

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMIA



**PSEUDOMONAS DE RIZÓSFERA DE PALTO (*Persea
americana* Mill.) CON ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE
Phytophthora cinnamomi Rands, AISLADAS EN COSTA
CENTRAL DEL PERÚ**

Presentado por:

JACKELINE MAMANI HERRADA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

Lima - Perú

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA

**“PSEUDOMONAS DE RIZÓSFERA DE PALTO (*Persea americana* Mill.) CON
ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE *Phytophthora cinnamomi* Rands,
AISLADAS EN COSTA CENTRAL DEL PERÚ”**

Presentado por:
JACKELINE MAMANI HERRADA

Tesis para optar el Título de:
INGENIERO AGRÓNOMO

Sustentada y Aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Jorge Escobedo Álvarez
PRESIDENTE

Mg. Sc. Liliana Aragón Caballero
PATROCINADOR

Ing. Mg. Sc. Walter Apaza Tapia
MIEMBRO

Dr. Sady García Bendezú
MIEMBRO

Lima - Perú

2017

DEDICATORIA

A *Delia*, mi buena madre, por su fuerza y apoyo constante.

A *Efraín*, mi padre consejero, por sus palabras de aliento y ser mi soporte.

A *Liliana*, mi querida profesora, por su apoyo y ser ejemplo para seguir investigando.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiar mis pasos y por darme las fuerzas para culminar el presente trabajo.

A mis padres y hermana por ser mi soporte en todo momento.

A mi patrocinadora *Mg Sc. Liliana Aragón*, por la confianza depositada en mí, su orientación y apoyo en la culminación del presente trabajo de investigación.

A la empresa Sociedad Agrícola Virú S.A. (VIRÚ) por la confianza en otorgarme el primer lugar en el concurso “Premio Virú 20 años”, cuyo fondo fue invertido en la investigación presente.

Al *Dr. Sady García*, por su apoyo brindado a lo largo de la tesis y el tiempo dedicado en la revisión del presente trabajo.

A las ingenieras, *Luz y Sonia*, mis buenas amigas, por ser ejemplo e inspiración para culminar esta etapa.

A *Alan*, mi gran compañero, quien me dio el aliento y apoyo para culminar la redacción del presente trabajo.

A mis amigos Fitopatólogos: *Kelly*, por ser un ejemplo y gran apoyo a lo largo de la tesis; *Iván*, por su amistad sincera y las largas conversaciones; *Carlos*, por sus sabios consejos y *Edu*, por enseñarme a usar el ASSESS.

Al Laboratorio de Fitopatología y al Laboratorio de Suelos por el apoyo brindado durante la fase de laboratorio del presente trabajo.

A todos mis amigos y amigas que de muchas maneras colaboraron con sus consejos y apoyo en el presente estudio.

I. INDICE GENERAL

I. INDICE GENERAL	1
II. RESUMEN	11
III. INTRODUCCIÓN	13
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	15
4.1 Caracterización del sistema radicular del palto	15
4.2 <i>Phytophthora cinnamomi</i>	16
4.2.1 Taxonomía	16
4.2.2 Sintomatología	17
4.2.3 Descripción del patógeno	17
4.2.4 Ciclo de la enfermedad	18
4.2.5 Interacciones ambientales con el hospedante y patógeno	19
A. Humedad del suelo	19
B. Temperatura	20
C. Interacción en el suelo	20
4.3 Suelos supresivos	21
4.4 Rizósfera	21
4.5 Bacterias endófitas	22
4.6 Género <i>Pseudomonas</i>	24
4.6.1 Taxonomía	24
4.6.2 Características generales	24

4.6.3 Mecanismo de acción de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	25
4.6.3.1 Inducción de resistencia sistémica (IRS)	25
4.6.3.2 Producción de reguladores de crecimiento vegetal	26
4.6.3.3 Control biológico	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Fase campo	28
5.1.1 Ubicación del ensayo	28
5.1.2 Material vegetal	28
5.1.2 Muestreo	28
5.2 Fase laboratorio	28
5.2.1 Ubicación del ensayo	28
5.2.2 Materiales y equipos de laboratorios	29
5.2.2.1 Equipos	29
5.2.2.2 Medios de cultivo	29
5.2.2.3 Soluciones y reactivos	29
5.2.2.4 Microorganismos	30
5.2.3 Tratamiento de la muestra	30
5.2.4. Conteo de <i>Pseudomonas</i> spp.	30
5.2.5 Aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas</i> spp.	30
5.2.6 Aislamiento del patógeno (<i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands)	31
5.2.7 Prueba de antagonismo contra <i>Phytophthora cinnamomi</i>	32
5.3 Fase invernadero	33
5.3.1 Ubicación del ensayo	33
5.3.2 Material vegetal	33
5.3.3 Preparación del sustrato	33
5.3.4 Preparación, densidad e inoculación del controlador	34

5.3.5 Inoculación del patógeno	34
5.3.6 Parámetros a evaluar	35
5.3.6.1 Severidad	35
5.3.6.2 Longitud de raíces	36
5.3.6.3 Altura de planta	36
5.3.6.4 Peso fresco y seco de raíces	36
5.3.6.5 Peso fresco y seco foliar	37
5.3.7 Caracterización bioquímica de <i>Pseudomonas</i> spp.	37
5.3.7.1 Fluorescencia en medio de cultivo King-B	37
5.3.7.2 Crecimiento a 4 °C	37
5.3.7.3 Crecimiento a 41 °C	37
5.3.7.4 Licuación de gelatina	38
5.4 Diseño experimental	38
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 Aislamiento, purificación e identificación de <i>Pseudomonas</i> spp.	40
6.2 Efecto antagónico prueba <i>in vitro</i>	42
6.3 Evaluación en invernadero	49
6.3.1 Evaluación de la severidad	49
6.3.2 Evaluación de la longitud de raíces de palto	51
6.3.3 Evaluación del incremento de altura del palto	53
6.3.4 Evaluación del peso fresco radicular del palto	54
6.3.5 Evaluación de la materia seca radicular del palto	55
6.3.6 Evaluación del peso fresco foliar del palto	56
6.3.7 Evaluación de la materia seca foliar del palto	57
6.3.8 Conteo de <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de suelo y raíz de palto bajo condiciones de invernadero	60

VII. CONCLUSIONES	62
VIII.RECOMENDACIONES	63
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	64
X. ANEXOS	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Reacción de distintas especies de <i>Pseudomonas</i> spp. frente a distintas pruebas bioquímicas, Bergey (2005)	38
Cuadro 2: Descripción de los tratamientos del experimento en invernadero	39
Cuadro 3: Conteo de <i>Pseudomonas</i> spp. (NMP/g) aisladas de suelos de costa	40
Cuadro 4: Vista microscópica de (A) Zoosporangios de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (B) Micelio toruloso, con protuberancias y vesículas y (C) Hifas cenocíticas	41
Cuadro 5: Descripción de tratamientos de enfrentamiento de <i>P. cinnamomi</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. en medio de cultivo PDA y King-B	42
Cuadro 6: Reacción de distintas cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. a las pruebas bioquímicas (Schaad, 2001)	48
Cuadro 7: Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. y de la infección de <i>P. cinnamomi</i> sobre la severidad (%) de raíces de palto, bajo condiciones de invernadero	49
Cuadro 8: Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. y de la infección de <i>P. cinnamomi</i> sobre la longitud de raíces de palto, bajo condiciones de invernadero	52
Cuadro 9: Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. y de la infección de <i>P. cinnamomi</i> sobre el incremento de altura (cm) de palto, bajo condiciones de invernadero	53
Cuadro 10: Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. y de la infección de <i>P. cinnamomi</i> sobre el peso fresco radicular (g) de palto, bajo condiciones de invernadero	54
Cuadro 11: Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. y de la infección de <i>P. cinnamomi</i> sobre la materia seca radicular (%) de palto, bajo condiciones de invernadero	55
Cuadro 12: Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. y de la infección de <i>P. cinnamomi</i> sobre el peso fresco foliar (g) de palto, bajo condiciones de invernadero	56

- Cuadro 13: Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. y de la infección de *P. cinnamomi* sobre la materia seca foliar (%) de palto, bajo condiciones de invernadero 57
- Cuadro 14: Efecto de la inoculación de cepas de *Pseudomonas* spp. y de la infección de *P. cinnamomi* sobre la severidad, incremento de altura, biomasa foliar y radicular, materia seca foliar y radicular y longitud de raíces de palto, bajo condiciones de invernadero (La Molina, 2016) 59
- Cuadro 15: Conteo de *Pseudomonas* spp. aisladas de plántulas de palto de invernadero (La Molina, 2016) 60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructuras de <i>Phytophthora cinnamomi</i> de izquierda a derecha: (1) esporangios, oospora y clamidosporas y (2) micelio toruloso (Drenth <i>et al.</i> 2001)	17
Figura 2: Curva de crecimiento de <i>Phytophthora cinnamomi</i> en el medio de cultivo zanahoria-agar (Sánchez, 2003)	20
Figura 3: Partes de la zona de la rizósfera (Morales, 2013)	22
Figura 4: Inoculación del patógeno. A la izquierda: micelio crecido en trigo y a la derecha: inoculación del patógeno en plantones de palto	32
Figura 5: Esquema de enfrentamiento de <i>Pseudomonas</i> spp. con <i>P. cinnamomi</i>	32
Figura 6: Distribución del inóculo (micelio de <i>Phytophthora cinnamomi</i>) alrededor del sistema radicular de los plantones de palto (La Molina, 2016)	34
Figura 7: Proceso de cuantificación del porcentaje de severidad de sistema radicular de palto cv. Zutano previamente inoculado con <i>P. cinnamomi</i> y <i>Pseudomonas</i> spp., usando programa ASSESS	35
Figura 8: Proceso de cuantificación de la longitud de raíces de palto cv. Zutano previamente inoculado con <i>P. cinnamomi</i> y <i>Pseudomonas</i> spp., usando programa ASSESS	36
Figura 9: Fluorescencia de <i>Pseudomonas</i> spp., procedentes de campos en producción de palto, en diluciones (10^{-2} a 10^{-5}) en caldo asparagina, de raíz y suelo de campos de producción de palto de La Molina (La Molina, 2015)	41
Figura 10: Emisión de fluorescencia de aislamientos de <i>Pseudomonas</i> spp., procedentes de campos en producción de palto, en medio de cultivo King-B	41
Figura 11: Crecimiento y desarrollo de <i>P. cinnamomi</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. en medio de cultivo PDA y KING-B a los 13dds (La Molina, 2015)	43
Figura 12: Desintegración o lisis de contenido citoplasmático de <i>Phytophthora cinnamomi</i> frente a <i>Pseudomonas</i> spp. Vista en microscopio (40) (La Molina, 2015)	44
Figura 13: Comportamiento de <i>Phytophthora cinnamomi</i> por acción de distintas cepas de <i>Pseudomonas</i> spp., aisladas de campos de producción de palto, en medio de cultivo PDA + King-B + AN (La Molina, 2015)	45

