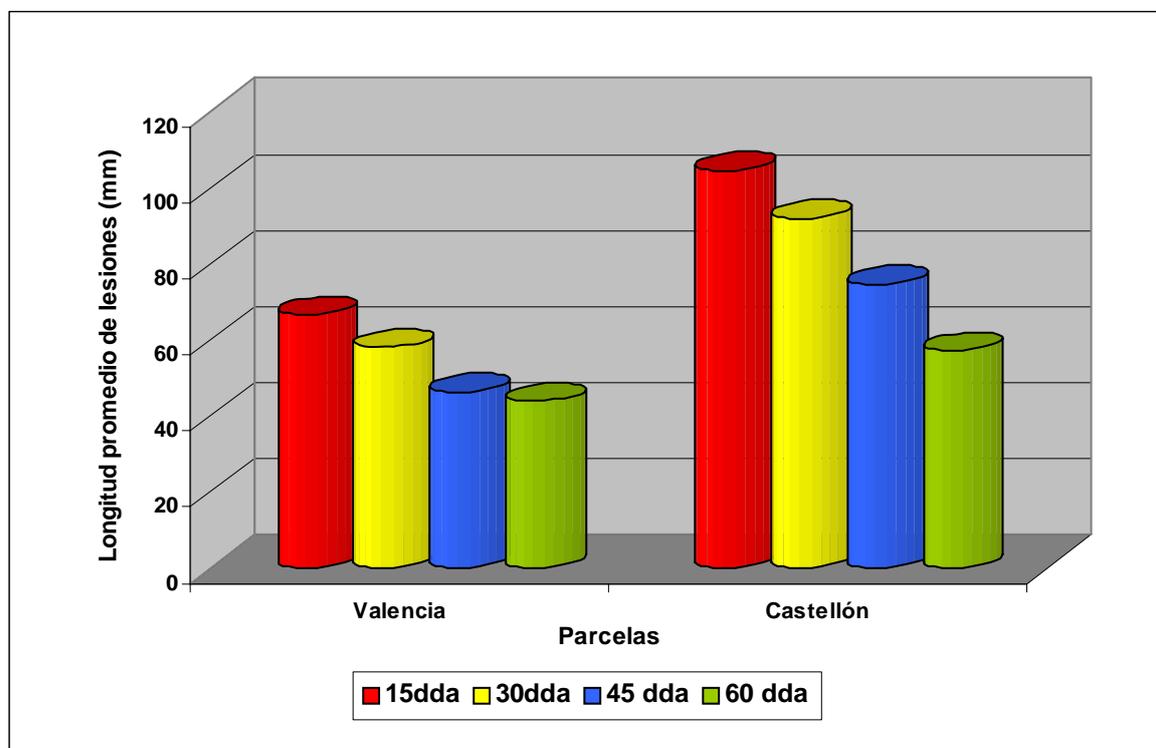


Figura 6.12. Fluctuación en la longitud promedio de las lesiones en ambas parcelas

ESTRATEGIAS CURATIVAS

a. INOCULACIÓN DE RAMAS

De las 4 evaluaciones previstas, la cuarta evaluación (60 dda) se suprimió debido a la existencia de grandes lesiones en las ramas inoculadas con el riesgo de que otras ramas principales y el tronco resultasen infectados. Todos los reaislamientos del patógeno sobre medio selectivo realizados a partir de lesiones en ramas de este ensayo fueron exitosos.

1. Parcela de Valencia

De acuerdo al análisis de varianza, no hubo diferencias significativas en ninguna de las evaluaciones en el factor tratamiento (**Tabla 6.8**). A excepción de MT y MR en la tercera evaluación, ningún tratamiento alcanzó el 50 % de control en las 3 evaluaciones (**Figura 6.13**). En el factor aislado sólo se hallaron diferencias significativas en la tercera evaluación (45 dda), causando el aislado Phy 033 mayores tamaños de lesión que Phy 051. No se encontraron diferencias significativas en la interacción tratamiento x aislado en ninguna de las evaluaciones.

Tabla 6.8. Ensayo 2: Evaluación del control en estrategias curativas. Ensayo de inoculación de ramas en la parcela de Valencia.

Fuente	Valor de <i>P</i>					
	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la evaluación					
	15		30		45	
Ef. principales						
A : Tratamiento	0,0739		0,0910		0,0507	
B : Aislado	0,3298		0,1021		0,0238	
Interacción						
A x B	0,2280		0,1774		0,2555	
Tratamientos ^V	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la evaluación					
	15		30		45	
	15	30	15	30	15	30
EF	44,80 ^W	5,78 ^X b ^Y	35,80	8,48 ab	42,02	6,53 ab
FF	21,57	7,76 b	45,55	7,19 ab	39,98	7,01 ab
FR	16,17	8,05 ab	43,47	7,46 ab	37,68	7,64 ab
MR	18,72	8,12 ab	29,55	9,30 a	55,35	5,24 b
ER	35,20	6,39 b	33,08	8,83 a	41,10	6,70 ab
MT	38,98	6,05 b	46,02	7,13 ab	58,45	4,10 b
FT	19,21	7,88 b	39,02	8,05 ab	38,73	6,43 ab
T	10,00 a		13,2 a		11,55 a	
Aislados						
Phy-051	7,57 ^Z a		7,86 a		5,71 b	
Phy-033	8,21 a		9,76 a		8,26 a	

^V EF: Experimental Foliar; FR: Fosetil Riego; MT: Metalaxil Tronco; ER: Experimental Riego; FF: Fosetil Foliar; MR: Metalaxil Riego; FT: Fosetil Tronco. T: Control.

^W % control.

^X Longitud de lesión (cm). Cada valor es media de 4 repeticiones.

^Y Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) a $P < 0,05$.

^Z Longitud de lesión en cm. Cada valor es media de 28 repeticiones exceptuando los valores del tratamiento testigo.

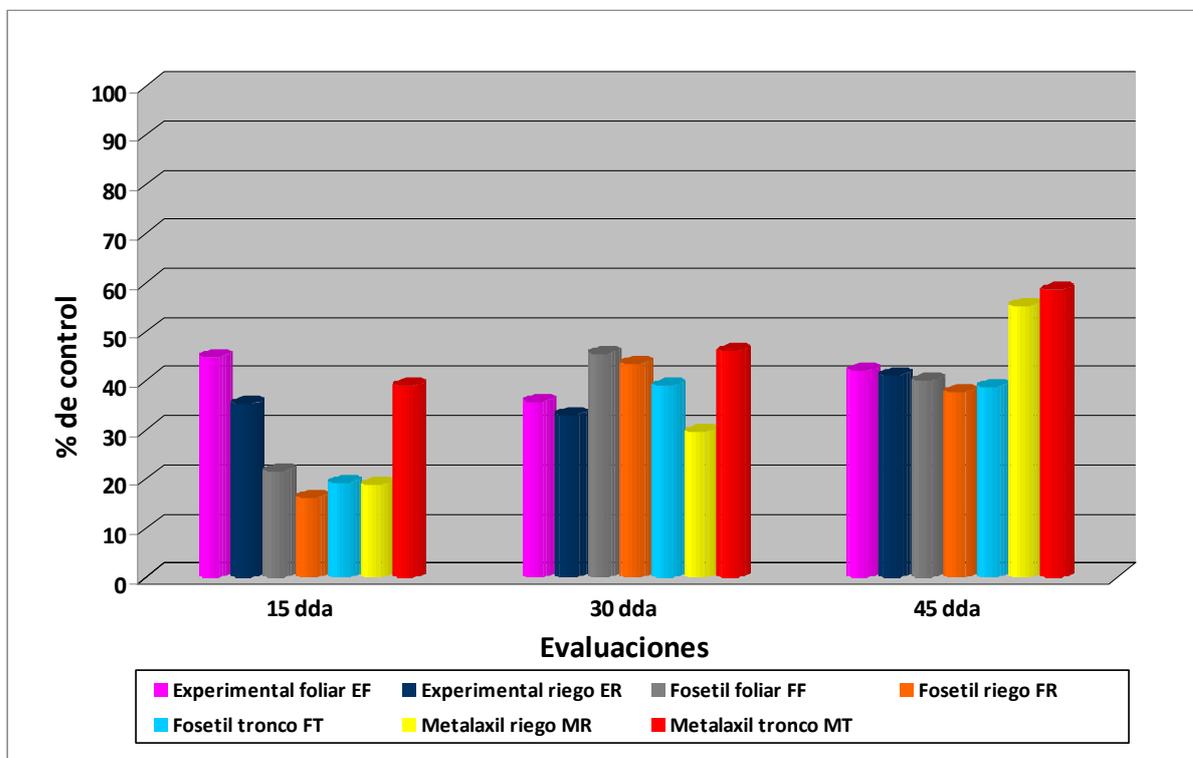


Figura 6.13. Ensayo 2. Estrategias curativas. Porcentajes de control en el ensayo de inoculación de ramas en la parcela de Valencia.

2. Parcela de Castellón

De acuerdo al análisis de la varianza, los resultados obtenidos indican que en el factor tratamiento existieron diferencias significativas en la segunda y tercera evaluación (30 y 45 dda). En la primera evaluación no hubo diferencias significativas entre tratamientos. En la segunda evaluación FT y MT fueron los mejores tratamientos y estadísticamente superiores a los demás, con promedios de longitud de lesión más bajos y en consecuencia con mayores porcentajes de control. En la tercera evaluación destacaron los tratamientos FF y MT, sin diferencias estadísticas entre ellos. Los tratamientos que obtuvieron los promedios de longitud de lesión más altos y por lo tanto, porcentajes de control más bajos fueron en general los tratamientos aplicados vía riego (Tabla 6.9, Figura 6.14).

En el factor aislado sólo se encontró diferencias significativas en la tercera evaluación, en la cual Phy 033 mostró un promedio de longitud de lesión mayor y estadísticamente superior que el aislado Phy 051. La interacción entre ambos factores estudiados no fue significativa (Tabla 6.9).

Tabla 6.9. Ensayo 2: Evaluación del control en estrategias curativas. Ensayo de inoculación de ramas en la parcela de de Castellón.

Fuente	Valor de P					
	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la evaluación					
	15		30		45	
Ef. principales						
A : Tratamiento	0,9423		0,0434		0,0366	
B : Aislado	0,0586		0,1362		0,0002	
Interacción						
A x B	0,3609		0,0832		0,6746	
Tratamientos ^v	% de control					
	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la evaluación					
	15		30		45	
EF	18,89 ^w	9,13 ^x a ^y	16,03	13,69 a	25,28	11,56 ab
FF	36,11	7,19 a	27,08	12,41 ab	44,62	8,56 c
FR	33,50	7,48 a	28,79	12,06 ab	18,40	12,65 ab
MR	32,41	7,61 a	30,24	11,81 ab	0,00	16,01 a
ER	27,22	8,19 a	33,00	11,48 b	6,44	14,46 ab
MT	34,17	7,41 a	45,24	9,19 bc	43,28	8,96 bc
FT	27,78	8,13 a	54,31	7,88 c	38,46	9,51 b
T	11,25 a		17,00 a		16,05 a	
Phy 051	7,46 ^z a		10,38 a		8,85 b	
Phy 033	8,73 a		11,90 a		14,56 a	

^v EF: Experimental Foliar; FR: Fosetil Riego; MT: Metalaxil Tronco; ER: Experimental Riego; FF: Fosetil Foliar; MR: Metalaxil Riego; FT: Fosetil Tronco. T: Control.

^w % control.

^x Longitud de lesión (cm). Cada valor es media de 4 repeticiones.

^y Números en columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) a P<0,05.

^z Longitud de lesión en cm. Cada valor es media de 28 repeticiones exceptuando los valores del tratamiento testigo.

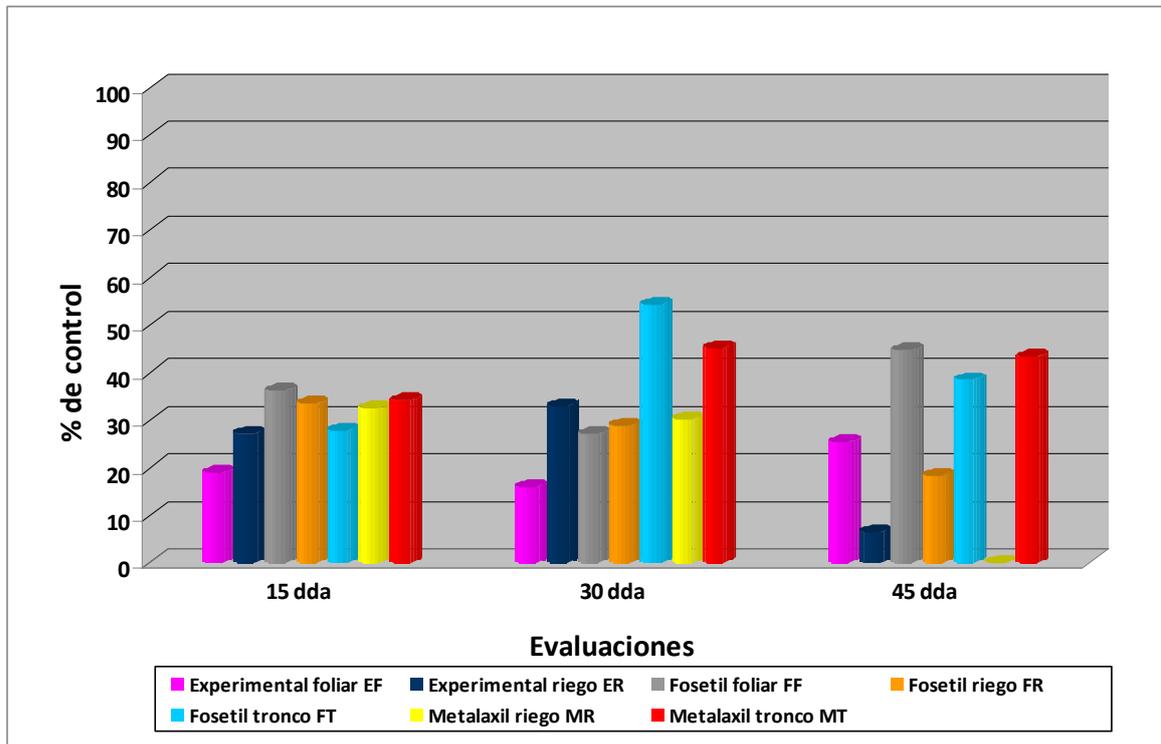


Figura 6.14. Ensayo 2. Estrategias curativas. Porcentajes de control en el ensayo de inoculación de ramas en la parcela de Castellón.