Figura 14: Avance de <i>P. cinnamomi</i> (en centímetros) frente a <i>Pseudomonas</i> spp. en prueba <i>in vitro</i> (La Molina, 2015)	46
Figura 15: Porcentaje de severidad de <i>P. cinnamomi</i> frente a <i>Pseudomonas</i> spp. en prueba <i>in vitro</i> a los 7 días después de la siembra (La Molina, 2015)	47
Figura 16: Porcentaje de severidad de <i>P. cinnamomi</i> frente a la inoculación de cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. en palto bajo condiciones de invernadero	50
Figura 17: Porcentaje de control de <i>P. cinnamomi</i> frente a la inoculación de cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. en palto bajo condiciones de invernadero	51
Figura 18. Longitud de raíces de palto de tratamientos inoculados con cepas <i>Pseudomonas</i> spp. frente a <i>P. cinnamomi</i> bajo condiciones de invernadero	52
Figura 19: Incremento de altura de palto de tratamientos inoculados con cepas <i>Pseudomonas</i> spp. frente a <i>P. cinnamomi</i> bajo condiciones de invernadero	54
Figura 20: Peso fresco radicular de palto de tratamientos inoculados con cepas <i>Pseudomonas</i> spp. frente a <i>P. cinnamomi</i> bajo condiciones de invernadero	55
Figura 21: Materia seca radicular (%) de palto de tratamientos inoculados con cepas <i>Pseudomonas</i> spp. frente a <i>P. cinnamomi</i> bajo condiciones de invernadero	56
Figura 22: Peso fresco foliar de palto de tratamientos inoculados con cepas <i>Pseudomonas</i> spp. frente a <i>P. cinnamomi</i> bajo condiciones de invernadero	57
Figura 23: Materia seca foliar (%) de palto de tratamientos inoculados con cepas <i>Pseudomonas</i> spp. frente a <i>P. cinnamomi</i> bajo condiciones de invernadero	58
Figura 24: Fotografía de área foliar y radicular de palto inoculados con <i>Pseudomonas</i> spp. y <i>P. cinnamomi</i> (La Molina, 2016)	60
Figura 25. Evaluación de NMP/g suelo y raíz aisladas de los tratamientos inoculados (La Molina, 2016)	61

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Datos de avance de <i>P. cinnamomi</i> en centímetros frente a <i>Pseudomonas</i> spp. en prueba <i>in vitro</i>	76
Anexo 2: Datos de porcentaje de severidad de <i>P. cinnamomi</i> frente a <i>Pseudomonas</i> spp. en prueba <i>in vitro</i>	76
Anexo 3: Cuadro de datos de las variables evaluadas en palto en invernadero luego de la inoculación de <i>P. cinnamomi</i> y cepas de <i>Pseudomonas</i> spp.	77
Anexo 4: Procedimiento ANOVA para la severidad en plántones de palto	80
Anexo 5: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para la severidad en plántones de palto	80
Anexo 6: Procedimiento ANOVA para la longitud de raíces de plántones de palto	81
Anexo 7: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para la longitud de raíces de plántones de palto	81
Anexo 8: Procedimiento ANOVA para incremento de altura en plántones de palto	82
Anexo 9: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para incremento de altura en plántones de palto	82
Anexo 10: Procedimiento ANOVA para para peso fresco radicular en plántones de palto	83
Anexo 11: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para peso fresco radicular en plántones de palto	83
Anexo 12: Procedimiento ANOVA para % materia seca radicular en plántones de palto	84
Anexo 13: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para % materia seca radicular en plántones de palto	84
Anexo 14: Procedimiento ANOVA para peso fresco foliar en plántones de palto	85
Anexo 15: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para peso fresco foliar en plántones de palto	85
Anexo 16: Procedimiento ANOVA para porcentaje de materia seca foliar	86

Anexo 17: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para porcentaje de materia seca foliar	86
Anexo 18: Conteo de <i>Pseudomonas</i> spp. (NMP/g) aisladas de suelos de costa	86
Anexo 19: Conteo de <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de plántulas de palto de invernadero (La Molina, 2016)	86
Anexo 20: Para serie de 3 tubos con 0.1, 0.001 y 0.001 g. NMP por gramo con un 95 % de confianza	86
Anexo 21: Medios de cultivo	87

II. RESUMEN

En la rizósfera como zona de actividad biológica, se pueden encontrar diversidad de microorganismos como bacterias del género *Pseudomonas* que se caracterizan por controlar patógenos como *Phytophthora cinnamomi*, también por ser promotores de crecimiento (PGPR). Por esta razón en la presente investigación se aislaron bacterias del género *Pseudomonas* de la rizósfera de palto de las provincias de Lima, Huaral y Casma. Se seleccionaron 6 cepas (R2, R5, R7, R10, S10 y S6) con las que se realizaron pruebas para evaluar su capacidad biocontroladora de *P. cinnamomi*, *in vitro* e invernadero. En la prueba de antagonismo *in vitro*, las cepas S6 y S10 controlaron un 30.3 y 44%; respectivamente. En condiciones de invernadero se inocularon cepas de *Pseudomonas* en plantones de palto cv. Zutano de 4 meses de edad, a los cuales se les hizo un seguimiento de cinco meses, evaluando al finalizar variables como severidad en raíces, incremento de altura, peso fresco radicular y foliar y porcentaje de materia seca radicular y foliar. En invernadero, las mejores cepas en el control de *P. cinnamomi* fueron S6, R2, R7 y R10 que controlaron un 55.2, 39.5, 33.7 y 31.0%; respectivamente. En el incremento de altura, las cepas S6, R2, R7 y R10 alcanzaron 11.4, 9.3, 7.6 y 5.1cm; respectivamente. El porcentaje de materia seca de raíces, las cepas S10, R10, R7 y R5 obtuvieron 29.6, 27.5, 27.9 y 25.7%; respectivamente. En este estudio se observó que si bien la aplicación de *Pseudomonas* ejerce un control sobre *Phytophthora cinnamomi* también induce el crecimiento radicular y apical de la planta.

Palabras claves: rizósfera, *Pseudomonas*, palto, PGPR

ABSTRACT

In the rhizosphere as a zone of biological activity, a variety of microorganisms can be found as bacteria of the genus *Pseudomonas* that are characterized to control pathogen like *Phytophthora cinnamomi*, also to be promoters of growth (PGPR). For this reason, in the present investigation, bacteria of the genus *Pseudomonas* were isolated from the rhizosphere of avocado from the provinces of Lima, Huaral and Casma. Six strains (R2, R5, R7, R10, S10 and S6) were selected for their antifungal activity against *P. cinnamomi* *in vitro* and in the greenhouse. In the *in vitro* antagonism test, strains S6 and S10 controlled 30.3 and 44 %, respectively. Under greenhouse conditions, *Pseudomonas* strains were inoculated on avocado cv. Zutano of 4 months of age, who were followed up for five months, evaluating at the end of variables such as root severity, height increase, fresh radicular and foliar weight and percentage of root and leaf dry matter. In greenhouse, the best strains in the control of *P. cinnamomi* were S6, R2, R7 and R10 that controlled 55.2, 39.5, 33.7 and 31.0 %, respectively. In the increase of height, the strains S6, R2, R7 and R10 reached 11.4, 9.3, 7.6 and 5.1cm, respectively. The dry matter content of roots, strains S10, R10, R7 and R5 obtained 29.6, 27.5, 27.9 and 25.7 %; respectively. In this study, it was observed that although the application of *Pseudomonas* exerts a control on *Phytophthora* also induces the root and apical growth of the plant.

Key words: avocado, PGPR, *Pseudomonas*, rhizosphere.

II. INTRODUCCION

El Perú tiene un área productora de palto aproximadamente de 30,320 hectáreas con una producción de 349,317 toneladas. Los departamentos costeros (La Libertad, Lima, Ica y Ancash) poseen mayor superficie sembrada (MINAGRI, 2014).

El Perú es el segundo exportador de palta a nivel mundial, con 175.6 millones de kilos enviados (Arteaga, 2016). Por tanto, la producción de palta en el Perú seguirá siendo negocio por la apertura de nuevos mercados y nuevos consumidores que valoren sus propiedades nutricionales.

La producción del palto depende de factores climáticos, edáficos, nutricionales y sanitarios. Dentro del aspecto sanitario, las enfermedades constituyen uno de los factores que incrementan los costos de producción del fruto. Entre las de mayor importancia se encuentra la ‘tristeza del palto’ causada por *Phytophthora cinnamomi* (Chromista, Heterokontophyta). Este patógeno limita el desarrollo del árbol, reduce la producción y la calidad de fruta, afectando directamente la rentabilidad.

En la actualidad, este oomyceto es controlado por productos químicos, como fosetil-Al y metalaxyl (Darvas y Backer, 1984; Mora *et al.* 2007), pero el constante uso de productos químicos disminuye su efectividad en el tiempo debido a la resistencia que éste fitopatógeno desarrolla hacia el fungicida.

Por estas razones se opta por un control biológico y así aprovechar los microorganismos del suelo con actividad antifúngica, entre ellos las bacterias del género *Pseudomonas*, responsables de la supresividad de algunos patógenos de suelo (Raaijmakers, 2002).

Las bacterias del género *Pseudomonas* han sido ampliamente estudiadas como controladores biológicos por su capacidad de colonizar la raíz, competir agresivamente con otros microorganismos, adaptarse a diferentes situaciones de estrés ambiental, sintetizar antibióticos, enzimas, volátiles y activar la resistencia sistémica en plantas (Weller, 2007).

Por tal motivo en la presente investigación se evaluó (1) *in vitro*; el efecto antagónico de cepas de *Pseudomonas* spp. aisladas de la rizósfera de palto sobre *Phytophthora cinnamomi*, medido por el avance del patógeno en centímetros y (2) en invernadero; la severidad de la infección de *P. cinnamomi* en plántones de palto previamente inoculados con las cepas de *Pseudomonas* spp., medido por el porcentaje de lesión en raíces y el efecto de las cepas en el crecimiento de las plántones de palto, medido por el incremento de altura del tallo en centímetros.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA RADICULAR DEL PALTO

Los paltos poseen un sistema radical superficial, extensamente suberizado, relativamente ineficiente, con una baja conductividad hidráulica y baja frecuencia de pelos radicales (Wolstenholme, 1987).

La densidad de raíces depende de las variables temperatura y humedad de suelo (Gregory, 1992). La arquitectura radical del palto se divide bajo condiciones adecuadas de crecimientos en ramificaciones, las cuales van asumiendo posiciones laterales. Éstas laterales primarias se dividen en su mayoría bifurcándose en laterales secundarias, las cuales a su vez se vuelven a dividir, pero en ángulos más abiertos. Este sistema de ramificaciones desarrolla gran cantidad de raicillas (Gregoriou, 1980).

Whiley *et al.* (1987) señalan que el mayor volumen de raíces está distribuido en los primeros 45 cm del suelo, donde las raíces son vulnerables a los rápidos cambios del medio ambiente. Es por ello que el palto no necesita de suelos muy profundos (Calabrese, 1992).

Las nuevas raíces, de color blanco (Gregoriou, 1980) son activas en la absorción de agua y nutrientes, y son de diámetro menor a 2 mm (Villablanca, 1994). Las raíces de palto se pueden clasificar en tres tipos (Wiegand, 1999): pequeñas (0 a 1.3 mm), medianas (1.4 a 2.2 mm) y grandes (mayor a 2.2 mm). Las raíces cortas menores a 2 mm alcanzan hasta a un 80 % del total del volumen o peso de raíces, son de efímera existencia (máximo dos años), al comienzo son tiernas y blanquecinas, pero luego se tornan suberizadas de color pardo (Salazar y Cortés, 1986; Du Plessis, 1991; Silva y Rodríguez, 1995; Gil, 1997; Gardiazabal, 2007). Las raíces finas dominan sobre las más gruesas.

Durand y Du Plessis (1990) indican que los paltos requieren riegos cortos pero frecuentes, ya que aumenta los niveles de aireación del suelo, se reducen las pérdidas de agua por percolación y mantienen un nivel óptimo en los períodos de máxima demanda.

Las mayores tasas de crecimiento de raíces se obtienen entre los 18 y 23°C (Whiley *et al.*, 1988; Tapia, 1993; Casale *et al.*, 1995).

4.2 *Phytophthora cinnamomi* (Rands)

En 1922, *Phytophthora cinnamomi* fue aislado de canchales de árboles de canela en Sumatra por Rands; se reporta como habitante del suelo, se desarrolla en las raíces y base del tallo, ataca a más de 850 hospedantes, tales como: palto, piña, pino, ciprés, coníferas, durazno, encino, macadamia, papaya, eucalipto, azalea, siendo detectado atacando palto por primera vez en Estados Unidos, por Toker en 1929. En Perú en 1950 se calcularon 50 mil árboles enfermos (Mora *et al.*, 2000).

La “podredumbre de raíz del palto” como es llamado entre algunos países, adquiere interés por los daños que causa, desde la disminución en rendimiento, pérdida de árboles e incluso de huertos y de zona productoras. Afecta económicamente a muchos productores de palto que se encuentran con este problema, porque limita el desarrollo del árbol, reduce la producción y la calidad de fruta, y con ello incrementando los costos del cultivo, afectando directamente la rentabilidad (Mejía y Ramos, 2003).

4.2.1 TAXONOMÍA

Clasificación filogenética de chromista basada en relaciones evolutivas, según: Barr, 1992; Patterson y Sogin, 1992, Hawksworth, 1994.

Reino: Chromista
Phylum: Heterokontophyta
Clase: Oomycetes
Orden: Peronosporales
Familia: Pythiaceae
Género: *Phytophthora*
Especie: *P. cinnamomi*

4.2.2 SINTOMATOLOGÍA

La pudrición de las raíces por *P. cinnamomi* provoca un declinamiento progresivo del árbol, en el cual se observan hojas más pequeñas que lo normal, usualmente de color verde pálido o amarillentas y a menudo marchitas.

El sistema radicular puede quedar totalmente destruido. En un estado más avanzado, los árboles se defolian completamente, hay muerte de ramas pequeñas, caída de frutos y finalmente la muerte del árbol. En la última etapa de la enfermedad, las raíces secundarias se encuentran ausentes y si las hay son negras y quebradizas y en estado de pudrición. Las raíces principales o más grandes son atacadas una vez que el árbol se encuentra debilitado, lo cual puede ocurrir en 2 o 5 años posteriores al inicio del ataque (Marais, 2002).

4.2.3 DESCRIPCIÓN DEL PATÓGENO

Waterhouse y Waterston (1966) lo describen con micelio toruloso con hifas de hasta 8 μm de espesor, hinchazón de hifas en racimos, típicamente esféricos, con un diámetro promedio de cultivo de 42 μm . Los esporangios son delgados (3 μm). Los esporangios son ampliamente elipsoide a ovoide, 57 x 33 μm (hasta 100 x 40 μm), sin papila con ligero engrosamiento apical, los cuales se forman únicamente en solución acuosa de extracto de suelo. Las clamidosporas son usualmente esféricas, de pared gruesa, de 18-48 μm de diámetro (Wager, 1942).

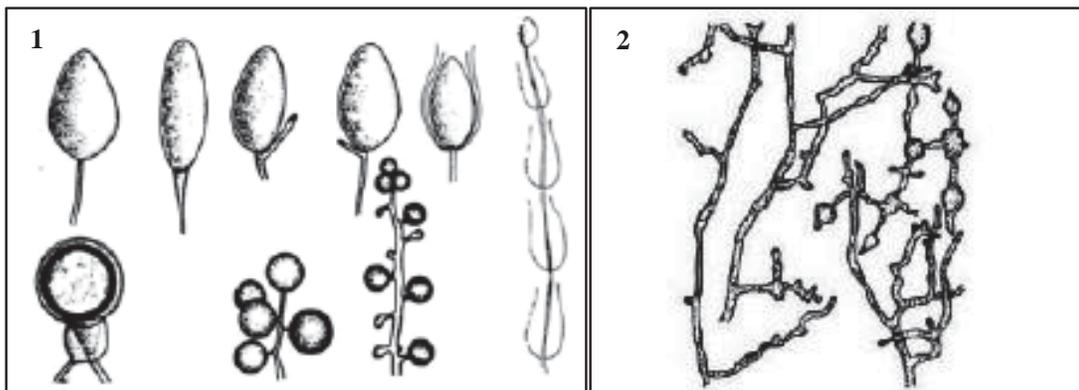


Figura 1: Estructuras de *Phytophthora cinnamomi* de izquierda a derecha: (1) esporangios, oospora y clamidosporas y (2) micelio toruloso (Drenth y Sendall, 2001).

4.2.4 CICLO DE LA ENFERMEDAD

Phytophthora cinnamomi produce diferentes estructuras que están involucradas en el desarrollo de la enfermedad y en la sobrevivencia. Estas estructuras son las zoosporas, clamidosporas y oosporas (Marais *et al.*, 2002).

Las zoosporas se forman dentro del esporangio (de 40 a 60), son liberadas en gran número y se trasladan a través del agua mediante flagelos; por el suelo, mediante el agua que pasa por los poros del suelo. El movimiento se debe a que son atraídas por sustancias que exudan las raíces de la planta “quimiotaxis positiva” (Zentmyer, 1985). Una vez que se han alojado, se enquistan y germinan (entre 24 a 48 horas) produciendo el tubo germinativo que es el que penetra la raíz (Aveling y Rijkenberg, 1986).

Marais y De La Harpe (1981) visualizaron las hifas de *P. cinnamomi* acuñadas entre las células corticales adyacentes de raíces de vid, las cuales colapsaron y se produjo la granulación del citoplasma. La penetración del patógeno fue por la entrada intercelular de la epidermis.

Posteriormente el micelio se desarrolla y va invadiendo el tejido de la raíz, causando daño celular y pudrición. La transmisión del micelio puede darse de planta a planta vía contacto de la punta de las raíces. Cuando existen condiciones de sequía, el oomyceto produce clamidosporas, las cuales son estructuras de resistencia. Estas se forman dentro de la raíz y son liberadas al suelo cuando la raíz muere. A bajas temperaturas del suelo (6 a 12 °C) se producen las oosporas, que son otro estado de resistencia del oomyceto (Zentmyer, 1985).

Las clamidosporas y oosporas pueden ser viables por varios años (seis años) en el suelo y causar una nueva infección cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables. Ambas germinan y dan origen a esporangios los cuales producen zoosporas infectantes (Marais *et al.*, 2002). La humedad del suelo es el principal factor ambiental que influye en el desarrollo de esporangios y las temperaturas bajas en la liberación de zoosporas, las que en presencia de una película de agua por quimiotaxis se dirigen hacia las raíces para infectarlas (Zentmyer, 1985).

P. cinnamomi sobrevive en restos vegetales muertos. La fase saprofítica puede permitir un incremento en la población del patógeno. Este patógeno sobrevive también en el suelo como micelio, esporangio, quistes de zoosporas, clamidosporas y oosporas. El micelio de *P. cinnamomi* vive más de 6 años en suelo húmedo (Mc Donald, 1978). Este patógeno es heterotálico; las oosporas son muy raras, y de germinación lenta (Zentmyer, 1980).

4.2.5 INTERACCIONES AMBIENTALES CON EL HOSPEDANTE Y EL PATÓGENO

Los factores ambientales incluyen: factores físicos (temperatura, humedad, textura del suelo entre otras), químicos (pH e intercambio iónico) y biológicos (bacterias, hongos y el crecimiento radical entre otras). Cada uno de estos factores y sus componentes varían en el tiempo y espacio y cada interacción lleva consigo una secuela de interacciones, por lo que se conoce al ambiente como dinámico, heterogéneo y de gradiente complejo (Cook *et al.*, 1995)

A. HUMEDAD DEL SUELO

La humedad del suelo es un factor ambiental primario que influye en el desarrollo de la pudrición de la raíz, en cuanto a la esporulación y proceso de infección resultantes. La alta humedad del suelo aumenta la infección, principalmente, debido al incremento de la formación de esporangios y las condiciones apropiadas para la liberación de zoosporas, movilidad y movimiento al sitio de infección (Zentmyer *et al.*, 1994).

La predisposición de la enfermedad ante excesos de riego, se debe a que *Phytophthora cinnamomi* forma esporangios sólo en medio de cultivos líquidos a diferencia de otras especies del mismo género. Además, el medio de cultivo líquido es esencial para la liberación de zoosporas desde el esporangio para su subsecuente dispersión, favoreciendo de esta manera el desarrollo de esta enfermedad. Ataca y penetra las raicillas de 1 a 3 mm de diámetro (Zentmyer, 1985). En concordancia con lo anterior Du Plessis (1991) señala que en suelos pesados siempre existe el peligro de sobresaturar los primeros estratos cuyas condiciones físicas y químicas empeoran con el tiempo, afectando la zona donde se encuentra el mayor número de raíces.

B. TEMPERATURA

La especie *P. cinnamomi* tiene un rango corto de temperatura en la cual puede formar esporangios, lo que limita su actividad patogénica a ciertas estaciones del año (Zentmyer, 1980). En invierno, las bajas temperaturas del suelo reducen la actividad del pseudohongo (Gardiazabal, 1991 y Whiley *et al.*, 1988). El mayor daño es causado en los meses de verano, donde se dan las mejores condiciones para el desarrollo del patógeno, con una gran abundancia de raíces finas absorbentes, susceptibles a la infección por el pseudohongo (Zentmyer, 1980). Las temperaturas óptimas para la infección de *Phytophthora cinnamomi* fluctúan entre 21-30 °C, mientras que hay poca o nula infección a 33 °C o entre 9-12 °C (Zentmyer *et al.*, 1994).

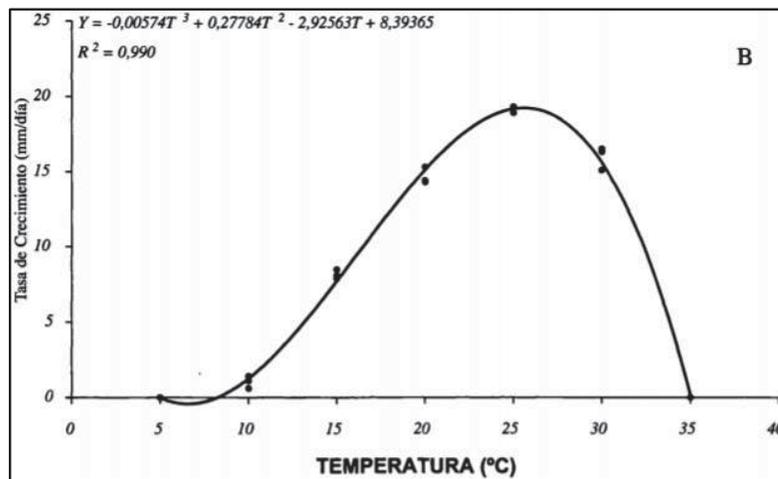


Figura 2: Curva de crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* en el medio de cultivo Zanahoria-Agar (Sánchez *et al.*, 2003).

C. INTERACCIÓN EN EL SUELO

P. cinnamomi puede sobrevivir en el suelo como micelio, esporangio, clamidosporas y oosporas y la supervivencia puede extenderse en presencia de un sustrato orgánico (Weste y Vithanage, 1979). El micelio de *P. cinnamomi* puede sobrevivir al menos seis años en el suelo húmedo. También sobreviven las clamidosporas, sólo si la humedad del suelo es superior al 3 % (Zentmyer y Mircetich, 1966).

En relación al pH, se favorece con suelos neutros a ácidos. Cuando este fluctúa entre 5.5 y 6.0 es ideal para la infección y desarrollo del pseudohongo (Zentmyer, 1980).