6.4. EFICACIA DE FUNGICIDAS EN APLICACIONES PREVENTIVAS A ÁRBOLES ADULTOS EN CONDICIONES DE CAMPO (ENSAYO 3).

6.4.1. INTRODUCCIÓN

Los resultados obtenidos del ensayo 2 en campo muestran que las estrategias de tipo curativo no son adecuadas para evaluar la eficacia de los fungicidas en campo. El mismo resultado se obtuvo con inoculaciones de estrías de corteza.

Considerando estos aspectos, en este experimento sólo se utilizaron estrategias de tipo preventivas y los fungicidas más promisorios del ensayo anterior. En este contexto, el objetivo de este ensayo fue optimizar el control de infecciones de *P. citrophthora* mediante una secuencia de aplicación de fungicidas, es decir, realizar dos aplicaciones de fungicidas en vez de una aplicación en un intervalo mensual previo a la inoculación del patógeno.

6.4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se condujo en una parcela de cultivar Hernandina injertada sobre citrange Carrizo, situada en el término municipal de Monserrat (Valencia), con árboles de 12 años de edad. Este experimento se desarrolló entre finales de primavera e inicios de verano de 2005. En este ensayo

se utilizaron los aislados Phy-033 y Phy-051 de *P. citrophthora*, utilizados en estudios previos, y los productos fosetil-Al (Aliette WG - Bayer CropScience), mefenoxam [Ridomil Gold 2.5 G (Concentrado Soluble) 48% p/v de mefenoxam - Syngenta] y el producto EXP 11074B [fosetil-Al; y AE C638206 (materia activa experimental-granulado dispersable en agua) - Bayer CropScience].

Los fungicidas se aplicaron siguiendo cuatro técnicas diferentes: al follaje mediante pulverización foliar, al sistema radicular por inyección del producto al suelo y por el sistema de goteo y, pintado a tronco y ramas. Los productos utilizados y dosis empleadas en el ensayo se muestran en la **Tabla 6.10**.

Tabla 6.10. Ensayo 3 (campo): Productos y dosis empleadas.

Técnica		Producto ¹		Dosis
Riego	Inyección al suelo y aplicación por el riego por goteo.	Fosetil-Al	(FR)	20,0 g m.a./árbol
		EXP11074B: - Fosetil-Al	(ER)	20,4 g m.a./árbol
		-AEC638206		1,32 g m.a./árbol
Pintado		Mefenoxam	(MP)	5,0 g m.a./L
Pulverización foliar		Fosetil-Al	(FF)	2,0 g m.a/L
		EXP11074B: -Fosetil-Al	(EF)	2,0 g m.a/L
		-AEC638206		0,53 g m.a/L

¹Aliette WG (Fosetil-Al 80%); Ridomil Gold (Metalaxil 25%); EXP11074B (Fosetil-Al 68% + AEC638206 4,4%).

Las aplicaciones vía pulverización foliar y pintado fueron similares a las del ensayo 2 en 2004 (**Tablas 10.33 a 10.37 en anexos**). Sin embargo, las aplicaciones al sistema radicular se realizaron de dos maneras distintas considerando las mismas dosis.

La primera fue mediante la inyección del producto al suelo, para ello se utilizó un equipo de pulverización hidráulica a través de la cual se aplicó la mezcla fungicida a presión al suelo. Mediante una pistola de inyección se realizaron seis aplicaciones del producto por unidad experimental (2 árboles), correspondiendo los puntos de inyección con las boquillas de riego por goteo, distribuyéndose el producto sobre los bulbos húmedos. La otra metodología fue mediante el sistema de riego por goteo (**Figuras 10.3 y 10.4 en anexos**). Antes de cada aplicación se hizo un riego con el objetivo de formar un bulbo húmedo en el suelo. Tras este riego se aplicó la mezcla con el fungicida. Después del tratamiento se realizó un último riego con la finalidad de que los productos aplicados no se quedaran cerca de la superficie del suelo. Los gastos originados por ambos sistemas de aplicación se muestran en las **Tablas 10.34 y 10.37 (en anexos)**.

Mediante las distintas técnicas de aplicación se hicieron una o dos aplicaciones de fungicida bajo las distintas modalidades descritas con un intervalo de 30 días entre la 1ª y 2ª aplicación. En la primera aplicación de fungicidas se trataron la mitad de los tratamientos y en la segunda aplicación se incluyeron todos los tratamientos, inclusive los tratados en la primera aplicación. Tratamientos con una aplicación coincidieron con la segunda aplicación de fungicidas.

Las inoculaciones se hicieron de acuerdo a lo descrito en el capítulo 2 (Apartado 2.2.5) en inoculaciones de árboles en campo. Teniendo en cuenta que cada unidad experimental estaba compuesta por dos árboles, a los 15 días de la segunda aplicación de fungicidas se inoculó la 1ª rama de cada árbol, a los 30 días la 2ª, a los 45 días la 3ª (**Figura 6.15**). En total se inocularon tres ramas por árbol durante el ensayo, haciéndose un total de 384 inoculaciones en el campo (128 árboles x 3 ramas/árbol). La evaluación se efectuó 30 días después de cada inoculación evaluando el área de lesión en cm² mediante el programa de análisis de imagen Assess. Se hicieron reislamientos del patógeno sobre medio PARBPH a partir de los tejidos afectados. La primera aplicación de fungicidas se realizó el 14 mayo y la segunda el 5 de junio de 2005.

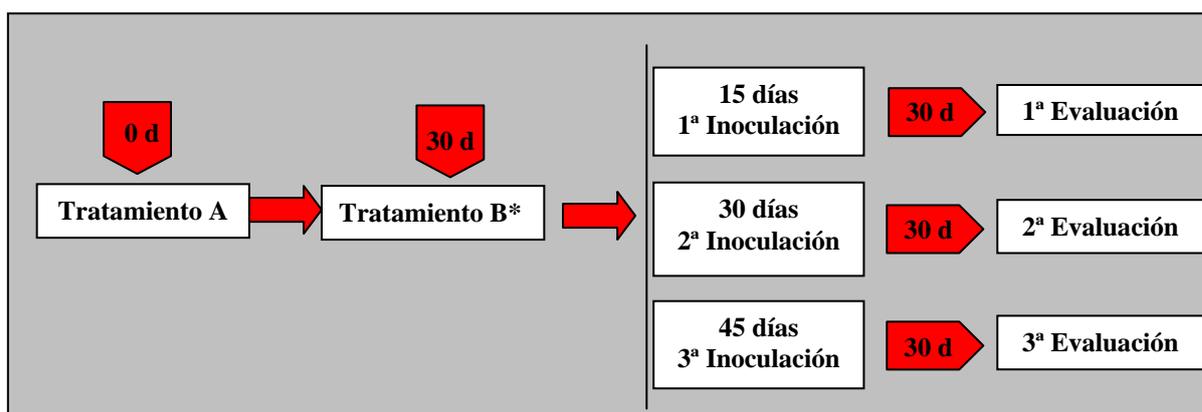


Figura 6.15. Esquema del ensayo de estrategias preventivas en campo (Ensayo 2005). *Cuando se hizo un solo tratamiento, este coincidió con el tratamiento B.

Se utilizó un diseño factorial con tres factores (producto, técnica y nº de aplicaciones) a dos niveles cada uno: De estos factores de estudio se obtuvieron:

- a. 6 combinaciones producto/técnica de aplicación (tratamientos): fosetil-Al vía riego (**FR**); fosetil-Al vía foliar (**FF**); producto experimental vía riego (**ER**); producto experimental vía foliar (**EF**); mfenoxam pintado ramas (**MP**); control no tratado o testigo (**T**).
- b. Dos aislados (Phy-033 y Phy-051) de *P.citrophthora*.
- c. Tratamientos con una o dos aplicaciones (**Tabla 6.11**).

Con estos factores de estudio se hizo un diseño en bloques completamente al azar con 16 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento. Las unidades experimentales (2 árboles), estuvieron separadas por un árbol barrera para prevenir la interferencia entre tratamientos. La **Figura 10.5** (en anexos) muestra los tratamientos (a colores) considerados para la primera aplicación, y en la **Figura 10.6** los tratamientos (a colores) para la segunda aplicación. Se puede observar que los tratamientos utilizados en la 1ª aplicación se vuelven a aplicar en la 2ª, obteniendo de esta manera tratamientos con 1 y 2 aplicaciones previo a las inoculaciones. Las unidades experimentales no coloreadas representan los tratamientos testigo (sin aplicación de fungicidas) y los tratamientos vía pintado a ramas, que se aplicaron al momento de la segunda aplicación.

Tabla 6.11. Ensayo 3 (campo): Intervalos de aplicación de las distintas materias activas.

Producto	Técnica de aplicación	Nº de aplicaciones
Fosetil-AI	Riego	1ª y 2ª aplicación
	Foliar	1ª y 2ª aplicación
Experimental	Riego	1ª y 2ª aplicación
	Foliar	1ª y 2ª aplicación
Mefenoxam	Pintado	1 aplicación

Para realizar el análisis estadístico los resultados se expresaron como área promedio de lesión en cm^2 , evaluando dos factores de estudio, tratamientos y aislados utilizados. Estos valores se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA), fijando el nivel de significación en $P < 0,05$. Con los factores que resultaron significativos en el análisis ANOVA se realizó un test de separación de medias utilizando el análisis LSD. El programa estadístico utilizado para el análisis fue el Statgraphics Plus 5.1. Se incluyó también los valores promedios del porcentaje de control de cada tratamiento, calculándose de la siguiente manera: $\% \text{ Control} = 100 - [(\text{Área de lesión} \times 100) / \text{Área de lesión del testigo}]$.

Debido a que en algunas tesis no se incluyó el aislado Phy 033 como factor de estudio, la separación de medias y significaciones de los tratamientos se realizaron en estudios separados. De esta manera se obtuvieron dos análisis separados acorde al estudio. En el **Análisis 1** no se consideraron los tratamientos que incluyeron el producto experimental. En este estudio se incluyó el aislado como factor de análisis. En el **Análisis 2**, se incluyó el producto experimental en todas sus formas de aplicación. En todos los tratamientos se consideró sólo al aislado Phy 051.

6.4.3. RESULTADOS

A). Análisis 1 (No se incluyó el producto experimental).

El análisis de la varianza ($P < 0,05$) para el factor tratamiento mostró diferencias significativas en todas las evaluaciones (**Tabla 6.12**). En la primera evaluación (15 dda), los mejores tratamientos fueron FF1 y MP, presentando los promedios de área de lesión más bajos y consecuentemente los mayores porcentajes de control (**Figura 6.16**). En segundo lugar se ubicaron los tratamientos FF2 y FR2 y, por último, el tratamiento FR1 quien no difirió significativamente del testigo. En la segunda evaluación (30 dda) el mejor tratamiento fue MP, y en segundo lugar se ubicaron los tratamientos FF1 y FF2. Por último, se agruparon los tratamientos FR1 y FR2 quienes no difirieron significativamente del testigo con los porcentajes de control más bajos. En la tercera evaluación (45 dda) destacó solamente el tratamiento MP. A excepción de FR2 quien no difirió estadísticamente del testigo y por lo tanto con el % de control más bajo, los demás tratamientos fueron estadísticamente similares, ubicándose todos en segundo lugar. Los resultados del estudio del factor aislado ($P < 0,05$) mostró que no existieron diferencias estadísticas significativas en

ninguna de las evaluaciones; sin embargo, el aislado Phy 033 presentó promedios de área de lesión mayores que Phy 051 en todas las evaluaciones (Tabla 6.12). Los resultados mostraron además que la interacción entre ambos factores de estudio no fue significativa.

Tabla 6.12. Ensayo 3: Porcentaje de control según tratamiento.

Fuente	Valor de P								
	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida v la inoculación								
	15		30		45				
Ef. principales									
A : Tratamiento	0,0135		0,0397		0,0430				
B : Aislado	0,2058		0,0644		0,1590				
Interacción									
A x B	0,4546		0,1156		0,2520				
Tratamiento ^w	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida v la inoculación								
	15		30		45				
	15		30		45				
FF1	74,33 ^x	1,81 ^y	c ^z	59,74	3,70	b	66,37	2,10	b
FF2	38,71	4,27	b	55,52	3,21	b	69,05	2,12	b
FR1	0,00	8,66	a	0,00	10,85	a	64,06	2,74	b
FR2	35,48	4,61	b	15,67	8,89	a	35,66	4,92	ab
MP	73,59	1,88	c	74,37	1,65	c	73,50	1,67	c
T	7,05		a	9,66		a	8,35		a
Aislados									
Phy 033	6,73 ^z		a	5,87		a	3,81		a
Phy 051	4,92		a	3,17		a	1,94		a

^w FF1: (fosetil foliar 1 aplicación), FF2: (fosetil foliar 2 aplicaciones), FR1: (fosetil riego 1 aplicación), FR2: (fosetil riego con 2 aplicaciones), MP: (mefenoxam pintado), T: Control.

^x % control.

^y Área media de lesión (cm²). Cada valor es media de 8 repeticiones.

^z Números seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo al análisis LSD (P<0,05).

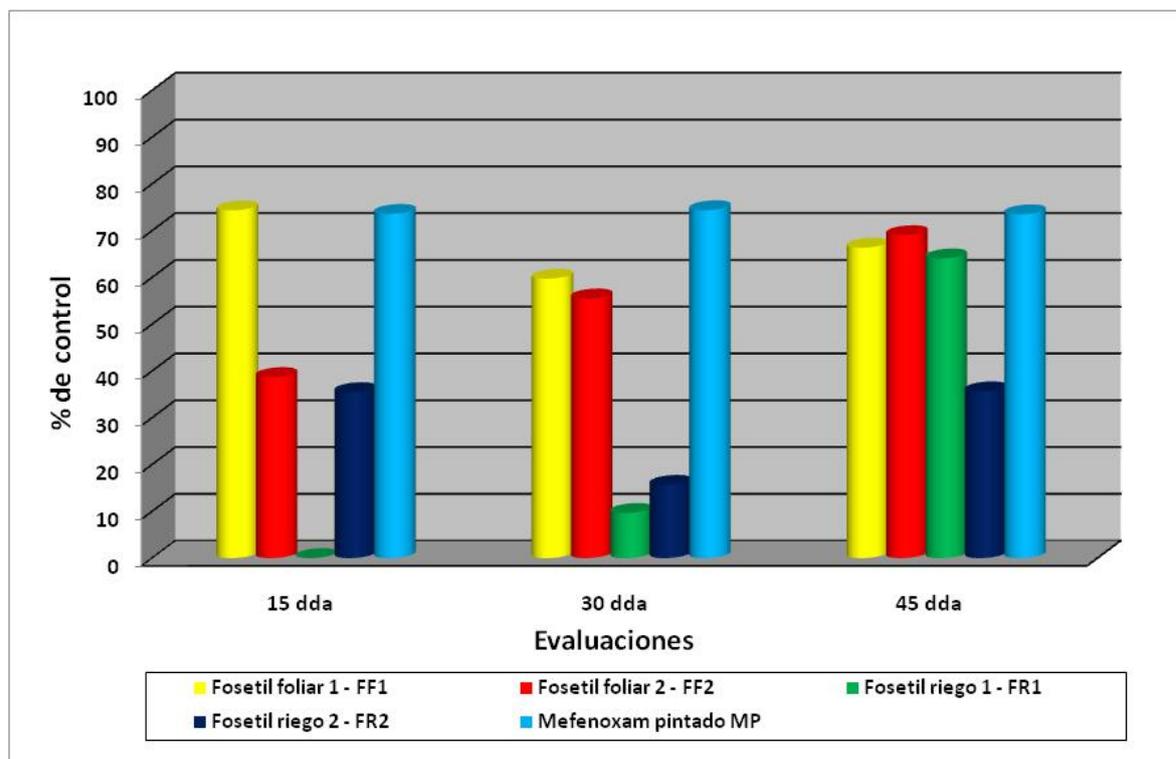


Figura 6.16. Porcentajes de control según los tratamientos. Análisis 1, Montserrat 2005.

b) Análisis 2 (Sólo se considera el aislado Phy 051)

De acuerdo al análisis de la varianza, los resultados de este ensayo indican que existieron diferencias estadísticas significativas en el factor estudiado en todas las evaluaciones efectuadas (**Tabla 6.13**).

La prueba de significación LSD ($P < 0,05$) indicó que en la primera evaluación destacaron los tratamientos MP, EF2, EF1, FF1, FR2 y ER1, con los promedios de área de lesión más bajas y sin diferencias estadísticas entre ellos. Estos tratamientos obtuvieron los porcentajes de control más altos. Seguidamente se ubicó el tratamiento FF2 y en tercer lugar los tratamientos ER2 y FR1 con los promedios de área de lesión más altos y con los porcentajes de control más bajos (**Tabla 6.13; Figura 6.17**). En la segunda evaluación se formaron dos grupos de tratamientos de acuerdo a su significación, el primer grupo estuvo compuesto por el MP y todos los tratamientos foliares, presentando los promedios de área de lesión más bajos y los mayores porcentajes de control. El segundo grupo estuvo formado por los tratamientos aplicados vía riego, con los promedios de área de lesión más altos y porcentajes de control nulos, sin diferencias estadísticas con el tratamiento control. En la tercera evaluación se observó que a excepción de los tratamientos FR2 y ER2 quienes no se diferenciaron significativamente del control, todos los demás tratamientos fueron estadísticamente similares.

Tabla 6.13. Ensayo 3: Porcentajes de control según los tratamientos.

Fuente	Valor de P					
	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación					
	15		30		45	
Factor						
Tratamientos	0,0022		0,0015		0,0295	
Tratamiento ^W	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación					
	15		30		45	
FR1	0,00 ^X	8,03 ^Y a ^Z	0,00	9,37 a	57,35	1,87 b
FR2	61,25	2,64 c	0,00	7,29 a	0,00	6,31 a
ER1	58,36	2,83 c	0,00	9,30 a	60,23	1,97 b
ER2	0,00	9,87 a	0,00	8,02 a	0,00	7,84 a
EF1	75,90	1,64 c	59,13	2,06 b	54,49	2,22 b
EF2	79,26	1,41 c	55,39	2,21 b	69,12	1,58 b
FF1	73,55	1,80 c	54,80	2,23 b	55,14	2,26 b
FF2	16,53	5,68 b	46,20	2,58 b	65,35	1,87 b
MP	81,38	1,27 c	69,68	1,63 b	67,79	1,77 b
T		6,80 a		6,04 a		5,39 a

^W FF1: (fosetil foliar 1 aplicación), FF2: (fosetil foliar 2 aplicaciones), FR1: (fosetil riego 1 aplicación), FR2: (fosetil riego con 2 aplicaciones), MP: (mefenoxam pintado), T: Control.

^X % control.

^Y Área media de lesión (cm²). Cada valor es media de 8 repeticiones.

^Z Números seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo al análisis LSD ($P \leq 0,05$).

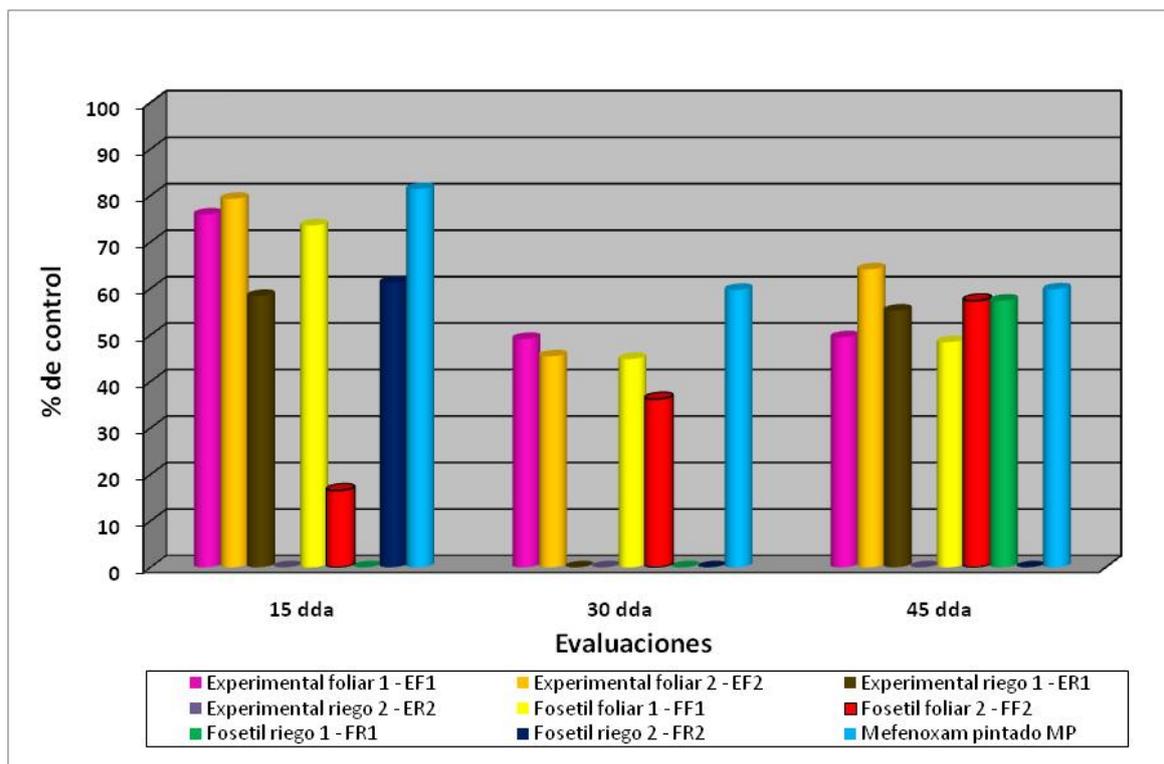


Figura 6.17. Porcentajes de control según los tratamientos. Análisis 2, Montserrat 2005.

6.5. EFICACIA DE FUNGICIDAS EN APLICACIONES PREVENTIVAS A PLANTONES JÓVENES EN CONDICIONES DE CAMPO (ENSAYO 4)

6.5.1. INTRODUCCIÓN

En relación a los resultados obtenidos en el ensayo 3 en árboles adultos en campo, el objetivo del presente ensayo fue continuar por un segundo año con el estudio de la secuencia de aplicación de fungicidas pretendiéndose evaluar la efectividad de los diferentes tratamientos sobre árboles jóvenes.

6.5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en una parcela ubicada en Benifaio (Valencia). A inicios de la primavera de 2006 se plantaron en esta parcela árboles de tres años de edad de la variedad Hernandina injertados sobre citrange Carrizo. Durante todo el experimento los plantones se regaron mediante riego por gravedad.

El campo experimental estuvo ubicado en una parcela de aproximadamente 2000 m² (63,5 m de largo x 31 m ancho). En esta área se instalaron 4 filas completas con surcos dobles cada una.

Cada surco doble se consideró como un bloque y la separación entre bloques fue de 5,5 m. Cada bloque (surco doble) estuvo compuesto por 20 parcelas experimentales equivalentes a 20 tratamientos diferentes. Cada parcela elemental constó de 3,60 m² (3,0 m de largo x 1,20 m de ancho). Cada parcela elemental constó de 6 plantas (3 plantas por surco doble). La distancia entre los grupos de plantas de cada tratamiento en un mismo bloque fue 2,0 m. (**Figura 6.18**).

Los aislados (Phy 033 y Phy 051) y los productos fungicidas utilizados, fueron los mismos que en el ensayo 3. Los fungicidas se aplicaron en plena brotación (finales de mayo e inicios de junio de 2006) siguiendo tres técnicas diferentes: pulverización foliar, vía inyección del producto al suelo y pintado a tronco. Los productos, dosis empleadas y número de aplicaciones por tratamiento se muestran en la **Tabla 6.14**.

Para la aplicación vía pulverización foliar se utilizó una mochila accionada manualmente con depósito de 17L. La aplicación vía pintado de ramas se hizo mediante pinceles y/o brochas impregnados con fungicida. La suspensión se aplicó pintando todo el tronco de los árboles con la concentración fungicida. La aplicación de los fungicidas al sistema radicular se realizó con una mochila de pulverización de pistón de 15 L, acoplada a un dispositivo inyector de cuatro salidas accionado mediante embrague manual, inyectándose el caldo a una profundidad máxima de 20 cm. El tiempo de accionado del embrague se calculó previamente para ajustar el volumen de salida del caldo. Los gastos originados de cada uno de los sistemas de aplicación se muestran en las **Tablas 10.38 a 10.42** (en anexos).

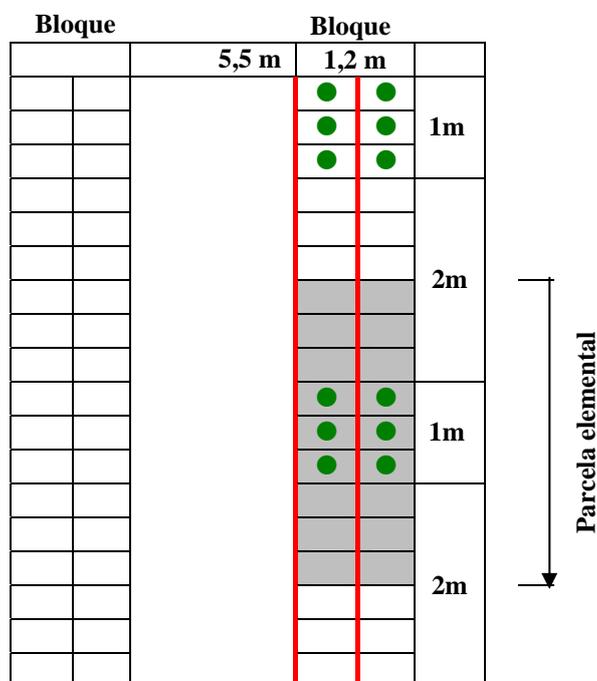


Figura 6.18. Croquis de una parcela elemental del ensayo 4.

Tabla 6.14. Ensayo 4 (campo). Productos y dosis empleadas.

Producto ¹	Técnica	Número de aplicaciones	Código de tratamiento	Dosis
Fosetil-Al 80%	Inyección	1	FR1	5,4 g m.a./árbol
		2	FR2	
	Pulverización foliar	1	FF1	44,0 g m.a./L
		2	FF2	
EXP11074B	Inyección	1	ER1	5,4 g m.a./árbol
Fosetyl-Al 68% +		2	ER2	
AEC638206 4,4%	Pulverización foliar	1	EF1	42,4 g m.a./L
		2	EF2	
Mefenoxam 48 %	Pintado	1	MT	5,0 g m.a./L
Testigo sin tratar			T	

¹Aliette WG (Fosetil-Al 80%); Ridomil Gold (Metalaxil 25%); EXP11074B (Fosetil-Al 68% + AEC638206 4,4%).

Mediante las distintas técnicas de aplicación, se hicieron dos aplicaciones de fungicida bajo las distintas modalidades con un intervalo de 20 días entre una 1ª y una 2ª aplicación.