4.3 SUELOS SUPRESIVOS

Son aquellos que tienen capacidad para controlar enfermedades de origen edáfico (Broadbent y Baker, 1974 y Rodríguez-Zaragoza, 1994). Estos suelos existen de forma natural y deben ser buscados en aquellas zonas en donde esté el patógeno y acontezca la enfermedad. Por su modo de acción pueden ser clasificados en suelos que impiden el establecimiento del patógeno o que permitiendo su establecimiento impide su total o parcial manifestación (Reis, 1991).

Las interacciones negativas: comensalismo, depredación y parasitismo, entre las poblaciones microbianas del suelo constituyen la base natural del control biológico de plagas y enfermedades (Atlas y Bartha, 2002). Son estas interacciones las que se manifiestan en la mayoría de los suelos supresivos. Es así que las bacterias cumplen un papel muy importante en especial las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* que actúan en la degradación de factores de virulencia de patógenos, por medio de cultivo de toxinas (Broadbent y Baker, 1974 y Toyoda *et al.*, 1988), en la inactivación de factores de germinación, presentes en los exudados radiculares (Nelson, 1992), y además produciendo enzimas extracelulares que pueden degradar las paredes de las células del patógeno (Fridlender *et al.*, 1993).

4.4 RIZÓSFERA

En 1904, Hiltner definió la rizósfera como la parte del suelo donde el sistema radical induce la proliferación microbiana. Esta región, comprende entre 1-2 mm de suelo a partir de la superficie de la raíz. (Algunos autores consideran que el efecto puede extenderse hasta 4 mm). En esta zona se distinguen endorrizósfera (zona de tejido cortical donde pueden proliferar los microorganismos), rizoplano (superficie radical) y suelo rizosférico (Figura 3).

La presencia de patógenos en el suelo impone una presión selectiva sobre las plantas. Esto favorece la selección y supervivencia de las plantas que albergan en su rizósfera a microorganismos antagónicos a los patógenos. Esta estrategia natural de asociarse con los enemigos del patógeno ha sido aprovechada en los cultivos. En los cultivos de trigo se ha conseguido un incremento en la productividad de 33 % aplicando *Pseudomonas* que inhiben al hongo *Gaeumannomyces graminis*. Este es un caso, como muchos otros, en el que plantas

y animales se mantienen libres de infecciones por patógenos gracias a las floras microbianas naturales que albergan (Cook *et al.*, 1995).

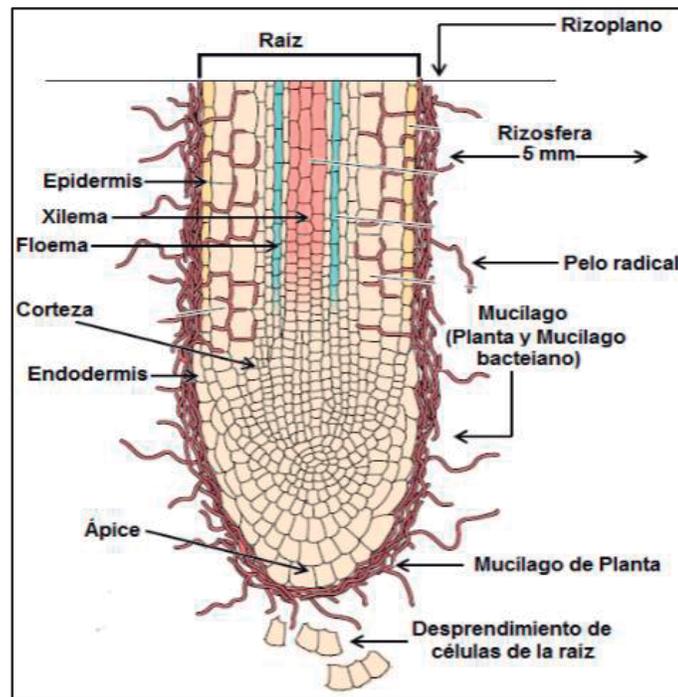


Figura 3: Partes de la zona de la rizósfera (Morales, 2013)

La producción de antibióticos para eliminar competidores requiere de un alto suministro de carbono. En la rizósfera se conjuga dicho suministro, un ambiente de alta interacción y actividad microbiana y una gran competencia, por lo que es un sitio en donde la síntesis de antibióticos puede ser ventajosa en la colonización.

Además de la competencia entre los microorganismos de la rizósfera, otro factor biótico que afecta la dinámica de las poblaciones es la depredación. En cada gramo de suelo viven millones de protozoarios que se alimentan principalmente de bacterias y de hongos (Ekelund y Ronn, 1994; Rodríguez-Zaragoza, 1994).

4.5 BACTERIAS ENDÓFITAS

Las bacterias endófitas residen en los tejidos de las plantas, principalmente en los espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta (Pérez *et al.*, 2009). La mayoría de las endófitas

colonizan diferentes compartimentos de la planta como apoplasto, incluyendo los espacios intercelulares de las paredes de las células y vasos del xilema. (Stone *et al.*, 2000).

Las bacterias endófitas son reconocidas como microorganismos que pueden ser aislados de tejidos vegetales y visiblemente no perjudican a éstas (Hallmann *et al.*, 1997; Sakiyama *et al.*, 2001).

Las bacterias endófitas pueden ser usadas como agentes de biocontrol mediante la producción de antibióticos (Ezra *et al.*, 2004), y producción de enzimas como hidrolasas (Chernin y Chet, 2002), quitinasas (Frankowski *et al.*, 2001), laminarinasas y gluconasas. De otra parte las endófitas han sido reportadas como inductoras de resistencia sistémica (IRS) (Ait Barka *et al.*, 2000, Ait Barka *et al.*, 2002). Por ejemplo, la cepa de *Pseudomonas* spp. PsJN una bacteria endófito identificada en plantas de cebolla, inhibe el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* reduciendo su crecimiento y para luego colonizar los tejidos de estas plantas (Barka *et al.*, 2002).

La colonización de plantas por bacterias endófitas como agentes de control biológico inducen diferentes modificaciones en la pared celular como la deposición de calosa, pectina, celulosa y compuestos fenólicos que inducen la formación de una barrera estructural en el sitio potencial de ataque del fitopatógeno (Benhamou, 2000). Otro de los mecanismos común de respuesta de las plantas colonizadas con endófitas frente a los fitopatógenos es la inducción de proteínas relacionadas con la defensa como peroxidasa, quitinasa y β -1,3 gluconasa (Fishal *et al.*, 2010). Lo más probable es que exista una combinación de varios mecanismos de biocontrol exhibido por muchas bacterias endófitas. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que algunos compuestos antimicrobianos están involucrados tanto en la antibiosis y la activación de ISR (Ongena *et al.*, 2007). La presencia de otros mecanismos, como la competencia por el hierro y por sitios de colonización es propuesta para algunas endófitas basadas en el análisis de sus genomas.

Las bacterias como *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* han sido identificadas por poseer actividades promotoras de crecimiento, mediante la versatilidad metabólica que poseen y la capacidad de utilizar diversos sustratos liberados por la planta para su desarrollo. Adicionalmente poseen tiempos cortos de generación, alta movilidad,

fijación biológica de nitrógeno, capacidad para colonizar las raíces y producción de metabolitos secundarios que pueden regular el crecimiento vegetal y regular las poblaciones microbianas rizosféricas (Kapulnik, 2002).

4.6 GÉNERO PSEUDOMONAS

Las *Pseudomonas* spp. son cosmopolitas y su presencia les permite colonizar cualquier sustrato imaginable. Algunas de éstas tienen un marcado carácter antagonista frente a otros microbios (Noval, 1991).

Una característica importante de éste género es que no tiene la capacidad de formar esporas como estructuras de resistencia (Holt *et al.*, 1994).

Las *Pseudomonas* muestran actividad antagonista tanto *in vivo* como *in vitro* y además de aparecer frecuentemente en los aislamientos provenientes de la rizósfera de varios suelos, normalmente son las bacterias cultivables más numerosas (Howell y Stipanovic, 1978).

4.6.1 TAXONOMÍA

Clasificación según la novena edición de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology:

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacterias

Clase: Gammaproteobacterias

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*

Especie: *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. chlororaphis*

4.6.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Según Palleroni (1984), mencionado por Noval (1991) presentan células en forma de varillas rectas o ligeramente curvadas, cuyo tamaño oscila entre 0.5-1.0 μm de ancho por 1.5-5.0 μm de largo; son gram-negativos y móviles mediante uno o varios flagelos polares; organismos aerobios. Son también productores de catalasa, reacciona en presencia de peróxido de hidrógeno.

Las condiciones para su crecimiento óptimo son una temperatura entre 25 y 30 °C y pH neutro (Palleroni, 2005).

Un rasgo característico de todas las especies de éste género, es la producción de pigmentos fluorescentes, que se hacen visibles en medio de cultivos deficientes de hierro, como es el King-B (Noval, 1991). Las pioverdinas son de color verde-amarillento, soluble en agua y con fluorescencia bajo luz ultravioleta. La longitud de onda para que la visualización sea óptima está alrededor de 400 μm .

Entre los medios de cultivos más utilizados para aislamiento figura el King-B que permite la exteriorización de pioverdina, pigmento fluorescente. Este medio de cultivo es útil para el aislamiento de todas las *Pseudomonas* fluorescentes de plantas; las mismas que producen pigmentos fluorescentes difusibles, verdes o azules en este medio de cultivo deficiente de hierro después de 24 a 48 horas de crecimiento. Sus colonias fluorescentes pueden ser visualizadas cuando las placas son sometidas a 366 nm de luz UV. (Schaad, 2001).

La eficacia de las *Pseudomonas* spp., como agentes de biocontrol, está estrechamente ligada a la producción de metabolitos secundarios (Walsh *et al.*, 2001). Su importancia radica en la capacidad que tienen para producir un efecto benéfico sobre las plantas, ya sea como promotores del crecimiento vegetal (PGPR) o como agente de control biológico (Bashan *et al.*, 2007).

4.6.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE *Pseudomonas fluorescens*

4.6.3.1 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA SISTEMICA (IRS)

Según Vidhyasekaran, 2004, las bacterias pueden inducir diferentes mecanismos en las plantas:

- Inducción de genes de defensa en las plantas colonizadas.
- Acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis y compuestos fenólicos que contienen grupos o-hidroxi.
- Producción de fitoalexinas.
- Incremento de la actividad peroxidasa, lisozima, fenilalanina amonio liasa (PAL) y ácido salicílico.

- La presencia de lipopolisacárido en las paredes de las células bacterianas que actúan como elicitores e inducen la resistencia frente a ciertas enfermedades.

4.6.3.2 PRODUCCIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL

Pseudomonas fluorescens tiene la capacidad de sintetizar o cambiar la concentración de ciertas sustancias promotoras del crecimiento vegetal, tales como ácido indolacético (AIA), ácido giberélico, citoquininas y etileno que pueden facilitar la absorción de nutrientes presentes en la solución del suelo (Vidhyasekaran, 2004).

4.6.3.3 CONTROL BIOLÓGICO

- Competencia por hierro (Fe^{+3}) mediada por sideróforos.
- Antibiosis.
- Detoxificación y degradación de los factores virulentos.
- Producción de enzimas líticas.
- Algunas PGPR logran reducir enfermedades mediante el mecanismo de inducción de resistencia sistémica.

En el caso de *Pseudomonas* spp, la síntesis del antibiótico fenazina tiene mayor importancia para que sobrevivan cuando la raíz está sana que si está infectada por *Gaeumannomyces graminis var tritici*. Las raíces infectadas tienen una población bacteriana mayor, probablemente debido a que los nutrientes se escapan a través de las lesiones producidas por la infección. En cambio, la restricción de nutrientes en las raíces sanas hace que la competencia por nutrientes sea más intensa y que la síntesis de antibióticos para eliminar a los competidores sea más valiosa (Mazzola *et al.*, 1992).