El inicio del ensayo empezó con la primera aplicación de fungicidas a un grupo de tratamientos, quedando un grupo de estos sin tratar. A los 20 días del primer tratamiento, se realizó la segunda aplicación, en la cual además tratar nuevamente a los tratamientos de la primera aplicación, se aplicaron aquéllos que quedaron sin tratar. De esta manera hubo tratamientos con 1 y 2 aplicaciones de fungicidas. A los 15 días de esta segunda aplicación de fungicidas se inocularon las unidades experimentales correspondientes a los diferentes tratamientos, a los 30 días la segunda inoculación y a los 45 días la tercera. Cada unidad experimental estuvo compuesta por dos árboles. Los valores obtenidos de cada intervalo de inoculación fueron la media de área de lesión de los dos árboles inoculados de cada unidad experimental.

El proceso de inoculación fue similar al descrito en el capítulo 2 (Ensayo 2 del apartado 2.2.5). Discos de corteza de 5 mm de diámetro se extrajeron de los troncos de los árboles, aproximadamente a nivel del tercio medio de su longitud, y los discos de inóculo se colocaron en contacto directo con la herida. En el punto de inoculación se colocó un algodón humedecido con agua estéril, se sujetó con parafilm y se cubrió el conjunto con papel de aluminio para evitar la desecación.

Los resultados se evaluaron 15 días después de cada inoculación valorándose el área de lesión (cm²) de cada tratamiento mediante el programa de análisis de imagen Assess. A cada una de las lecturas se le restó el área de la inoculación inicial. En cada tratamiento y evaluación se hicieron reislamientos del patógeno sembrando tejidos infectados en medio selectivo PARBPH. En este ensayo, la primera aplicación de fungicidas se realizó el 9 de junio y la segunda aplicación el 26 de junio de 2006.

Se utilizó un diseño factorial con tres factores (producto, técnica y nº de aplicaciones) a dos niveles cada uno. De estos factores de estudio, se obtuvieron:

- a. Seis combinaciones producto/técnica de aplicación (tratamientos): fosetil-Al inyectado al suelo (**FR**); fosetil-Al vía foliar (**FF**); producto experimental inyectado al suelo (**ER**); producto experimental vía foliar (**EF**); mefenoxam pintado tronco (**MT**); control no tratado o testigo (**T**).
- b. Dos aislados (Phy-033 y Phy-051) de *P.citrophthora*
- c. Tratamientos con una o dos aplicaciones.

Basándose en estos factores de estudio, se realizó un diseño estadístico en bloques completamente al azar con 20 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento (**Figura 10.7**).

Los resultados se expresaron como área promedio de lesión en cm², evaluando dos factores de estudio, tratamientos y aislados utilizados. Estos valores se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA), fijando el nivel de significación en P<0,05. Con los factores que resultaron significativos en el análisis ANOVA se realizó un test de separación de medias utilizando el análisis de Fisher de la mínima diferencia significativa (LSD). El programa estadístico utilizado para estos análisis fue el Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics. Inc. Rockville – Maryland, USA).

En la tabla de resultados se incluyó también los valores promedios del porcentaje de control de cada tratamiento, calculándose dicho parámetro de la siguiente manera:

$$\% \text{ Control} = 100 - [(\text{Área de lesión} \times 100) / \text{Área de lesión del testigo}].$$

6.5.3. RESULTADOS

De acuerdo al análisis de la varianza, los factores aislado y tratamiento resultaron significativos en las tres evaluaciones (**Tabla 6.15**). Su interacción sólo fue significativa en la segunda evaluación, por lo que el test de separación de medias para esta fecha de evaluación se realizó por separado para cada uno de los aislados. El aislado Phy 051 presentó mayores tamaños de lesión en la primera evaluación y el Phy 033 en la tercera evaluación.

Los tratamientos aplicados vía riego no resultaron significativamente diferentes del testigo en ninguna de las tres evaluaciones, a excepción de FR1, ER1 y ER2 en la segunda evaluación con el aislado Phy 051.

Las áreas de lesión obtenidas con los tratamientos foliares del tratamiento EF fueron significativamente menores que los registrados en el testigo en todos los casos, excepto EF2 en la segunda evaluación con el aislado Phy 033. Estos tratamientos obtuvieron los porcentajes de control más altos (**Figura 6.19**). Los tratamientos FF1 y FF2 también mostraron tamaños de lesión significativamente menores que el testigo, excepto FF2 en la primera evaluación y FF1, FF2 y EF2 en la segunda evaluación con el aislado Phy 033.

Tabla 6.15. Ensayo 4. Porcentaje de control según tratamiento. Parcela Benifaio 2006.

Fuente	Valor de P					
	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación					
	15		30		45	
Ef. principales						
A: Tratamiento	0,0238		0,0000		0,0000	
B: Aislado	0,0438		0,0001		0,0000	
Interacción						
A x B	0,1697		0,0175		0,3360	

Tratamientos ^W	Días transcurridos entre el tratamiento fungicida y la inoculación										
	15			30			45				
				Phy 033		Phy 051					
EF1	66,56 ^X	0,29 ^Y	a ^Z	73,8	0,15	a	0,27	ab	93,28	0,15	a
EF2	60,59	0,34	ab	74,1	0,22	ab	0,13	a	89,98	0,25	ab
ER1	0,00	0,96	e	0,00	0,80	de	0,41	ab	26,98	1,53	cde
ER2	23,89	0,78	abcde	0,00	0,84	de	0,39	ab	26,61	1,61	e
FF1	52,54	0,41	abc	53,6	0,65	cde	0,10	a	64,39	0,91	bcd
FF2	45,32	0,46	abcd	52,5	0,37	abc	0,17	a	64,60	0,90	bc
FR1	12,84	0,81	bcde	1,74	1,04	e	0,29	ab	28,56	1,54	cde
FR2	16,41	0,84	cde	0,00	0,97	de	0,62		28,40	1,58	de
MP	53,84	0,40	abc	73,7	0,25	abc	0,08	a	88,79	0,25	ab
T		0,94	de		0,60	bcd	0,84		2,16		e

Aislados		
Phy 033	0,51	a
Phy 051	0,74	b

^W FF1: (fosetil foliar 1 aplicación), FF2: (fosetil foliar 2 aplicaciones), FR1: (fosetil riego 1 aplicación), FR2: (fosetil riego con 2 aplicaciones), MP: (mefenoxam pintado), T: Control.

^X % control.

^Y Área media de lesión (cm²). Cada valor es media de 8 repeticiones.

^Z Números seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo al análisis LSD (P<0,05).

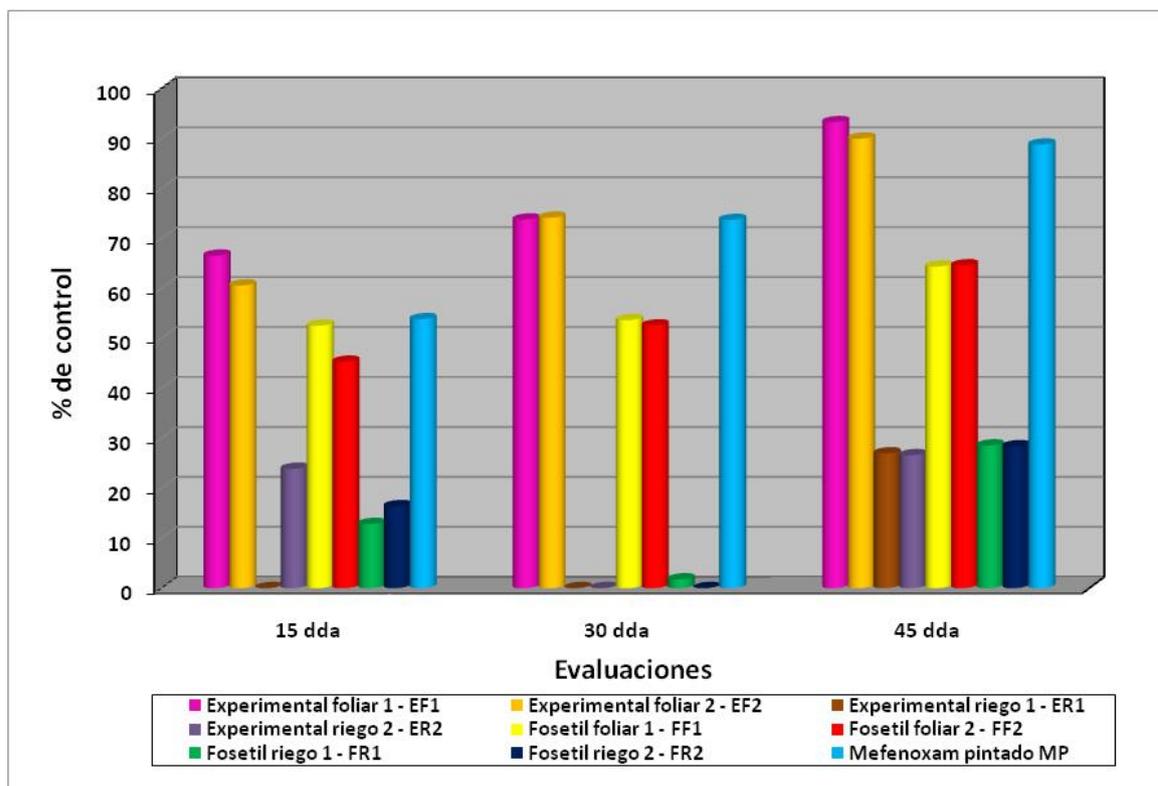


Figura 6.19. Porcentajes de control según tratamientos. Benifaio, 2006.

Mefenoxam aplicado al tronco redujo significativamente el tamaño de la lesión respecto al testigo, excepto en la segunda aplicación con el aislado Phy 033. Los tratamientos con dos aplicaciones no mejoraron significativamente la eficacia de los tratamientos con una única aplicación.

En la tercera evaluación se registraron los mayores tamaños de lesión en el testigo. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos aplicados mediante pulverización foliar mantuvieron un buen nivel de control y presentaron tamaños de lesión muy pequeños, de un orden de magnitud similar a los obtenidos en las dos evaluaciones anteriores.

6.6. DISCUSIÓN

En un período de 3 años de ensayo, se examinó bajo condiciones de invernadero y campo la eficacia de fungicidas sistémicos para el control de infecciones de ramas de cítricos por *P. citrophthora*. Los resultados obtenidos proporcionan nueva información sobre las limitaciones que se presentan en las zonas citrícolas del país para establecer un efectivo sistema de manejo contra las infecciones de ramas ocasionadas por el patógeno.

La técnica de inoculación adoptada en este estudio ha sido usada extensivamente en trabajos previos con *P. citrophthora* y *P. parasitica* (Davis, 1982; Matheron y Matejka, 1988; Matheron y Porchas, 2002) y es recomendada por la EPPO para evaluar la eficacia de fungicidas contra *Phytophthora gummosis* (Anónimo, 1988).

Las estrategias de control usadas para evaluar la capacidad de cada tratamiento en suprimir el desarrollo de las lesiones mostraron que la actividad curativa de los tratamientos no fue satisfactoria. Todos los tratamientos utilizados en aplicaciones post-infectivas fueron inefectivos en el control de las infecciones en ramas. Al momento de la aplicación de fungicidas varias ramas inoculadas mostraron marchitez, algunas de ellas con lesiones de alrededor de 10 cm de longitud. Este resultado confirma las observaciones previas en lo referente a la rapidez de desarrollo de las infecciones bajo nuestras condiciones. De acuerdo a estos resultados, podría deducirse que infecciones naturales en campo que tengan alrededor de 3 a 4 semanas de desarrollo serían difíciles de controlar bajo las metodologías de aplicación de fungicidas comúnmente utilizadas.

Tuset *et al.*, (2003) evaluaron la actividad fungitóxicas *in vivo* de diferentes formulados de ácido fosforoso a infecciones de raíces de cítricos mediante zoosporas de *P. citrophthora*. Sus resultados mostraron que los tratamientos fungicidas seguidos de la inoculación del patógeno fueron altamente efectivos en reducir las infecciones en las raíces que los tratamientos aplicados después de 72 horas de estar sometidas las raíces a una suspensión de zoosporas.

Consistente con los resultados de este trabajo previo, nuestro estudio mostró que las estrategias preventivas de aplicación de fungicidas proporcionaron un medio útil para evaluar la

efectividad de los tratamientos. Los fungicidas metalaxil o mefenoxam aplicados por pintado fueron altamente efectivos en el control de infecciones de *P. citrophthora*, confirmando los resultados de trabajos previos sobre su efectividad (Farih *et al.*, 1981; Davis, 1982; Timmer y Castle, 1985; Matheron y Matejka, 1988; Matheron y Porchas; 2002).

La utilización de mefenoxam proporcionó resultados similares al metalaxil en los ensayos en donde se evaluó su eficacia. El mefenoxam es un fungicida de reciente introducción al mercado español, y su eficacia viene precedida por diversos estudios sobre enfermedades radiculares (Tsor *et al.*, 2005; Stiles, *et al.*, 2005); y sobre las partes aéreas de la planta por oomicetos patógenos (Rebollar-Alviter, 2005). Estudios sobre la eficacia del mefenoxam en cítricos realizados por Matheron y Porchas (2002) muestran que este fungicida inhibió lesiones de *P. citrophthora* sobre estrías tratadas en un 100%. Resultados similares de porcentajes de control a los de este estudio fueron obtenidos con mefenoxam por Browne y Viveros (2005) en aplicaciones tópicas a chancros causados por *P. cactorum* y *P. citrícola*, reduciendo su expansión en un 36 - 88%.

Bajo condiciones controladas en invernadero, todos los tratamientos mostraron porcentajes de control superiores al 50 %, con promedios de área de lesión bastante bajos. Esto podría deberse al menor tamaño de las plantas, lo cual suele maximizar la eficacia de determinados compuestos. Otra razón sería que bajo condiciones controladas, los parámetros que inciden directamente sobre el patógeno, tales como la temperatura y la humedad, son manejables.

En los experimentos donde se utilizó, fosetil-Al aplicado por pintado fue tan efectivo como metalaxil en el control de infecciones de *P. citrophthora* en árboles jóvenes en invernadero. Sin embargo, este mismo tratamiento no fue tan efectivo para limitar las infecciones sobre árboles adultos. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Farih *et al.* (1981) y Matheron y Porchas (2002), quienes encontraron que fosetil -Al aplicado directamente al tallo de plantas jóvenes fue tan efectivo como metalaxil al inhibir el crecimiento de las lesiones. Es probable que las diferencias de efectividad entre árboles jóvenes y adultos a este fungicida en aplicaciones tópicas estén relacionadas con la absorción y movimiento del producto dentro de la planta como consecuencia del grosor de la corteza del árbol.

La cirugía de los chancros es una práctica que los agricultores utilizan para eliminar tejidos afectados con la intención de curar árboles enfermos. Para el control de infecciones de chancros en ramas en árboles en campo se recomienda el uso de esta técnica seguida por una aplicación tópica de metalaxil o mefenoxam para detener el avance de las infecciones por el patógeno. Aunque el pintado es una técnica promisoriosa para el control de infecciones de *P. citrophthora*, esta práctica es laboriosa y resulta económicamente inviable cuando se intenta hacer a gran escala (Davis, 1982). Alternativamente a los tratamientos mediante pintado, Schutte *et al.* (2006) han implementado un método de aspersión de productos fungicidas dirigidos al tronco y ramas y que tienen un menor coste económico y de labor. Sin embargo, los árboles previamente deben ser podados para descubrir la zona del tronco y las ramas principales de la copa.

Los datos obtenidos de los diversos experimentos durante 3 años de estudio muestran una relación entre la efectividad de los tratamientos con las fechas de aplicación de fungicidas y la edad del árbol.

En el primer caso, el tamaño medio de lesiones obtenidas en 2004 en todos los campos de ensayo, mostró una amplia variabilidad de respuestas a las aplicaciones de fungicidas, principalmente de aquellos que requirieron de una traslocación del producto dentro de la planta. Esto indicaría que el pobre efecto exhibido por estos productos fue una consecuencia de su limitado movimiento o traslocación, y que las aplicaciones a inicios y a mediados de primavera tendrían un efecto restringido. Resultados obtenidos en 2005 y 2006 aparentemente concuerdan con esta hipótesis. Los experimentos cuyas aplicaciones de fungicidas fueron durante el mes de mayo o antes, mostraron una débil respuesta al ser evaluada su eficacia. Sin embargo, cuando estas aplicaciones coincidieron con el mes de junio (al final de la primavera) se pudo observar una eficacia mayor de los tratamientos.

La técnica de inoculación de estrías de corteza fue inefectiva para evaluar la eficacia de los diversos tratamientos empleados. Un motivo que explique estos resultados puede ser que la metodología utilizada no haya favorecido a los productos que requirieron de una reacción interna de la planta para efectuar su acción fungicida. Estos resultados difieren de los obtenidos por Matheron y Matejka (1988) y Matheron y Porchas (2002), quienes indicaron que con esta técnica se podía evaluar el efecto de los fungicidas sobre infecciones ocasionadas por *Phytophthora*.

Existen algunas referencias que indican que la actividad de los productos sistémicos en el control de las infecciones por el patógeno está ligada a la edad del árbol. Davis (1982) indicó que la asimilación y el movimiento de fosetil-Al aplicado por pulverización foliar fue más eficiente sobre árboles jóvenes de dos años de edad que sobre árboles de 5 años en campo. En contraste a los resultados obtenidos por Davis, nuestros resultados en invernadero con árboles jóvenes mostraron que aplicaciones foliares de fosetil-Al no fueron muy efectivas. Sin embargo, el producto experimental presentó muy buena actividad bajo estas condiciones, indicando que tendría más ventaja que el fosetil-Al en la asimilación por la planta y el movimiento en su interior.

Los bajos porcentajes de control del fosetil-Al en árboles adultos a nivel de campo pueden deberse a diversos factores. Uno de ellos podría ser la variabilidad en la asimilación del fungicida por los diferentes tejidos dentro de la misma especie de cítricos, o por diferencias en la asimilación entre diferentes especies de cítricos (Brown *et al.*, 2004).

Davis (1982) indicó que era necesario hacer más de dos aplicaciones de fungicidas para obtener un mejor control de las enfermedades ocasionadas por *Phytophthora*. Él consideró que los momentos apropiados de aplicación podrían mejorar la efectividad de productos tales como el fosetil-Al, debido a que la pequeña cantidad de actividad encontrada en algunos tratamientos podría indicar problemas con la asimilación foliar del producto, traslocación basipétala o ambos casos.

Los resultados obtenidos de dos aplicaciones consecutivas de fungicidas no mostraron una mejora en la eficacia del tratamiento en relación a una aplicación de fungicidas. Creemos que como sucedió en anteriores experimentos, la eficacia de la primera aplicación de fungicidas no fue efectiva al hacerse en el mes de mayo, siendo por tanto la más efectiva la segunda aplicación que coincidió con el mes de junio.

De acuerdo a los resultados del presente estudio, una aplicación foliar preventiva a finales de mayo o a inicios de junio proporcionaría una protección sustancial contra las infecciones en ramas por *Phytophthora*. El efecto fungicida y las altas temperaturas producidas en verano controlarían satisfactoriamente las infecciones producidas en primavera, disminuyendo la presión de inóculo del patógeno para los meses de otoño. Se ha observado (Capítulo 4) que las condiciones para el desarrollo de infecciones en otoño comienzan a finales de septiembre. Aunque estas lesiones son rápidamente influenciadas por la bajada de temperaturas y el período de reposo del árbol, sería también necesaria una aplicación de fungicidas en este período para el control de las infecciones y reducir efectivamente la presión de inóculo.

Tres años de experimentos permitieron establecer que las formulaciones fungicidas aplicadas al suelo vía sistema de riego, inyección o “drench”, no fueron efectivas en reducir las infecciones por *P. citrophthora* sobre las ramas inoculadas. La degradación microbiana, fotodescomposición y lixiviación son las principales rutas de disipación del metalaxil cuando es aplicado al suelo. También, este fungicida tiende a migrar a horizontes de suelo más profundos, particularmente en suelos con baja materia orgánica y contenido de arcilla (Sukul y Spiteller, 2000). Es posible que algunos de estos factores puedan también afectar al fosetil-Al o al producto experimental cuando son aplicados al suelo, además de los factores relacionados a la asimilación y transporte del producto en el interior de la planta.

En nuestro estudio, las aplicaciones de fungicidas se programaron para que coincidieran con las brotaciones de primavera para maximizar la translocación de los productos. Sin embargo, las brotaciones de raíces no necesariamente coinciden con el crecimiento de brotes (Bevington y Castle, 1985) y la absorción de fungicidas desde el suelo podría haberse afectado. En cualquier caso, es necesario determinar la dinámica de los fungicidas desde el suelo a las ramas inoculadas bajo las condiciones en que se cultivan los cítricos en España para validar esta hipótesis.

Actualmente, los pocos productos antioomicetos disponibles en el mercado han desarrollado diversas formulaciones de sus productos para ser aplicadas vía sistema de riego por las facilidades logísticas y económicas que reportan al agricultor. Nuestro estudio indica que esta vía de aplicación de fungicidas no es la más apropiada para el manejo de esta enfermedad.

En los experimentos conducidos en campo, se observó una disminución progresiva en el tamaño de la longitud de las lesiones en las ramas inoculadas en función de las épocas de evaluación cuando la aplicación de fungicidas y la mayoría de inoculaciones coincidieron con la primavera (Ensayos en campo en 2004 y 2005). Esta disminución del tamaño de las lesiones puede

estar relacionada con las condiciones medioambientales prevalecientes en el intervalo de la evaluación de resultados. Esto se debe a que hubo un aumento progresivo de la temperatura y una disminución de la pluviometría, características típicas de finales de primavera e inicios del verano en climas mediterráneos. Estas condiciones son adversas para el crecimiento de *P. citrophthora* y su influencia ha sido previamente señalada (Erwin y Ribeiro, 1996; Matheron *et al.*, 1997; Dirac *et al.*, 2003).

Respecto a los aislados, los resultados obtenidos de los diversos experimentos muestran que el aislado Phy-033 tuvo tendencia a ser más agresivo que el aislado Phy-051 aunque en la mayoría de los experimentos realizados no hubo diferencias significativas entre ellos. Las diferencias de agresividad entre aislados pueden ser debidas a factores tales como el componente genético (Cohen *et al.*, 2003), que bajo ciertas circunstancias incidiría en una mayor agresividad del mismo, el componente genético del hospedante (si es susceptible, tolerante o resistente al patógeno), el cultivar, la edad de la planta, condiciones medioambientales como la temperatura, humedad relativa y el agua libre y la época y zona de inoculación en el árbol.

Los trabajos de investigación conducidos en España sobre el control químico de *Phytophthora* spp. en cítricos son escasos. Tuset y Sánchez (1988) y Tuset *et al.*, (2003) hacen referencia al control de la “gomosis”, “podredumbre de la base del tronco y cuello de la raíz”, “podredumbre de raíces absorbentes” y “aguado de frutos” y recomiendan tres aplicaciones de fungicidas para este tipo de afecciones. Los autores indican que debe realizarse un primer tratamiento después de la primera brotación de primavera, a los 10 ó 20 días de su inicio con fosetil-Al a la dosis comprendida entre 0,2 - 0,3% de producto comercial. Si el producto utilizado es metalaxil, se debe aplicar al suelo a la dosis de 30 g/m² a 50 g/m², repartido por la zona de goteo de árboles afectados y en la misma época. El segundo tratamiento debería hacerse durante la brotación de verano, con los mismos productos y dosis, y un tercer tratamiento a los dos o tres meses del anterior (septiembre – octubre), con los mismos productos y dosis. Los autores recomiendan además hacer la aplicación de fungicidas mediante pulverización o pintado de los chancros y para saneamiento, la cirugía.

Las recomendaciones de manejo de la enfermedad de chancro en ramas de cítricos que podríamos hacer en función de nuestros resultados, distan sutilmente de las recomendaciones arriba mencionadas. Esto indica que esta nueva enfermedad requiere de condiciones más específicas de control que las recomendaciones comúnmente generalizadas para enfermedades ocasionadas por *Phytophthora* al tratarse de patosistemas diferentes.

Capítulo 7
Discusión General

7. DISCUSIÓN GENERAL

Los estudios sobre la etiología de esta enfermedad han permitido describir por primera vez el síndrome de chancros en ramas de cítricos en España, identificándose a *P.citrophthora* como el agente causal de la enfermedad de acuerdo a los diferentes ensayos de patogenicidad realizados. La enfermedad está distribuida en las principales zonas productoras de cítricos del país, siendo las mandarinas Clementinas y sus híbridos los cultivares más afectados. Este hecho ha sido demostrado en los diferentes apartados de este trabajo de investigación (Capítulos 2, 3 y 4).

Las evidencias encontradas en lo referente a la aparición de esta nueva enfermedad en cítricos apuntan a la influencia de varios factores. En primer lugar, si consideramos el factor hospedante podemos observar que en los últimos años se ha producido un aumento considerable en la superficie de cultivo de Clementinas y sus híbridos en España pasando de 8 000 ha en 1965 a más de 100 000 ha en 2005 (González-Sicilia, 1968; F.A.O. 2006). Probablemente este síndrome haya estado presente desde hace tiempo, pero ha sido recientemente más evidente por las grandes áreas de Clementinas sembradas.

En segundo lugar, el riego por goteo en las parcelas de cítricos podría estar también asociado directa o indirectamente a la presencia de la enfermedad. De manera directa, al haber todo el año condiciones de humedad, inclusive en épocas tradicionalmente secas como el verano, favorecería que las poblaciones de *P. citrophthora* en el suelo se mantuvieran constantes, incidiendo en su adaptabilidad a nuevas condiciones medioambientales. Indirectamente, estas condiciones de permanente humedad incidirían en un incremento en la población de los caracoles y de propágulos de *Phytophthora*, viéndose mayormente favorecidas por las condiciones medioambientales de la primavera. Es en esta época, favorable para el desarrollo de ambos organismos, donde se produciría el transporte de propágulos de oomicetos por los caracoles.

A nivel mundial existen escasas referencias de enfermedades de similar etiología; sin embargo, en Sudáfrica se viene presentando una enfermedad similar en Clementinas asociada a *P. citrophthora* (Schutte, 2006). Asimismo, enfermedades de similar etiología a la descrita en este trabajo han sido observadas en Argentina y Brasil (Schutte y Ventura, respectivamente; comunicación personal) Esto indicaría que esta nueva enfermedad está presente en otras zonas cítricas importantes a nivel mundial.

El estudio molecular de los aislados mostró una alta variabilidad genotípica; sin embargo, casi el 90 % de la población se agrupó en un solo patrón de aislados sexualmente estériles. La alta variabilidad encontrada indicaría por un lado que la población de *P. citrophthora* en cítricos es antigua y en plena evolución. Por otro lado, el hecho que la gran mayoría de aislados se agrupe en una subpoblación mayoritaria indicaría que la evolución es lenta y condicionada quizás a factores de presión de selección al no haber reproducción sexual.

El estudio de las características morfológicas y fisiológicas de los aislados de *P. citrophthora* estudiados mostró también una alta variabilidad de sus estructuras asexuales, así como de sus temperaturas óptimas de crecimiento, confirmando lo observado en el análisis molecular.

Se encontró que varios aislados de *P. citrophthora* presentaron sensibilidad intermedia y resistencia al metalaxil y al nuevo fungicida mefenoxam. Ésta vendría a representar la primera evidencia de insensibilidad a las acilalaninas por *P. citrophthora* y la primera cita de resistencia cruzada con el mefenoxam. En los municipios en los cuales se ha detectado resistencias a estos fungicidas o los lugares en donde se ha detectado riesgo de insensibilidad debido a los altos valores de CE_{50} de estos fungicidas, debería limitarse su aplicación.