Las vías de la síntesis de antibióticos por rizobacterias han comenzado a analizarse. Por ejemplo, se sabe que los genes tienden a estar agrupados y que algunos genes regulativos están ligados. En *Pseudomonas fluorescens* la síntesis de oomicina A requiere de al menos ocho genes. Aparentemente existen tres niveles de regulación de síntesis del antibiótico. El primero está afectado por las condiciones ambientales, el segundo por procesos metabólicos y el tercero por la concentración de antibiótico alcanzada (Cook *et al.*, 1995).

La producción de antibióticos por la fauna microbiana contra patógenos, en la rizósfera, es análoga a la síntesis de fitoalexinas (defensa) por la planta. Se encontró que una proteína codificada en *Pseudomonas* muestra similitud con la chalcona-sintasa/stilbena sintasa de la vía del fenil-propano. En las plantas, estas enzimas tienen una función en la síntesis de flavonoides y fitoalexinas (Bangera *et al.*, 1994).

Esto sugiere que pudo haber ocurrido una transferencia genética entre planta y microorganismo o que ambos mecanismos pudieron haber tenido un origen evolutivo común. Probablemente los microorganismos produzcan compuestos como salicilato, que induce mecanismos de defensa en las plantas, de modo que también la participación de las plantas en su propia defensa puede ser activa y no solamente ofrecer un sitio para la competencia entre microorganismos (Cook, 1995).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 FASE CAMPO

5.1.1 UBICACIÓN DEL ENSAYO

En la fase de campo se muestrearon árboles de la especie *Persea americana* Mill., procedentes de campos de producción comercial y con objetivos de exportación de las zonas de Lima, Huaral y Casma,

5.1.2 MATERIAL VEGETAL

- Muestra de raicillas y suelo de campos de palto en producción, recolectadas de Casma, Huaral y La Molina.

5.1.2 MUESTREO

El muestreo se realizó en campos de palto localizados en Lima, Huaral y Casma, dichos campos reportaron problemas de pudrición radicular. En cada campo muestreado, se seleccionaron 10 árboles. De cada árbol se colectaron raicillas con un volumen de suelo rizosférico, de los cuatro puntos cardinales, con un equivalente total de 250 g. Cada árbol muestreado fue una submuestra. Las submuestras se depositaron en bolsas separadas cerradas herméticamente, las que fueron etiquetadas. Éstas a su vez transportadas y mantenidas en frío (uso de empaques Gel Pack), para mantener su temperatura y humedad, posteriormente llevadas al laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

5.2 FASE LABORATORIO

5.2.1 UBICACIÓN DEL ENSAYO

La fase laboratorio (aislamiento *in vitro*) se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio del Departamento de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el distrito de La Molina, Provincia y Departamento de Lima, situada a 12° 05' 06" S de latitud, 76° 57'07" W.G de longitud y 243.7 m.s.n.m.

5.2.2 MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIOS

5.2.2.1 EQUIPOS

- Autoclave vertical AL/D80L (Reles)
- Asa bacteriológica o asa de Kohl
- Balanza digital Adventurer (OHAUS)
- Beakers de 1000 ml (Pyrex)
- Bolsas de papel y polipropileno
- Cámara fotográfica digital (Sony)
- Luz ultravioleta baja o luz negra (366 nm)
- Congeladora
- Horno de secado o estufa
- Horno microondas
- Incubadora Thermo Scientific.
- Matraces Erlenmeyer
- Mechero
- Microscopio óptico (Leica DM 750)
- Parafilm
- Placas Petri de plástico de 100 x 15 mm
- Tubos de prueba 13x100 mm (Pyrex)
- Lámina porta y cubreobjetos

5.2.2.2 MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo de enriquecimiento asparagina para *Pseudomonas* spp.
- *Pseudomonas* Agar F (King B)
- Corn Meal Agar (CMA)
- Potate Dextrosa Agar (PDA)
- Triptona Soya Agar (TBS)
- Agar Nutritivo (AN)
- Agua peptonada

5.2.2.3 SOLUCIONES Y REACTIVOS

- Agua desionizada
- Alcohol al 70 y 96°C
- Glicerol
- Pimaricina (Natamycin)

- Ampicilina
- Rifampicina
- Benomyl
- Tetraciclina

5.2.2.4 MICROORGANISMOS

- *Pseudomonas* spp. y *Phytophthora cinnamomi* aisladas de rizósfera y suelo de campos de palto en producción, recolectadas de Casma, Huaral y La Molina.

5.2.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Se analizó por separado tanto la microflora de la rizósfera como la del suelo. En la cual, bajo condiciones asépticas se colocaron 3g de raíz de cada muestra en tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada en agitación continua, realizándose 7 diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}), adaptado del Manual de Laboratorio de Diagnóstico de hongos, bacterias y nemátodos fitopatógenos (Andres, 1991). Mientras que para la muestra de suelo cercano a la raíz se colocó 10 g en 90 ml de agua peptonada (proporción 1:9), siguiendo el mismo procedimiento anteriormente.

Posteriormente, se utilizaron las últimas diluciones para ser sembradas en tubos con caldo asparagina (conteo de *Pseudomonas*) incubados a 27 °C durante cuatro días (Martínez, 2010).

5.2.4. CONTEO DE *Pseudomonas* spp.

En cuanto a la cuantificación de *Pseudomonas* spp. se sembraron por triplicado 1 ml de la dilución (10^{-2} hasta 10^{-5}) en tubos que contenían 9 ml de caldo asparagina, dichos tubos fueron incubados durante cuatro días a 37 °C (Burges, 1960). Se realizó éste procedimiento tanto para raíz como para suelo. Posteriormente, se evaluó la presencia de fluorescencia al ser expuestos a una cámara de luz ultravioleta de 366 nm (Schaad, 2001).

5.2.5 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomonas* spp.

Los tubos que resultaron positivos (fluorescentes) al cultivo de caldo asparagina, fueron estriados en el medio de cultivo King-B e incubados por 48 horas y se evaluó la fluorescencia a la luz ultravioleta (366 nm) y la morfología de las colonias (Palleroni, 2005). Luego se seleccionaron las colonias que resultaron positivas a la fluorescencia.

De cada aislamiento, se seleccionó una colonia, la que fue estriada en el medio de cultivo Triptona Soya Agar (TSA) para asegurar la pureza de cada aislamiento y ser guardadas en cuñas de agar TSA a 4 °C para los siguientes ensayos (Martínez, 2010).

5.2.6 AISLAMIENTO DEL PATÓGENO (*Phytophthora cinnamomi* Rands)

Se seleccionaron raicillas de 1-3 milímetros de diámetro que presentaron la sintomatología típica correspondiente a una pudrición negra y firme que se originaba desde la zona de elongación. Se procedió a lavar con agua destilada y se cortaron segmentos de aproximadamente 1 cm de largo que presentaban la zona de avance del patógeno. Luego se sumergió por unos segundos en una solución de alcohol al 70 %, con el fin de prevenir posibles contaminaciones (Zentmyer, 1980).

Luego de estar seca la raíz, se cortaron pequeños trozos de tejido que contenían una parte de la lesión y otra de tejido de sano. Estos trozos de 1 a 2 mm² de tejido enfermo y asintomático fueron sembrados en medio de cultivo selectivo CMA (Corn Meal Agar) con PARB (Pimaricina-Ampicilina-Rifampicina-Benomil) (Erwin y Ribeiro, 1996). Se incubó a 22 °C por siete días y se observó la velocidad de crecimiento de la colonia y sus características (Alvarado-Rosales *et al.*, 2008).

Al transcurrir los siete días correspondientes al tiempo de incubación, se procedió a extraer discos desde el margen de la colonia en activo crecimiento, que fueron repicados en medio de cultivo CMA y nuevamente incubadas a 22 °C, para comprobar la pureza de la colonia. Los aislamientos de *Phytophthora* spp. utilizados en el presente trabajo de investigación se mantuvieron como colonia pura en CMA.

Cada colonia pura en CMA se repicó en medio de cultivo de agar Jugo V8 por cuatro días a 21 °C. A partir de rodajas de micelio crecido en agar Jugo V8 que se introdujo en placas Petri conteniendo solución suelo al 1 %, se visualizó estructuras del patógeno como: esporangios (Figura 4).

La identificación de *P. cinnamomi* fue siguiendo la clave Dichotomous Key to Taiwan Species of *Phytophthora* (Ho, 1992).

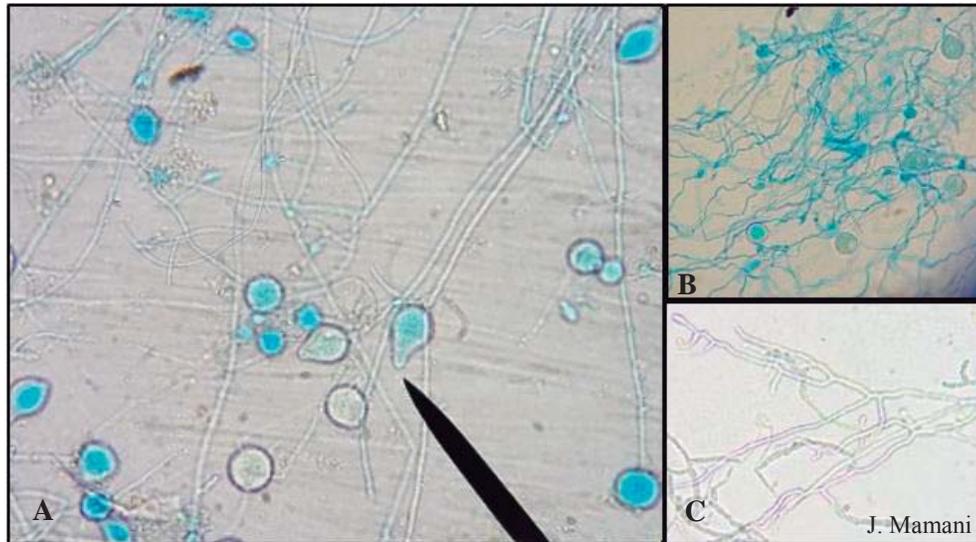


Figura 4: Vista microscópica de (A) Zoosporangios de *Phytophthora cinnamomi*, (B) Micelio toruloso, con protuberancias y vesículas y (C) Hifas cenocíticas.

5.2.7 PRUEBA DE ANTAGONISMO CONTRA *Phytophthora cinnamomi*

De cada aislamiento anterior, se identificaron las cepas que controlaron a *Phytophthora cinnamomi*, dichas cepas se utilizaron en la prueba de enfrentamiento en medio de cultivo Agar nutritivo. Se tuvo que preparar medio de cultivo en el que se incluyeran los reactivos correspondientes debido a que por separado no se tuvieron los resultados de ésta prueba. En cada placa conteniendo medio de cultivo PDA+ King-B + Agar Nutritivo se colocó estriado del controlador (cepa de *Pseudomonas* spp.) y un disco del patógeno, de tal forma que los estriados del controlador queden alrededor del disco de patógeno (Figura 5) y luego se incubó a 24°C.

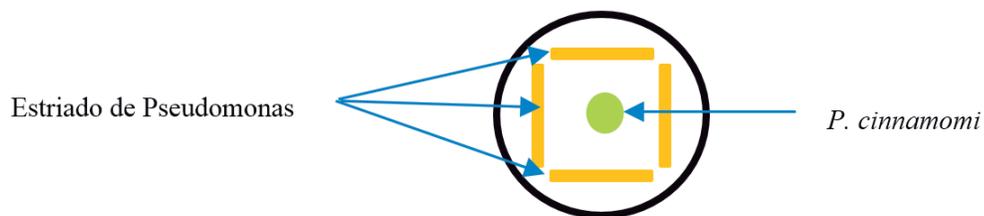


Figura 5: Esquema de enfrentamiento de *Pseudomonas* spp. con *P. cinnamomi*.