No se ha podido asociar ningún carácter morfológico con características genéticas o de resistencia a fungicidas dentro de la población de *P. citrophthora*. Dentro de las características fisiológicas, la temperatura óptima de cada aislado tampoco se asoció a una característica genética. Sin embargo, el único carácter fenotípicamente estable para asociar un cambio en el genotipo de los aislados fue el patrón de crecimiento de las colonias. La mayoría de los patrones genéticos encontrados mediante RAMS se correspondió con un patrón de crecimiento de colonia. Alrededor del 90 % de los aislados pertenecientes al P - 1 tuvieron patrones de colonia tipo petaloide o semi-petaloide. Los demás grupos poblacionales se correspondieron con diversos patrones de colonia desde: sin patrón de crecimiento hasta radiada.

Los resultados de los apareamientos indican que el 99,4 % de los aislados de *P. citrophthora* estudiados son sexualmente estériles, desechando la hipótesis de que nuevos genotipos pudieran haber evolucionado a través de la reproducción sexual y estar ligados a este nuevo síndrome. No se ha encontrado aislados de *P. citrophthora* con un patrón genético definido ligado a los chancros en ramas de cítricos: aislados obtenidos de suelo, raíces, ramas y frutos pertenecen mayoritariamente al P-1 y, aislados con patrones diferentes también se han encontrado asociados a chancros en ramas de cítricos.

No se encontró diferencias entre los dos grupos genotípicamente distintos de *P. citrophthora* utilizados para establecer patogenicidad diferencial entre patrones y variedades. A diferencia de los resultados obtenidos por Vernière *et al.* (2004) quienes manifiestan que los antiguos aislados estériles son más agresivos a patrones que a variedades y que los aislados heterotálicos lo son más a variedades que a patrones, la población española de *P. citrophthora* está compuesta casi totalmente de aislados sexualmente estériles y es muy agresiva a las variedades.

Con las evidencias encontradas no se ha podido demostrar que esta enfermedad sea consecuencia de un proceso de presión de selección o como consecuencia de procesos de migración y recombinación, hipótesis citadas al inicio de este estudio.

Los estudios de epidemiología mostraron que los meses de primavera (marzo, abril y mayo) son los más favorables para las infecciones por *P. citrophthora*. Salvo los resultados obtenidos con algunos cultivares de cítricos como por ejemplo Hernandina, los meses de verano

son más favorables a las infecciones por *P. parasitica*. Otra época donde *P. citrophthora* es activa es en los meses de otoño; no obstante, las infecciones producidas en primavera son más importantes en términos de épocas de susceptibilidad del hospedante y consecuentemente de la severidad de las lesiones producidas por el patógeno.

Aunque *P. parasitica* tuvo un limitado desarrollo de lesiones inclusive desde finales de octubre, ambas especies presentaron sus tasas de infección más bajas en invierno (diciembre, enero y febrero). El uso de varetas cortadas para evaluar la dinámica estacional de lesiones y agresividad entre especies de *Phytophthora* fue limitada en la consecución de estos objetivos, dando resultados erráticos y poco fiables comparados con los obtenidos en campo.

Se encontró que la temperatura y la HR media de las máximas fueron los factores medioambientales que más influyeron en la dinámica estacional de lesiones en ramas por especies de *Phytophthora*. La lluvia y el agua libre en la copa del árbol no influyeron en la dinámica estacional de lesiones; sin embargo, su influencia podría ser importante en el crecimiento de lesiones en periodos concretos en primavera u otoño. El contenido relativo de agua (CRA) es un factor ligado al hospedante de gran influencia también en la dinámica estacional de lesiones en cítricos. Esta información, así como la obtenida de las variables medioambientales, podría utilizarse para predecir los momentos más oportunos para las infecciones por el patógeno y por tanto, implementar las medidas de control más oportunas.

Se logró demostrar que caracoles y hormigas eran capaces de transportar propágulos de oomicetos desde el suelo hacia las partes aéreas de la planta. El caracol *Helix aspersa* fue la única especie asociada al transporte de inóculo tanto de *Phytophthora* como de *Pythium*, y hormigas del género *Lasius* sólo de *Pythium*. Este resultado evidencia el posible papel de estos invertebrados en el transporte y diseminación de propágulos de *Phytophthora* desde el suelo hacia la copa de los árboles y por ende, de la presencia de enfermedad de chancro en ramas de cítricos. El control de esta enfermedad involucraría mantener baja la población de caracoles, esencialmente en la primavera, desde abril hasta junio, que coincide con las épocas de mayor actividad del patógeno.

Ensayos realizados en campo mostraron que los fungicidas aplicados de forma curativa no fueron efectivos en el control de las infecciones por *P. citrophthora*, indicando que una vez instalado el patógeno es muy difícil su control. Para un manejo efectivo de la enfermedad, se recomienda hacer aplicaciones de fungicidas en mayo o junio, y también a finales de septiembre principalmente vía foliar con fungicidas como fosetil-Al. En casos extremos es posible hacer un pintado de las lesiones con fosetil-Al, metalaxil o mefenoxam en estas épocas. No se han encontrado efectivas las aplicaciones de fungicidas vía sistema de riego.

Capítulo 8
Conclusiones

8. CONCLUSIONES

- Se ha descrito el síndrome de chancros en ramas de cítricos y se ha identificado a *Phytophthora citrophthora* como el agente causal de la enfermedad, siendo las Clementinas y sus híbridos los cultivares más afectados.
- Más del 99 % de los aislados de *P. citrophthora* estudiados fueron estériles. Mediante la técnica de los RAMS, alrededor del 90 % de los aislados se ha encuadrado dentro de un único grupo poblacional. No se encontró diferencias de agresividad entre grupos poblacionales. Algunos aislados de esta población presentaron rangos elevados de sensibilidad a los fungicidas metalaxil y mefenoxam.
- Las infecciones por *P. citrophthora* y *P. parasitica* tienen una marcada influencia estacional. Para *P. citrophthora* los mayores promedios de área de lesión se dieron durante los meses primaverales, seguido de los otoñales, estivales y, por último, los invernales. Para *P. parasitica* las mayores infecciones han sido en verano, seguido de primavera, otoño e invierno. En varetas cortadas no se pudo establecer un patrón definido de infecciones estacionales.
- La temperatura y la humedad relativa medias de las máximas como factores ambientales y el contenido relativo de agua de la corteza como factores ligados al hospedante, tienen influencia en el desarrollo de las lesiones de ambas especies de *Phytophthora*.
- Se ha comprobado que en forma natural y experimentalmente el caracol *Helix aspersa* transporta en su cuerpo y en su tracto digestivo propágulos de especies de *Phytophthora* capaces de provocar infecciones en la parte aérea de los árboles.
- Aplicaciones curativas de productos fungicidas no han sido efectivas para el control de la enfermedad. En tratamientos preventivos en campo, los fungicidas aplicados vía pintado a tronco y/o ramas fueron más efectivos contra las infecciones por *P. citrophthora* que los aplicados foliarmente y éstos a su vez mejores que los aplicados vía sistema de riego. En plantas jóvenes en invernadero funcionaron mejor las aplicaciones foliares sin diferencias con las efectuadas vía pintado y, por último, las aplicaciones por riego.
- Dos aplicaciones no mejoraron significativamente la eficacia de los tratamientos en relación a una única aplicación.

Capítulo 9
Literatura citada

LITERATURA CITADA

- Abu-El Samen, F.M., Secor, G.A. and Gudmestad, N.C.** 2003. Variability in virulence among asexual progenies of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 93:293-304.
- Afek, U. and Sztejnberg, A.** 1993. Temperature and gamma irradiation effects on scoparone, a citrus phytoalexin conferring resistance to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology* 83:753-758.
- Afek, U. and Sztejnberg, A.** 1988. Acumulation of scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology* 78:1678-1682.
- Afek, U., Sztejnberg, A. and Carmely, S.** 1986. 6,7- Dimethoxycoumarin, a citrus phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora* gummosis. *Phytochemistry* 25:1855-1856.
- Afek, U., Sztejnberg, A. and Solez, Z.** 1990. A rapid method for evaluating citrus seedlings for resistance to foot rot caused by *Phytophthora citrophthora*. *Plant disease* 74: 66-68.
- Agustí, M.** 2000. Citricultura. Ediciones Mundi Prensa. 416 pp.
- Anónimo,** 1988. Guideline for the biological evaluation of fungicides: *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* on citrus (trunk gummosis). EPPO Bulletin 18: 719-724.
- Alexopoulos, C.J.** 1979. Introductory mycology. Third edition. John Wiley & Sons, New York, 534 pp.
- Appiah, A.A., Flood, J., Bridge, P.D. and Archer, S.A.** 2003. Inter- and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. *Plant Pathology* 52: 168-180.
- Aritmo, Y. and Homma, Y.** 1988. Studies on citrus melanose and citrus stem end rot by *Diaporthe citri* (Faw.) Wolf. Part 9. Effect of light and temperature on the self-defense reaction of citrus plant. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 54:282-289.
- Bartnicki-Garcia, S.** 1996. The hypha: unifying thread of the fungal kingdom. In: A century of mycology (Ed. B. Sutton), pp. 105-133. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bevington, K.B. and Castle, W.S.** 1985. Annual root growth pattern of young citrus trees in relation to shoot growth, soil temperature and soil water content. *Journal of the American Society Sciences* 110: 840-845.
- Bier, J.E.** 1964. The relation of some bark factors to canker susceptibility. *Phytopathology* 54:250-253.
- Birch, P.R.J. and Whisson, S.C.** 2001. *Phytophthora infestans* enters the genomics era. *Molecular Plant Pathology* 2(5): 257-263.
- Boccas, B. et Laville, E.** 1976. Les maladies a *Phytophthora* des agrumes. INRA. France. Editions SETCO. 162 pp.
- Bou, F.** 1879. Estudio sobre el naranjo, limonero, cidro y otros árboles de la familia de las Auranciáceas que se cultivan en la provincia de Castellón. Editorial F. Segarra, Castellón-España. 422 pp.

- Brantlinger, E.F.** 1953. A European snail. Arizona Cooperative Economic Insect Report 3: 849.
- Brasier, C.M. and Hansen, E.M.** 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*. II. Phylogeny, speciation, and population structure. *Annual Review of Phytopathology*. 30: 173-200.
- Brasier, C.M., Robredo, F. and Ferraz, J.F.P.** 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* in Iberian oak decline. *Plant Pathology* 42: 140-145.
- Brent, K.J.**, 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?. FRAC Monograph No. 1. 1 - 42 pp.
- Brown, S., Koike, S.T., Ochoa, O.E., Laemmlen, F. and Michelmore, R.W.** 2004. Insensitivity to the fungicide fosetyl-aluminium in California isolates of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*. *Plant Disease* 88: 502-508.
- Browne, G.T. and Mircetich, S. M.** 1995. *Phytophthora* root and crown rots. pp. 38-40. In: J. M. Ogawa *et al.*, (Eds.). Compendium of stone fruit diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul. MN.
- Browne, G.T. and Mircetich, S. M.** 1996. Effects of month of inoculation on severity of disease caused by *Phytophthora* spp. in apple root crowns and excised shoots. *Phytopathology* 86:290-294.
- Browne, G.T., and Viveros, M.A.** 1999. Lethal cankers caused by *Phytophthora* spp. in almond scions: Specific etiology and potential inoculum sources. *Plant Disease* 83:739-745.
- Browne, G.T. and Viveros, M.A.** 2005. Effects of phosphonate and mefenoxam treatments on development of perennial cankers caused by two *Phytophthora* spp. on almond. *Plant Disease* 89:241-249.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Marroquín, C., Román, M.P., Olmos, A., Martínez, M.C., Hermoso de Mendoza, A., López, A., and Navarro, L.** 2000. Incidence and epidemiology of *Citrus Tristeza Virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Research* 71: 85-95.
- Coffey, M.D. and Bower, L.A.** 1984. *In vitro* variability among isolates of eight *Phytophthora* species in response to phosphorous acid. *Phytopathology* 74:738-742.
- Cohen, Y. and Reuveni, M.** 1983. Occurrence of metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato fields in Israel. *Phytopathology* 73:925-927.
- Cohen, S., Allasia, V., Venard, P., Notter, S., Vernière, C. and Panabières, F.** 2003. Intraspecific variation in *Phytophthora citrophthora* from citrus trees in Eastern Corsica. *European Journal of Plant Pathology* 109: 791-805.
- Dandurand, L. and Menge, J.** 1993. Influence of *Fusarium solani* on citrus root growth and population dynamics of *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology* 83: 767-771.
- Davidse, L.C.** 1995. Phenylamide fungicides. Biochemical action and resistance. Pages 347-354 in: Modern selective fungicides: Properties, applications, mechanisms of action. H. Lyr, ed. Gustav Fisher Verlag, New York.
- Davidse, L.C., Hofman, A.E., and Velthuis, G.C.M.** 1983. Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Experimental Mycology* 7:344-361.

- Davis, R.M.** 1981. *Phytophthora* foot rot control with the systemic fungicides metalaxyl and phosetyl aluminium. *Proceedings of the International Society for Citriculture*. 1: 349-351.
- Davis, R.M.** 1982. Control of *Phytophthora* root and foot rot of citrus with systemic fungicides metalaxyl and phosetyl aluminium. *Plant Disease* 66: 218-220.
- Davidson, J.M., Rizzo, D.M., Garbelotto, M., Tjosvold, S. and Slaughter G.W.** 2002. *Phytophthora ramorum* and Sudden Oak Death in California: II. Transmission and Survival. In *Proceedings of the Fifth Symposium on Oak Woodlands*, San Diego, CA. pp. 741-9.
- Deahl, K.L., DeMuth, S.P., Pelter, G. and Ormrod, D.J.** 1993. First report of resistance of *Phytophthora infestans* to metalaxyl in eastern Washington and southwestern British Columbia. *Plant Disease* 77:429.
- Dice, L.R.** 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Dick, M.W.** 1997. Fungi, flagella and phylogeny. *Mycological Research* 101: 385-394.
- Dirac, M. and Menge, J.A.** 2002. High temperatures are not responsible for lack of infection of citrus roots by *Phytophthora citrophthora* during the summer, but suppressive microorganisms may inhibit infection by *P. citrophthora*. *Plant and Soil* 241:243-249
- Dirac, M.F., Menge, J.A. and Madore, M.A.** 2003. Comparison of seasonal infection of citrus roots by *Phytophthora citrophthora* and *P. nicotianae* var. *parasitica*. *Plant Disease* 87:493-501.
- 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.
- Doster, M.A. and Bostock, R.M.** 1988. Incidence, distribution, and development of pruning wound cankers caused by *Phytophthora syringae* in almond orchards in California. *Phytopathology* 78(68):468-472.
- Dutta, P.K., Hedge, R.K. and Anahosur, K.H.** 1984. An assured *in vitro* technique for the germination of oospores of *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler. *Current Science* 53:655-656.
- El-Hamalawi, Z.A. and Menge, J.A.** 1994. Avocado trunk canker disease caused by *Phytophthora citricola*: investigation of factors affecting infection and disease development. *Plant Disease* 78:260-264.
- El-Hamalawi, Z.A. and Menge, J.A.** 1995. Seasonal fluctuations in the extent of colonization of avocado plants by the stem canker pathogen *Phytophthora citricola*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120(2):157-162.
- El-Hamalawi, Z.A. and Menge, J.A.** 1996. The role of snails and ants in transmitting the avocado stem canker pathogen, *Phytophthora citricola*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121(5):973-977.
- Erwin, D.C., Bartnicki-García, S. and Tsao, P.H.** 1983. *Phytophthora* its biology, taxonomy, ecology and pathology. American Phytopathological Society. 392 pp.

- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K.** 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 562 pp.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization.** 1996. EPPO Standard PP 1/122 (2). Guideline for the efficacy evaluation of fungicides. *EPPO Bulletin* 26: 150-152.
- F.A.O.** 2006. Statistical databases, agricultural production of primary crops. <http://www.fao.org>.
- Farith, A., Menge, J. A., Tsao, P.H. and Ohr, H.D.** 1981. Metalaxyl and efosite aluminium for control of *Phytophthora* gummosis and root rot of citrus. *Plant Disease* 65: 654-657.
- Fawcett, H.S.** 1936. Citrus diseases and their control. McGraw-Hill, New York. 656 pp.
- Feld, S., Menge, J. and Stolzy, L.** 1990. Influence drip and furrow irrigation on *Phytophthora* root rot of citrus under field and greenhouse conditions. *Plant Disease* 74: 21-27.
- Ferguson, L., Sakovich, N. and Roose. M.** 1990. California *Citrus* rootstock. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 21477. California, USA. 18 pp.
- Ferguson, A.J., and Jeffers, S.N.** 1999. Detecting multiple species of *Phytophthora* in container mixes from ornamental crop nurseries. *Plant Disease* 83:1129-1136.
- Finney, D.J.** 1964. Probit analysis: statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge Univ. Press, London, England, 234 pp.
- Fisher, T.W. Orth, R.E. and Swanson, S.C.** 1980. Snail against snail. California Agriculture (Nov.-Dec.): 3 pp.
- Fisher, D.J. and Hayes, A.L.** 1984. Studies of mechanisms of metalaxyl fungitoxicity and resistance to metalaxyl. *Crop Protection* 3:117-185.
- Fitt, B.D.L., McCartney, H.A. and Walklate, P.J.** 1989. The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Annual Review of Phytopathology* 27:241-270
- Forgan, A.H., Knogge, W. and Anderson, P.A.** 2007. Asexual genetic exchange in the barley pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Phytopathology* 97:650-654.
- Gisi, U. and Cohen, Y.** 1996. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology* 34:549-572.
- Godwin, R.A., Coffey, M.D.** 1994. An integrated study of morphological and isozyme patterns found within a worldwide collection of *Phytophthora citrophthora* and a redescription of the species. *Mycological Research* 98: 1291-1299.
- González-Sicilia, E.** 1968. El cultivo de los agrios. Editorial Bello. Valencia - España. 814 pp.
- Graham, J.H.** 1990. Evaluation of tolerance of citrus rootstocks to *Phytophthora* root rot in chlamydospore infested soil. *Plant Disease* 74:743-746.
- Graham, J.H.** 1995. Root regeneration and tolerance of citrus rootstocks to root rot caused by *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathology* 85:111-117.

- Graham, J.H. and Menge, J.A.** 1999. Root diseases. Pages 126-135 in: Citrus health management. L.W. Timmer, and L.W. Duncan, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Graham, J.H., Timmer, L.W., Drouillard, D.L. and Peever, T.L.** 1998. Characterization of *Phytophthora* spp. causing outbreaks of citrus brown rot in Florida. *Phytopathology* 88: 724-729.
- Griffith, J.M., Davis, A.J. and Grant, B.R.** 1992. Target sites of fungicides to control oomycetes. In: Target sites of fungicide action. Ed. by Källner, W., Boca Raton, FL: CRC. 69-100.
- Gunderson, J.H., Elwood, H., Ingold, A., Kindle, K. and Sogin, M.L.** 1987. Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:5823-5827.
- Guest, D.I.** 1984. The influence of cultural factors on the direct anti-fungal activities of fosetyl-Al, propamocarb, metalaxyl, SN 75196 and Dowco 444. *Phytopathologische Zeitschrift* 111:155-164.
- Guest, D.I.** 1986. Evidence from light microscopy of living tissues that fosetyl-Al modifies the defence response in tobacco seedlings following inoculation by *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 29:251-261.
- Gutiérrez, F.** 2003. *Phytophthora* diseases of citrus in Belize. *CitriNews* 6 - March. 3 pp.
- Hall, G.** 1993. An integrated approach to the analyses of variation in *Phytophthora nicotianae* and a redescription of the species. *Mycological Research* 97:559-574.
- Hansen, E.M., Hamm, P.B. and Roth, L.F.** 1989. Testing Port-Orfodt-Cedar for resistance to *Phytophthora*. *Plant disease* 73:791-798.
- Hantula, J., Lilja, A. and Parikka, P.** 1997. Genetic variation and host specificity of *Phytophthora cactorum* isolated in Europe. *Mycological Research* 101(5):565-572.
- Hardy, S.** 2004. Lemon diseases. 12 pp. In: Growing lemons in Australia- a production manual. New South Wales Department of primary industries.
- Hendrix, F.F. and Campbell, W.A.** 1970. Distribution of *Phytophthora* and *Pythium* species in soils in the continental United States. *Canadian Journal of Botany* 48:377-384.
- Ho, H.H. and Jong, S.C.** 1989. *Phytophthora nicotianae* (*P. parasitica*). *Mycotaxon* 35: 243-276.
- Holliday, P.** 1980. Fungus diseases of tropical crops. Cambridge University Press. Cambridge, U.K. 607 pp.
- Hüberli, D., Tommerup, I.C., Dobrowolski, M.P., Calver, M.C. and Ardí, J.** 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycological Research* 105 (9): 1053-1064.
- Hunter, J.E. and Buddenhagen, I.W.** 1969. Field biology and control of *Phytophthora parasitica* on papaya (*Carica papaya*) in Hawaii. *Annals of Applied Biology* 63:53-60.
- Ippolito, A., Cicco, V. and De Salerno, M.** 1992. Seasonal variation in root infections and population levels of *Phytophthora* spp. in citrus orchards of Apulia and Basilicata, Italy. *Rivista di Patologia Vegetale*, 2(2):57-65.

- Jeffers, S. N., and Aldwinckle, H.S.** 1986. Seasonal variation in extent of colonization of two apple rootstocks by five species of *Phytophthora*. *Plant Disease* 70:941-945.
- Jeffers, S. N. and Martin, S.B.** 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70:1038-1043.
- Judelson, H.S. and Roberts, S.** 1999. Multiple loci determine insensitivity to phenylamide fungicides in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 87:754-760.
- Kellam, M.K. and Zentmyer, G.A.** 1986. Comparisons of single-oospores isolates of *Phytophthora* species from naturally infected cocoa pods in Brazil. *Mycologia* 78: 351-358.
- Konam, J.K. and Guest, D.I.** 2004. Role of beetles (Coleoptera: Scolytidae and Nitidulidae) in the spread of *Phytophthora palmivora* pod rot of cocoa in Papua New Guinea. *Australasian Plant Pathology* 33:55-59.
- Kueh, T.K. and Khew, K.L.** 1982. Survival of *Phytophthora palmivora* in soil after passing through alimentary canals of snails. *Plant Disease* 66:897-899.
- Lamour, K.H. and Hausbeck, M.K.** 2000. Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology* 90:396-400.
- Lamour, K.H. and Hausbeck, M.K.** 2001. Investigating the spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan. *Phytopathology* 91:973-980.
- Lee, T.Y., Mizubuti, E. and Fry, W.E.** 1999. Genetics of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* 26:118-130.
- Liyanage, N.I.S. and Wheeler, B.E.J.** 1989. Comparative morphology of *Phytophthora* species of rubber. *Plant Pathology* 38: 592-597.
- Luque, J., Parladé, J. and Pera, J.** 2002. Seasonal changes in susceptibility of *Quercus suber* to *Botryosphaeria stevensii* and *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 51:338-345.
- Lutgens, F.K. and Tarbuck, E.J.** 2004. The atmosphere: And introduction to meteorology. 9th edition. Prentice Hall, New Jersey, 484 pp.
- Madden L.V., Wilson, L.L., Yang, X. and Ellis, M.A.** 1992. Splash dispersal of *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora cactorum* by short-duration simulated rains. *Plant Pathology* 41:427 - 436.
- Magnano di San Lio, G. and Pennisi, A.M.** 1984. Brown rot of sweet orange fruits associated with attacks of unarmored snails (*Agriolimax agrestis* L.). *Informatore Fitopatologico* 34(11):34-36.
- Magnano di San Lio, G., Perrotta, G., Cacciola, S.O. and Tuttobene, R.** 1988. Factors affecting soil populations of *Phytophthora* in citrus orchards. In:Proceedings of Sixth International Citrus Congress Vol. 2 (pp 767-774).
- MAPA.** 2005. Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos del año 2004. Secretaría General Técnica de la Subdirección General de Estadísticas Agroalimentarias. 178 pp.
- Martins, E., Figueredo, A., Matsuoka, K. and Becerra, J.** 2001. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Livraria Editora Rural Ltda. Brasil. 782 pp.

- Matheron, M.E. and Micertich, S.M.** 1985. Seasonal variation in susceptibility of *Juglans hindsii* and *Paradox* rootstocks of English walnut trees to *Phytophthora citricola*. *Phytopathology* 75: 970-972.
- Matheron, M.E. and Matejka, J.C.** 1988. Persistence of systemic activity for fungicides applied to citrus trunks to control *Phytophthora* gummosis. *Plant Disease* 72:170-174.
- Matheron, M.E. and Matejka, J.C.** 1989. Temporal changes in susceptibility of citrus phloem tissue to colonization by *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica*. *Plant Disease* 73:408-411.
- Matherton, M.E., and Matejka, J.C.** 1992. Effects of temperature on sporulation and growth of *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* and development of foot rot of citrus. *Plant Disease* 76:1103-1109.
- Matheron, M.E. and Matejka, J.C.** 1993. Seasonal differences in susceptibility of three citrus rootstocks to root lesions caused by *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica*. *Plant Disease* 77:729-32.
- Matheron, M.E., Porchas, M., and Matejka, J.C.** 1997. Distribution and seasonal population dynamics of *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* in Arizona citrus orchards and effect of fungicides on tree health. *Plant Disease* 81:1384-1390.
- Matheron, M.E., Wrightm, G.C. and Porchas, M.** 1998 Resistance to *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* and nursery characteristics of several citrus rootstocks. *Plant Disease* 82:1217-1225.
- Matheron, M.E. and Porchas, M.** 2002. Comparative ability of six fungicides to inhibit development of *Phytophthora* gummosis on citrus. *Plant Disease* 86: 687-690.
- McDonald, B.A. and Linde, C.C.** 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-379.
- McGregor, A. J. and Moxon, J. E.** 1985. Potential for biological control of tent building species of ants associated with *Phytophthora palmivora* pod rot of cocoa in Papua New Guinea. *Annals of Applied Biology* 107:271-277.
- Melero, S.** 2004. Cobre Nordox ® 75 WG para el control de poblaciones de caracoles y enfermedades criptogámicas aéreas de los cítricos. *Levante Agrícola* 371:221-227.
- Menge, J.A. and Nemeč, S.** 1997. Citrus. In: Hillcocks RJ, Waller JM (eds), Soilborne diseases of Tropical Crops, Oxon, CAB, pp.185-227.
- Millán, M.M., Estrela, M.J. and Miró J.** 2005. Rainfall components: Variability and spatial distribution in a Mediterranean Area (Valencia region). *Journal of Climate*, 18: 2682-2705.
- Milgroom, M. G., and Lipari, S. E.** 1995. Spatial analysis of nuclear and mitochondrial RFLP genotypes in populations of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Ecology* 4:633-642.
- Miller, J. S., Hamm, P. B. and Johnson, D. A.** 1997. Characterization of the *Phytophthora infestans* population in the Columbia basin of Oregon and Washington from 1992-1995. *Phytopathology* 87: 656-660