Esta metodología se realizó con el objetivo de identificar cepas de *Pseudomonas* spp. con mayor control sobre *P. cinnamomi*, que demuestren un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial del patógeno (%I).

Las evaluaciones se realizaron diariamente, se midió el crecimiento radial del patógeno en cada placa y se observó el comportamiento de ambos organismos. A continuación se tiene la fórmula del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial (%I):

$$\%I = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Donde:

%I= Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial

C= Medida del crecimiento radial del patógeno (*P. cinnamomi*) en el control.

T=Medida del crecimiento radial del patógeno (*P. cinnamomi*) en presencia del biocontrolador (*Pseudomonas* spp.).

5.3 FASE INVERNADERO

5.3.1 UBICACIÓN DEL ENSAYO

La fase invernadero se llevó a cabo en las instalaciones del Invernadero de Experimentación del Departamento de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el distrito de La Molina, Provincia y Departamento de Lima, situada a 12° 05' 06" S de latitud, 76° 57' 07" W.G de longitud y 243.7 m.s.n.m.

5.3.2 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron 40 plántones de palto var. Zutano de 4 meses de edad, las que previamente a la germinación se trataron (sumergieron en solución fungicida de Homai en dosis 5g/l de producto) según el protocolo de desinfección en el vivero del Programa de Investigación de Árboles Frutales de la Universidad Agraria La Molina. El trasplante a bolsas, se realizó a fines de enero del 2016 para luego ser llevadas al invernadero.

5.3.3 PREPARACIÓN DEL SUSTRATO

La mezcla de sustrato se constituyó de 50 % de suelo, 25 % de arena de río y 25 % de materia orgánica (Herrera y Narrea, 2011). Realizada la mezcla se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Luego de llenar se utilizaron el sustrato en bolsas de polietileno negro de medidas 8x16x2.2 (5.5 l) dentro de las cuales se colocó el suelo estéril. Se procedió al trasplante de plántones de palto var. Zutano. Los plántones provinieron del vivero del programa de frutales.

5.3.4 PREPARACIÓN, DENSIDAD E INOCULACIÓN DEL CONTROLADOR

Las cepas seleccionadas de *Pseudomonas* se sembraron en agua peptonada a 27 °C y 150 rpm hasta alcanzar una población de 6×10^8 UFC/ ml (Martínez, 2010).

5.3.5 INOCULACIÓN DEL PATÓGENO

De acuerdo con Drenth y Sendall (2001) en la inoculación se usa micelio desarrollado en trigo previamente esterilizado a 121 °C, 15 lb.pulg⁻² por 30 minutos por dos veces consecutivas.

Para las especies de *Phytophthora cinnamomi* que no esporulan fácilmente, el uso de un sustrato natural dará los mejores resultados. La inoculación al sustrato es una buena alternativa de infección, que se ve favorecida con abundante riego (Mcintosh, 1964).

La inoculación se hizo en plántones de palto de cinco meses de edad. La aplicación se hizo alrededor del sistema radicular del palto (Figura 6) a una profundidad de 5 cm (la dosis de inóculo fue 2.5 g de trigo con desarrollo micelial/kg de suelo) (Zentmyer y Richards, 1952). La humedad del sustrato fue mantenida con riego periódico para favorecer el desarrollo del patógeno.



Figura 6: Distribución del inóculo (micelio de *Phytophthora cinnamomi*) alrededor del sistema radicular de los plántones de palto (La Molina, 2016).

Para obtener una buena infección por *Phytophthora*, Drenth y Sendall (2001) recomiendan inundaciones durante tres días y ausencia de riego durante cuatro días. Estas secuencias crean el ideal ambiente para los zoosporangios y zoosporas de producción y un buen entorno para la infección por *Phytophthora*.

Se inoculó el micelio de *Phytophthora cinnamomi* diez días después de realizado la inoculación del controlador según referencia de Martínez (2010) en *Phytophthora infestans*.

5.3.6 PARÁMETROS A EVALUAR

5.3.6.1 SEVERIDAD

La severidad se midió mediante el procesamiento de fotografías digitales de raíces de palto por el programa ASSESS (Imagen analysis software for plant diseases quantification) distribuido por The American Phytopathological Society (Lamari, 2002). Los resultados se expresaron en porcentaje de tejido enfermo de las raíces.

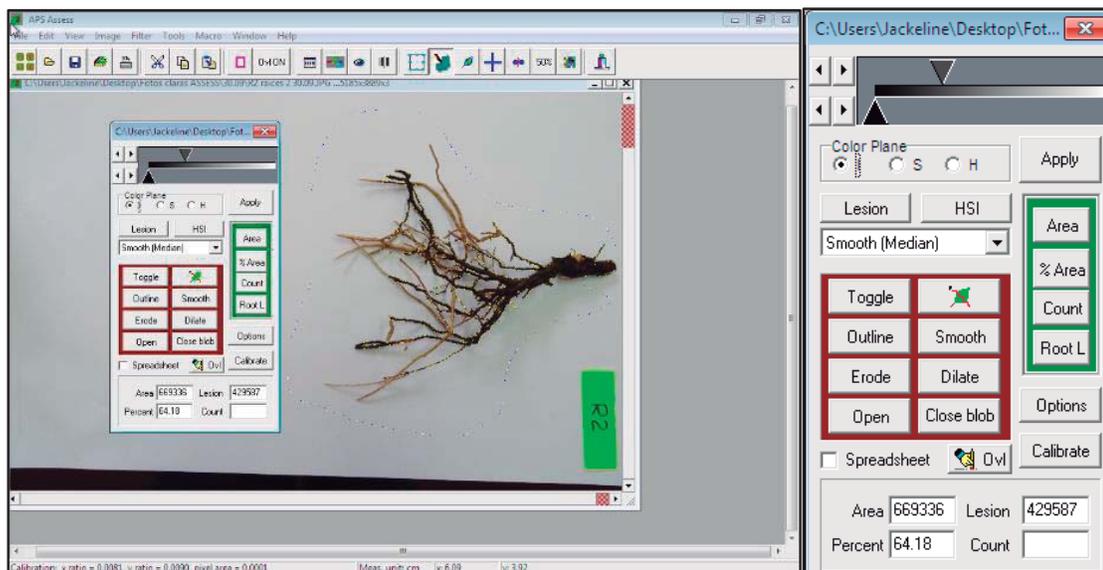


Figura 7: Proceso de cuantificación del porcentaje de severidad de sistema radicular de palto cv. Zutano previamente inoculado con *P. cinnamomi* y *Pseudomonas* spp., usando programa ASSESS.

5.3.6.2 LONGITUD DE RAÍCES

La longitud del sistema radicular fue calculada para cada repetición mediante el procesamiento de fotografías digitales por el programa ASSESS distribuido por The American Phytopathological Society (Lamari, 2002).

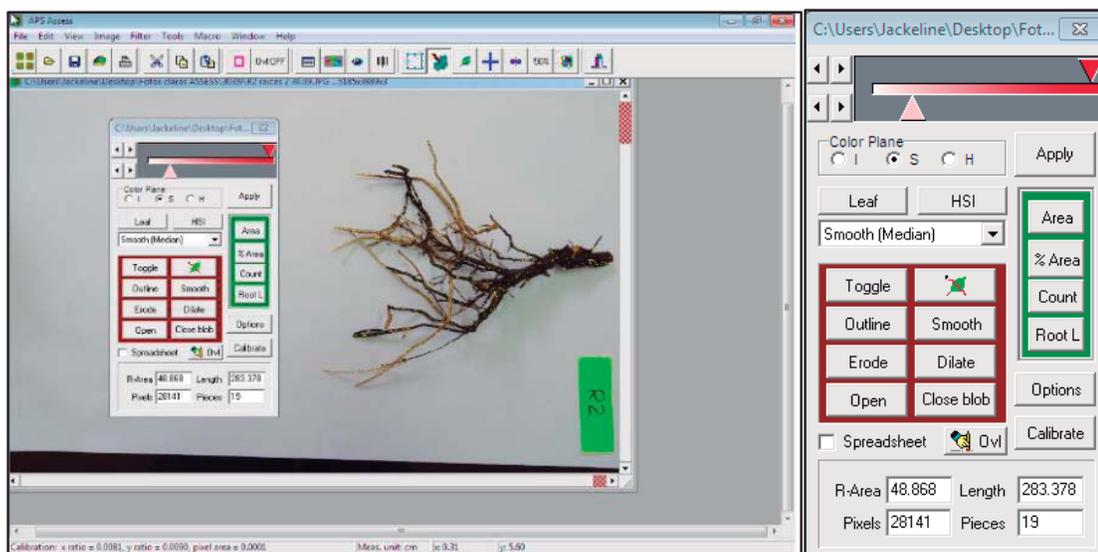


Figura 8: Proceso de cuantificación de la longitud de raíces de palto cv. Zutano previamente inoculado con *P. cinnamomi* y *Pseudomonas* spp., usando programa ASSESS.

5.3.6.3 ALTURA DE PLANTA

La evaluación se realizó con la ayuda de una regla milimetrada, se tomó la medida (longitud del tallo principal) desde el cuello de la planta hasta la yema terminal en el momento de inoculación del biocontrolador y al finalizar el experimento. Los resultados se expresaron en centímetros.

5.3.6.4 PESO FRESCO Y SECO DE RAÍCES

Para obtener el porcentaje de materia seca, las raíces de la planta se colocaron en bolsas de papel para ser pesadas, luego se llevaron a la estufa a una temperatura de 70 °C por 48 horas así obtener el peso seco; para la obtención de los pesos se usó una balanza electrónica los pesos fueron expresados en gramos.

5.3.6.5 PESO FRESCO Y SECO FOLIAR

Para obtener el porcentaje de materia seca, las hojas y tallo de la planta se colocaron en bolsas de papel para ser pesadas, luego se llevaron a la estufa a una temperatura de 70 °C por 48 horas así obtener el peso seco; para la obtención de los pesos se usó una balanza electrónica, los pesos fueron expresados en gramos.

5.3.7 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE *Pseudomonas* spp.

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas (ver cuadro 1) según Bergey (2005): producción de pigmentos fluorescentes, resistencia a altas y bajas temperaturas y licuación de gelatina, con el fin de caracterizar cepas de *Pseudomonas* fluorescentes no patógenas del resto de especies.

5.3.7.1 FLUORESCENCIA EN MEDIO DE CULTIVO King-B

El medio de cultivo de King-B se utiliza para la detección de fluoresceína, un verde o azul fluorescente y soluble en agua. Después de un crecimiento de 24-48 horas a 27 °C; se observaron las colonias, previamente estriadas en King-B, con una lámpara ultravioleta de longitud de onda larga (366 nm). Las impurezas tales como hierro reprimen la formación de pigmento y la fluorescencia de pigmentos formados (Schaad, 2001).

5.3.7.2 CRECIMIENTO A 4 °C.

Las cepas de *Pseudomonas* spp. se sembraron (con asa de siembra) en tubos conteniendo medio de cultivo TSA, los que fueron incubados a 4 °C. Esta prueba permite diferenciar a *P. putida* y *P. fluorescens*, quienes muestran crecimiento en el medio de cultivo (resultado positivo a la prueba), de *P. aeruginosa* (patogénica al hombre) (Schaad, 2001).