- Mitchell, D. J., Kannwischer-Mitchell, M. E. and Zentmyer, G. A.** 1986. Isolating, identifying and producing inoculum of *Phytophthora* spp, p.63-66. In: K.D. Hickey (ed.). Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens. APS., St. Paul, Minn.
- Mundt, C.C.** 1995. Models from plant pathology on the movement and fate of new genotypes of microorganisms in the environment. *Annual Review of Phytopathology* 33:467-488.
- Murphy, P.A. and McKay, R.** 1927. Some further cases of the production of diseased shoots by potato tubers attacked by *Phytophthora infestans*, and a demonstration of alternative sources of foliage and tuber infection. *Sci. Proc. Royal Dublin Soc., N.S.* 18:413-422.
- Neher, D. and Duniway, J.M.** 1992. Dispersal of *Phytophthora parasitica* in tomato fields by furrow irrigation. *Plant Disease* 76:582-586.
- Newhook, F.J. and Jackson, G.V.H.** 1977. *Phytophthora palmivora* in cocoa plantation soils in the Solomon Island. *Transactions of the British Mycological Society.* 69:31-38.
- Oren, Y., Sadowsky, A., Gefen, D., Solel, Z. and Kimchy, M.** 2001. *Scytalidium* wilt of citrus. *European Journal of Plant Pathology* 107: 467-470.
- Paquin, B., Laforest, M.J., Forget, L., Roewer, I., Wang, Z., Longcore, J. and Lang, B.F.** 1997. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Current Genetics* 31:380-395.
- Parra, G. and Ristaino, J.B.** 1998. Insensitivity to Ridomil Gold (mefenoxam) found among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight on bell pepper in North Carolina and New Jersey. *Plant Disease* 82: 711.
- Parra, G. and Ristaino, J.B.** 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Disease* 85: 1069-1075.
- Peregrine, W.T.C.** 1969. Investigations on chemical control of zebra disease in *Agave* hybrid no. 11648. *Annals of Applied Biology* 63:45-51.
- Raut, S. K., and G. M. Barker.** 2002. *Achatina fulica* Bowdich and other Achatinidae as pests in tropical agriculture., pp. 55-114. In: G. M. Barker [ed.], Molluscs as Crop Pests. CABI Publishing, Hamilton, New Zealand.
- Rebollar-Alviter, A., Madden, L.V. and Ellis, M.A.** 2005. Efficacy of azoxystrobin, pyraclostrobin, potassium phosphite, and mefenoxam for control of strawberry leather rot caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Health Progress* 1:1-6.
- Reilly, C.C., Hotchkiss, M.W., and Hendrix, F.F. Jr.** 1998. *Phytophthora* shuck and kernel rot, a new disease of pecan caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease* 82: 347-349.
- Reynolds, K.M., Gold, H.J., Bruck, R.I., Benson, D.M. and Campbell, C.L.** 1986. Simulation of the spread of *Phytophthora cinnamomi* causing a root rot of Fraser fir in nursery beds. *Phytopathology* 76:1190-1201
- Ribeiro, O. K.** 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. J. Cramer, Lehre, Germany. 417 pp.
- Ricci, P., Pope de Vallavieille, C., Panabières, F., Marais, A. et Auge, G.** 1990. Caractères comparés des espèces de *Phytophthora* pathogènes des agrumes. *Bulletin OEPP*, 20: 19-28.

- Ristaino, J.B., Larkin R.P. and Campbell, C.L. 1993.** Spatial and temporal dynamics of *Phytophthora* epidemics in commercial bell pepper fields. *Phytopathology* 83:1312–20.
- Ristaino, J.B. and Gumpertz, M.C. 2000.** New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*. 38: 541-76.
- Robin, C., Dupuis, F. and Desprez-Loustau, M. L. 1994.** Seasonal changes in northern red oak susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease* 78:369-374.
- Robin, C. and Desprez-Lostau, M.L. 1998.** Testing variability of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology* 104: 465 - 475.
- Rullán, J. 1896.** Cultivo del naranjo en las Baleares. Imprenta La Sinceridad. Soller- España. 189p.
- Sánchez - Hernández; M.E., Sánchez - Solana, J.E., Navarro - Cerrillo, R.M., Fernández - Rebollo, P. y Trapero - Casas, A. 2003.** Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* 29:87-108.
- Sandler, H.A., Timmer, L.W., Graham, J.H. and Zitko, S.E. 1989:** Effect of fungicide applications on populations of *Phytophthora parasitica* and on feeder root densities and fruit yields of citrus trees. *Plant Disease* 73: 902-906.
- Saunt, J. 1992.** Variedades de cítricos del mundo. Sinclair Internacional, Edipublic S.L. Ediciones Publicidad. Valencia, España. 128 pp.
- Schutte, C.G. 2006.** Spray programme for the control of *Phytophthora citrophthora* on Clementines in the Western Cape. Citrus Research International. South Africa. 2 pp.
- Shew, H.D. 1987.** Effect of host resistance on spread of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and subsequent development of tobacco black shank under field conditions. *Phytopathology* 77:1090–93.
- Sicard, D., Michalakakis, Y., Dron, M. and Neemu, C. 1997.** Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 87:807-813.
- Silvar, C., Merino, F. and Díaz, J. 2006.** Diversity of *Phytophthora capsici* in northwest Spain: Analysis of virulence, metalaxyl response, and molecular characterization. *Plant Disease* 90:1135-1142.
- Smith R.E. and Smith, E.H. 1906.** A new fungus of economic importance. *Botanical Gazette*, 42:215-221.
- Soler, J. M., Robles, J. y Gómez-Arnau, J. 1997.** Aliette: Protección de las enfermedades de los frutos cítricos. *Phytoma España* 90: 55-58.
- Sonoda, R.M. 2000:** Rio Grande gummosis. Page 72 in: Compendium of Citrus Diseases. L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and J.H. Graham, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

- Stamps, D.J., Pratt, B.H. and Taylor, P.A.** 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Second Edition. Mycological papers 162. CAB International: Wallingford, U.K.
- Stiles, C.M., Datnoff, L.E. and Cisar, J.L.** 2005. Evaluation of fungicides for control of *Pythium* blight in overseed turfgrasses using a simple field inoculation technique. *Plant Health Progress* 3:1-5.
- Sukul, P., and Spiteller, M.** 2000. Metalaxyl: persistence, degradation, metabolism, and analytical methods. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 164:1-26.
- Tatum, J.H. and Berry, R.E.** 1977. 6,7- Dimethoxycoumarin in the peels of Citrus. *Phytochemistry* 16:1091-1092.
- Taylor, B. and Griffin, M.J.** 1981. The role and relative importance of different ant species in the dissemination of black pod disease of cocoa. In: Gregory P.H., Madison, A.C. eds. *Epidemiology of Phytophthora on Cocoa in Nigeria*. Wallingford, UK; CAB International, 132-144.
- Taylor, R.J., Salas, B., Secor, G.A., Rivera, V. and Gudmestad, N.C.** 2002. Sensitivity of North American isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to mefenoxam (metalaxyl). *Plant Disease* 86:797-802.
- Thomidis, T. and Elena, K.** 2001. Effects of metalaxyl, fosetyl-Al, dimethomorph and cymoxanil on *Phytophthora cactorum* of peach tree. *Phytopathology* 149: 97-101.
- Timmer, L.W.** 1977. Preventive and curative trunk treatments for control of *Phytophthora* foot rot of citrus. *Phytopathology* 67: 1149-1154.
- Timmer, L.W.** 1979. Preventive and systemic activity of experimental fungicides against *Phytophthora parasitica* on citrus. *Plant Disease Reporter* 63: 324-327.
- Timmer, L.W. and Castle, W.S.** 1985. Effectiveness of metalaxyl and fosetyl-Al against *Phytophthora parasitica* on sweet orange. *Plant Disease* 69: 741-743.
- Timmer, L.W. and Menge, J.A.** 1988. *Phytophthora*-induced diseases. Pages 22-24 in: *Compendium of citrus diseases*. J. O. Whiteside, S. M. Garnsey, and L. W. Timmer, eds. APS Press, St. Paul, MN.
- Timmer, L.W., Graham, J.H. and Zitko, S.E.** 1998. Metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora nicotianae*: Occurrence, sensitivity, and competitive parasitic ability on citrus. *Plant Disease* 82:254-261.
- Timmer, L.W. and Menge, J.A.** 2002. Enfermedades inducidas por *Phytophthora*. En: "Whiteside, J. O., Garnsey, S. M. y Timmer, L. W. (edit.): *Plagas y enfermedades de los cítricos*" 22-24. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi Prensa.
- Timmer, L.W., Zitko, S.E., Gottwald, T.R. and Graham, J.H.** 2000. *Phytophthora* brown rot of citrus: temperature and moisture effects on infection, sporangium production, and dispersal. *Plant Disease* 84: 157-163.
- Timmer, L.W., Garnsey, S. and Broadbent, P.** 2003. Diseases of *Citrus*. p. 163-195. In: R.C. Ploetz (ed.). *Diseases of Tropical Fruits Crops*. CABI Publishing, CABI International, Wallingford, UK.

- Tippett, J.T., Crombie, D. S. and Hill, T.C.** 1987. Effect of phloem water relations on the growth of *Phytophthora cinnamomi* in *Eucalyptus marginata*. *Phytopathology* 77:246-250.
- Tsao, P.H, Ugale, R., Hobbs, S. and Farih, A.** 1980. Control of homothallic oospore formation in *Phytophthora parasitica* by culture manipulations. *Transactions of the British Mycological Society* 75:153-156.
- Tsor, L., Hazanovsky, M., Modechai-Lebiush, S., Ben-David, T., Dori, I. and Matan, E.** 2005. Control of root rot and wilt caused by *Pythium myriotylum* in Kangoo Paw (*Anigioanthos*). *Journal of Phytopathology* 153(3):150-154.
- Tucker, C.M.,** 1931. Taxonomy of genus *Phytophthora* de Bary. *Mycological papers* 92: 1-22.
- Turner, G.J.** 1964. Transmission by snails of the species *Phytophthora* which causes foot rot of *Piper nigrum* L. in Sarawak. *Nature* 202:1133.
- Turner, G.J.** 1972. Isolation of *Phytophthora palmivora* from ant runs on *Piper nigrum*. *Transactions of the British Mycological Society* 59:317-319.
- Tuset, J.J.** 1977. Contribución al conocimiento del género *Phytophthora* en España. *Anales INIA. Serie protección vegetal* 7:11-106.
- Tuset, J.J.** 1983a. La gomosis y podredumbre del cuello de la raíz de nuestros agrios. I: Aspectos biológicos y patológicos. *Levante Agrícola* 246: 90-96.
- Tuset, J.J.** 1983b. La gomosis y podredumbre del cuello de la raíz de nuestros agrios. II: Posibilidades actuales de lucha. *Levante Agrícola* 246: 130-135.
- Tuset, J.J.** 2000. Enfermedades causadas por *Phytophthora*. En: Duran-Vila, N. y Moreno, P. (Eds.): *Enfermedades de los cítricos: 30-31*. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología nº 2. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 165 pp.
- Tuset, J.J. y Sánchez M.T.** 1988. Comportamiento de diversos fungicidas sobre *Phytophthora citrophthora*, hongo causante del “aguado” o “podredumbre marrón” de los frutos cítricos. *Levante Agrícola* 27: 212-217.
- Tuset, J.J., Hinarejos, C. and García, J.** 1990. Control of *Phytophthora* brown rot of citrus fruits. *Bulletin OEPP* 20: 153-161.
- Tuset, J. J., Lapeña, I. y García-Mina, J.M.** 2003. Efecto fungitóxico del ácido fosforoso en naranjo dulce a la infección con zoosporas de *Phytophthora citrophthora*. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* 29: 413-420.
- Upstone, M.E.** 1978. *Phytophthora syringae* fruit rot of apples. *Plant Pathology* 27:24-30.
- Vanaclocha, P., Monzó, C., Gómez, K., Tortosa, D., Pina, T., Castañera P. y Urbaneja, A.** 2005. Hormigas (Hymenoptera: Formicidae) presentes en el suelo de los cítricos de la provincia de Valencia. *Phytoma España*, 171: 14-24.
- Vernière, C., Cohen, S., Raffanel, B., Dubois, A., Venard, P. and Panabières, F.** 2004. Variability in pathogenicity among *Phytophthora* spp. isolated from citrus in Corsica. *Journal of Phytopathology* 152: 476-483.

- Wallace, J.M.** 1978. Virus and viruslike diseases. Pages 67-184 in: The Citrus Industry. Vol IV. Crop Protection. W. Reuter, E.C. Calavan and G.E. Carman, eds. University of California, Berkeley, CA.
- Waterhouse, G.M.** 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Papers 92:1-22.
- Waterhouse, G.M.** 1974. Other *Phytophthora* species recorded on cacao. Pages 71-79 in: *Phytophthora* Disease of Cocoa. P.H. Gregory, ed. Longman, London. 348 pp.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in PCR protocols. A guide to methods and applications. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.
- Widmer, T.L., Graham, J.H. and Mitchell, D.J.** 1998. Histological comparison of fibrous root infection of disease tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. *Phytopathology* 88:389-395.
- Workneh, F., Yang, X.B. and Tylka, G.L.** 1998. Effect of tillage practices on vertical distribution of *Phytophthora sojae*. *Plant Disease* 82:1258-63.
- Yu-Huan G. and Ko, W.H.** 1998. Occurrence of a parasexual cycle following the transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Phytophthora parasitica*. *Current Genetics* 34(2):120-123.
- Zaiger, D. and Zentmyer, G.A.** 1965. *Phytophthora* canker of cacao in the Caroline Island. *Plant Disease Reporter* 49: 565-567.
- Zentmyer, G.A., Jefferson, L., Hickman, C.J. and Chang-Ho. Y.** 1974. Studies of *Phytophthora citricola*, isolated from *Persea Americana*. *Mycologia* 66:830-845.
- Zentmyer, G.A., Leary, J.V., Klure, L.J. and Grantham, G.L.** 1976. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. *Phytopathology* 66: 982 -986.
- Zentmyer, G.A. and Mitchell, D.J.** 1986. *Phytophthora* diseases of fruit trees in the tropics. *Rev Trop Pl Path* (2): 287 – 309
- Zhan, J., Mundt, C.C. and McDonald, B.A.** 1998. Measuring immigration and sexual reproduction in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 88:1330-1337.
- Zitko, S., Timmer, L. and Sandler, H.** 1991. Isolation of *Phytophthora palmivora* pathogenic to citrus in Florida. *Plant Disease* 75: 532-535.
- Zwankhuizen, M.J., Govers, F. and Zadoks, J.C.** 1998. Development of potato late blight epidemics: disease foci, disease gradients, and infection sources. *Phytopathology* 88:754-63.

ANEXOS