5.3.7.3 CRECIMIENTO A 41 °C

Las cepas de *Pseudomonas* spp. se sembraron (con asa de siembra) en tubos conteniendo medio de cultivo TSA, los que fueron incubados a 41 °C. Esta prueba permite diferenciar a *P. putida* y *P. fluorescens*, quienes no muestran crecimiento en el medio de cultivo (resultado negativo a la prueba), de *P. aeruginosa* (patogénica al hombre) (Schaad, 2001).

5.3.7.4 LICUACIÓN DE GELATINA

Esta prueba sirve para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan la gelatina. Es positivo para *Pseudomonas aeruginosa* (patogénica) (Mac Faddin, 1980).

Se prepararon los tubos conteniendo gelatina nutritiva (3 repeticiones por tratamiento). Luego se inocularon las cepas de *Pseudomonas* spp. por punción y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Por último, se colocaron en el refrigerador a 4 °C por 2 horas. La prueba fue positiva si el medio inoculado pasó a ser líquido y la prueba fue negativa si el medio inoculado mantiene sus características (Mac Faddin, 1980).

Cuadro 1: Reacción de distintas especies de *Pseudomonas* spp. frente a distintas pruebas bioquímicas, Bergey (2005).

	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Produce pigmentos fluorescentes	+	+	+
Crecimiento a 4 °C	+	+	-
Crecimiento a 41 °C	-	-	+
Licuación de gelatina	+/-	-	+

5.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño estadístico que se empleó en la prueba de antagonismo contra *Phytophthora cinnamomi*, fue un diseño estadístico completamente al azar (DCA), con diez tratamientos de cepas aisladas de *Pseudomonas* spp., cuatro placas por tratamiento y tratamiento control del patógeno *P. cinnamomi*, el parámetro que se evaluó en esta prueba fue el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial y las diferencias entre los promedio de cultivos se realizó a través de la prueba de Tukey (P= 0.05) (Martínez, 2010).

En invernadero, el análisis estadístico de varianza ANOVA y prueba Tukey con un nivel de significancia al 5 %, para así identificar si hay o no diferencias significativas entre los resultados obtenidos con cada cepa evaluada. Todas las herramientas estadísticas de análisis se aplicaron con una confianza mínima del 95 % y se utilizó el software SAS 9.2 (Martínez, 2010).

Cuadro 2: Descripción de los tratamientos del experimento en invernadero

Tratamientos	Descripción
T1	Tratamiento inoculado con <i>P. cinnamomi</i> + Cepa <i>Pseudomonas</i> spp. obtenida de la repetición 2 aislado de raíz en Casma (R2)
T2	Tratamiento inoculado con <i>P. cinnamomi</i> + Cepa <i>Pseudomonas</i> spp. obtenida de la repetición 5 aislado de raíz en Casma (R5)
T3	Tratamiento inoculado con <i>P. cinnamomi</i> + Cepa <i>Pseudomonas</i> spp. obtenida de la repetición 7 aislado de raíz en Casma (R7)
T4	Tratamiento inoculado con <i>P. cinnamomi</i> + Cepa <i>Pseudomonas</i> spp. obtenida de la repetición 10 aislado de raíz en Casma (R10)
T5	Tratamiento inoculado con <i>P. cinnamomi</i> + Cepa <i>Pseudomonas</i> spp. obtenida de la repetición 10 aislado de suelo en Casma (S10)
T6	Tratamiento inoculado con <i>P. cinnamomi</i> + Cepa <i>Pseudomonas</i> spp. obtenida de la repetición 6 aislado de suelo en Casma (S6)
T7	Tratamiento control inoculado con <i>P. cinnamomi</i> (Phy)
T8	Tratamiento control absoluto (T)

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomonas* spp.

De las zonas muestreadas se obtuvo una densidad bacteriana de *Pseudomonas* spp. que varió entre 10^5 y 10^8 NMP/g de raíces y suelo seco. Estos valores están en el rango de aislamientos realizados por Fernández (2015) con una población de 10^3 - 10^6 NMP/g de rizósfera. En el Cuadro 3 se observa que la zona de Casma presentó los niveles más altos de densidad bacteriana debido a que el fundo muestreado promueve la flora microbiana con aplicaciones de materia orgánica. Se trabajó con cepas de Casma, por tener mayor potencial de inóculo en comparación con las otras zonas muestreadas.

Cuadro 3: Conteo de *Pseudomonas* spp. (NMP/g) aisladas de suelos de costa.

Zona		NMP/g
Lima	Suelo	2.3×10^6 organismos /g de suelo
	Raíz	2.3×10^6 organismos/g de raíz
Huaral	Suelo	9.3×10^5 organismos /g de suelo
	Raíz	4.3×10^5 organismos/g de raíz
Casma	Suelo	$>1.1 \times 10^8$ organismos /g de suelo
	Raíz	$>1.1 \times 10^8$ organismos/g de raíz

Los aislamientos que crecieron y emitieron fluorescencia en caldo asparagina fueron estriados en medio de cultivo King-B (llamado también *Pseudomonas* agar F) para el aislamiento de todas las *Pseudomonas* spp. (Schaad, 2001) tal como se observa en la Figura 9 y 10, así diferenciarlas de otros microorganismos gram negativos que no emiten fluorescencia. Se obtuvieron 14 aislamientos positivos para dicha prueba; las que fueron codificadas en el Cuadro 4.

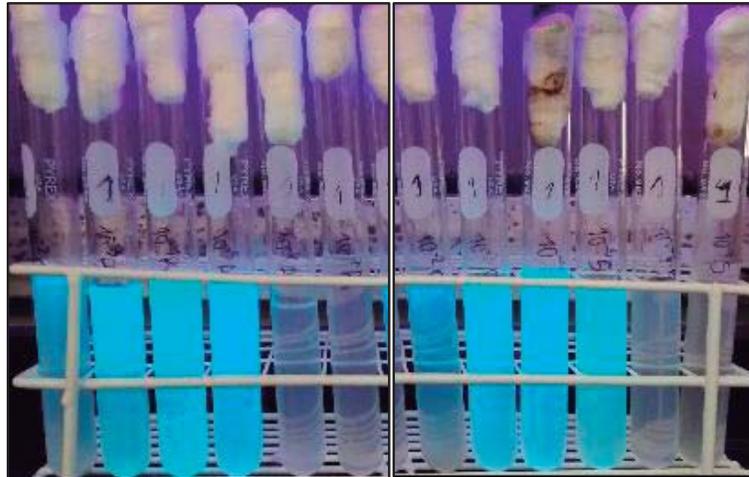


Figura 9: Fluorescencia de *Pseudomonas* spp., procedentes de campos en producción de palto, en diluciones (10^{-2} a 10^{-5}) en caldo asparagina, de raíz y suelo de campos de producción de palto de La Molina (La Molina, 2015).



Figura 10: Emisión de fluorescencia de aislamientos de *Pseudomonas* spp., procedentes de campos en producción de palto, en medio de cultivo King-B (La Molina, 2015).

Cuadro 4: Cepas de *Pseudomonas* spp. aisladas de la rizósfera y suelo de campos de producción de palto de Casma (La Molina, 2015).

Cepa	Aislamiento
R1, R2, R4, R5, R7 y R10	Raíz
S1, S2, S3, S4, S6, S7, S9 y S10	Suelo

6.2 EFECTO ANTAGÓNICO PRUEBA *in vitro*

En búsqueda del medio de cultivo más adecuado para el enfrentamiento de *P. cinnamomi* y *Pseudomonas* spp. se hicieron ensayos previos en medio de cultivo PDA y King-B.

Cuadro 5: Descripción de tratamientos de enfrentamiento de *P. cinnamomi* y *Pseudomonas* spp. en medio de cultivo PDA y King-B

Medio de cultivo	Tratamientos	Descripción
PDA	T3	Siembra 1º día Phy. 2º día Pseu.
	T4	Siembra 1º día Phy. 2º día Pseu.
KING-B	T3	Siembra 1º día Phy. 2º día Pseu.
	T4	Siembra 1º día Phy. 2º día Pseu.

El crecimiento de *Pseudomonas* spp. en medio de cultivo PDA es escaso y en el medio de cultivo King-B, exuberante (Figura 11). Mohammed *et al.* (2004) observaron en confrontación *in vitro* de *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) frente al patógeno *P. capsici*, que a los 5 días comenzó la degradación o muerte de micelio que se manifestó por la aparición de un color verde amarillento, acompañado de la desaparición del micelio fúngico. La zona necrosada fue aumentando y a los 10 días, la colonia de *P. capsici* quedó reducida a una masa gelatinosa de color amarillenta, observado también en los tratamientos del medio de cultivo King-B (Figura 11). El Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) evaluó cepas de *Pseudomonas* frente al hongo *Sclerotium rolfsii* mediante cultivo dual en papa dextrosa Agar más King-B y Agar nutritivo, determinando la inhibición del crecimiento micelial del hongo.

En el presente trabajo, debido que los resultados no fueron uniformes (Figura 11) se siguió lo desarrollado por el ICIDCA de usar medio de cultivo combinado (King-B+ PDA+ Agar nutritivo) en la prueba de antagonismo.

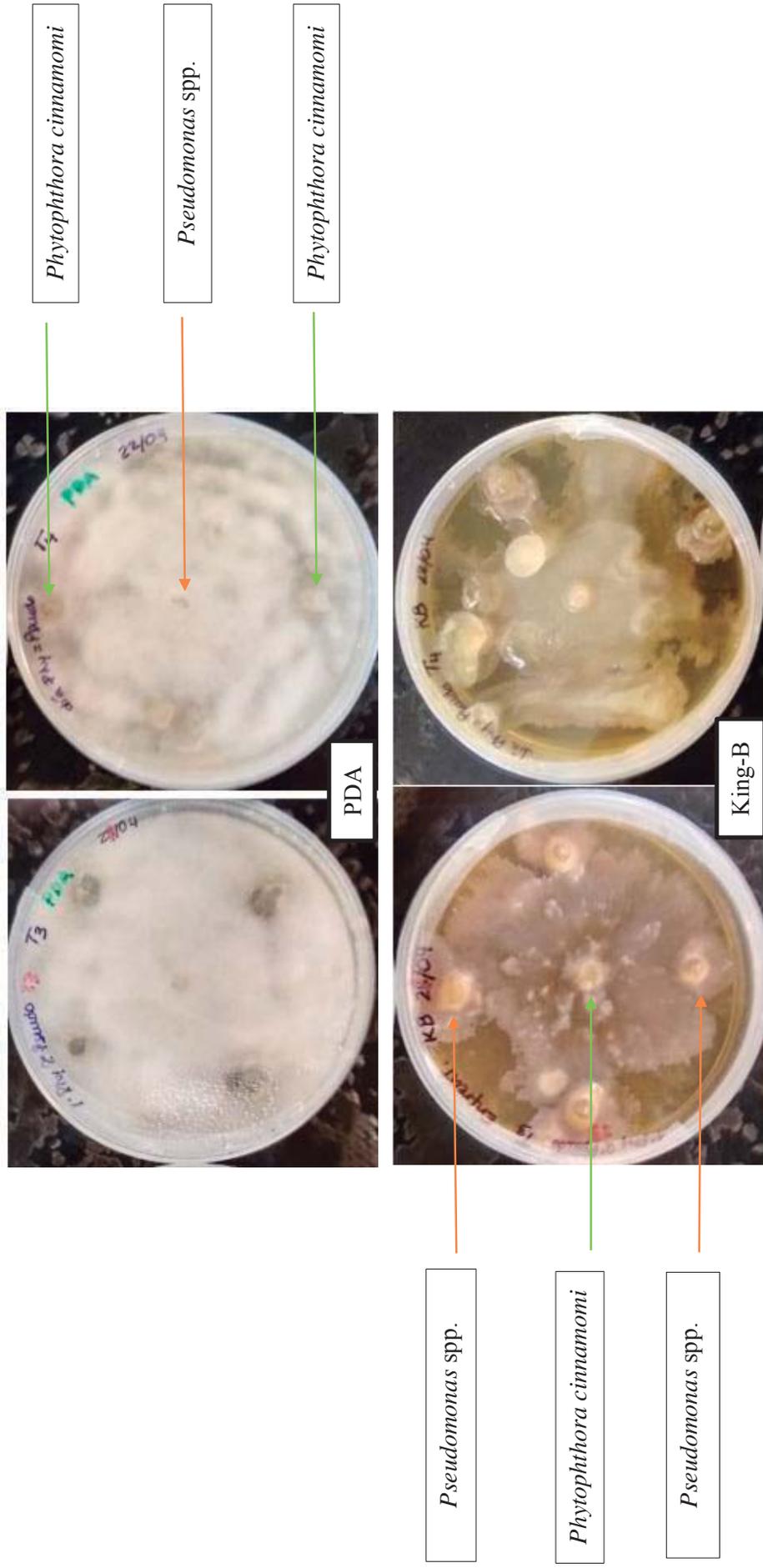


Figura 11: Crecimiento y desarrollo de *P. cinnamomi* y *Pseudomonas* spp. en medio de cultivo PDA y King-B a los 13dds (La Molina, 2015).

En la Figura 14, se observa que los aislamientos provenientes de suelo (S7, S10, S2, S9, S4, S1, S6 y S3) inhiben el avance de *P. cinnamomi*; siendo constante en el tiempo, mientras que en los aislamientos provenientes de raíces (R7, R10, R4 y R5) hay una fuerte inhibición a los 4 dds (días después de la siembra), pero se pierde rápidamente en el tiempo.

Todas las cepas evaluadas (Figura 13) reportaron algún tipo de antagonismo variando los porcentajes de inhibición entre 28.3 a 47 % (Figura 15). En anteriores investigaciones Villa *et al.* (2005) encontraron que cepas de *Pseudomonas* spp., inhiben el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* entre el 60 y 90 %. Otros estudios también reportan que *Pseudomonas cepacia* y *P. fluorescens* fueron significativas para suprimir *P. cinnamomi* que crecieron en *in vitro* e *in vivo* (Turnbull *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2001).

Los aislamientos R2, R5, R7, R10, S6 y S10 mostraron crecimientos por encima del micelio de *P. cinnamomi*, quedando reducido a una masa gelatinosa amarilla. A partir de ahí se tomaron muestras para ser vistas en microscopio. En aislamientos del enfrentamiento *P. cinnamomi* y *Pseudomonas* fluorescentes vistas en microscopio (40X), se observó en la Figura 12 la desintegración del contenido citoplasmático del micelio de *P. cinnamomi*. Esta misma degradación parcial o coagulación del contenido citoplasmático se observa en cultivos de *Phytophthora capsici* con *Pseudomonas fluorescens* en la que Diby (2005) lo atribuye a enzimas hidrolíticas. Broadbent y Baker (1974) también demostraron que *P. putida* y *P. fluorescens* aisladas de suelos de palto, causaron lisis masiva de micelio de *P. cinnamomi* *in vitro*.



Figura 12: Desintegración o lisis de contenido citoplasmático de *Phytophthora cinnamomi* frente a *Pseudomonas* spp. Vista en microscopio (40x) (La Molina, 2015).

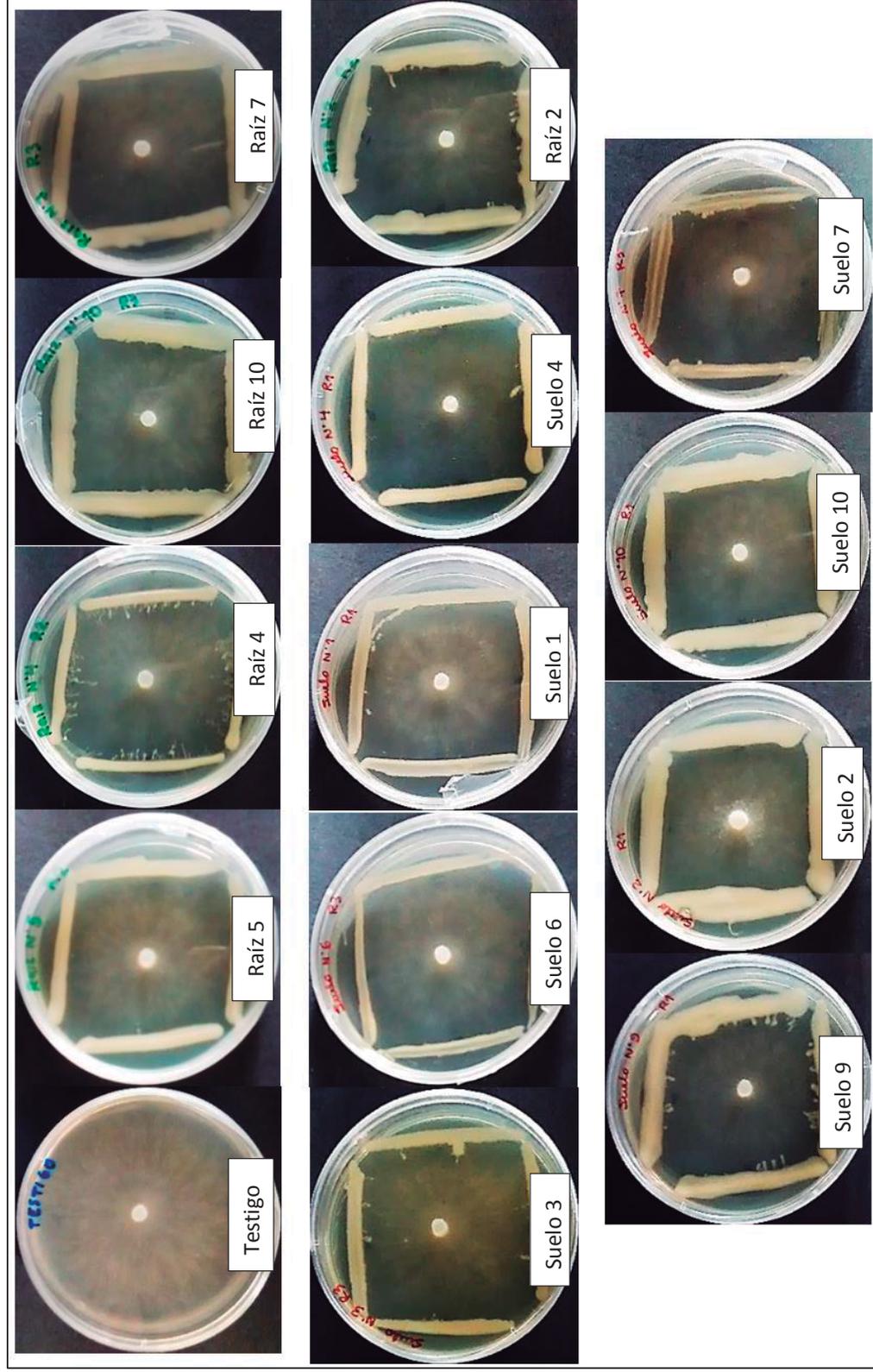


Figura 13: Comportamiento de *Phytophthora cinnamomi* por acción de distintas cepas de *Pseudomonas* spp., aisladas de campos de producción de palto, en medio de cultivo PDA+King-B+AN (La Molina, 2015).

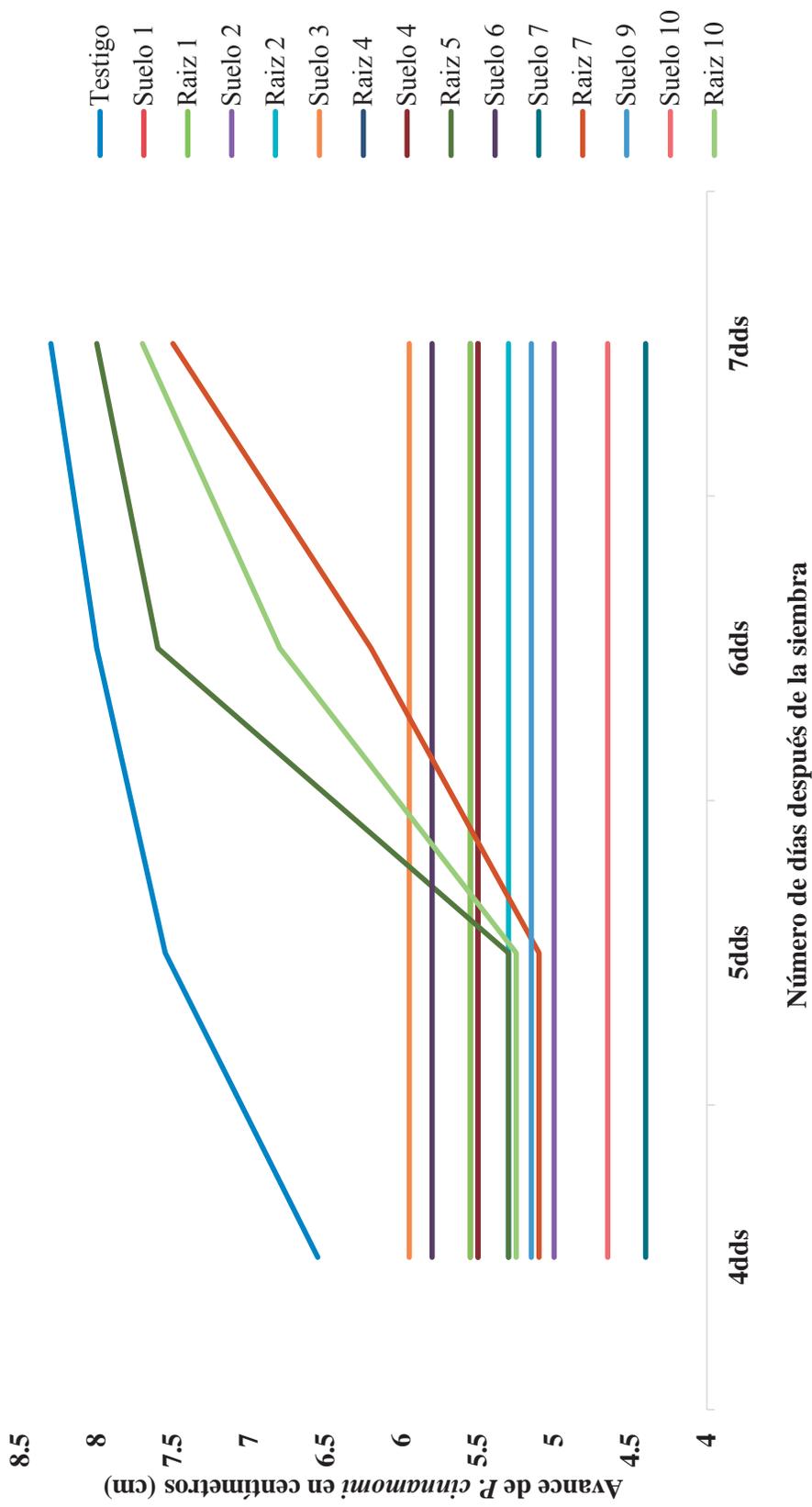


Figura 14: Avance de *P. cinnamomi* (en centímetros) frente a *Pseudomonas* spp. en prueba *in vitro* (La Molina, 2015)

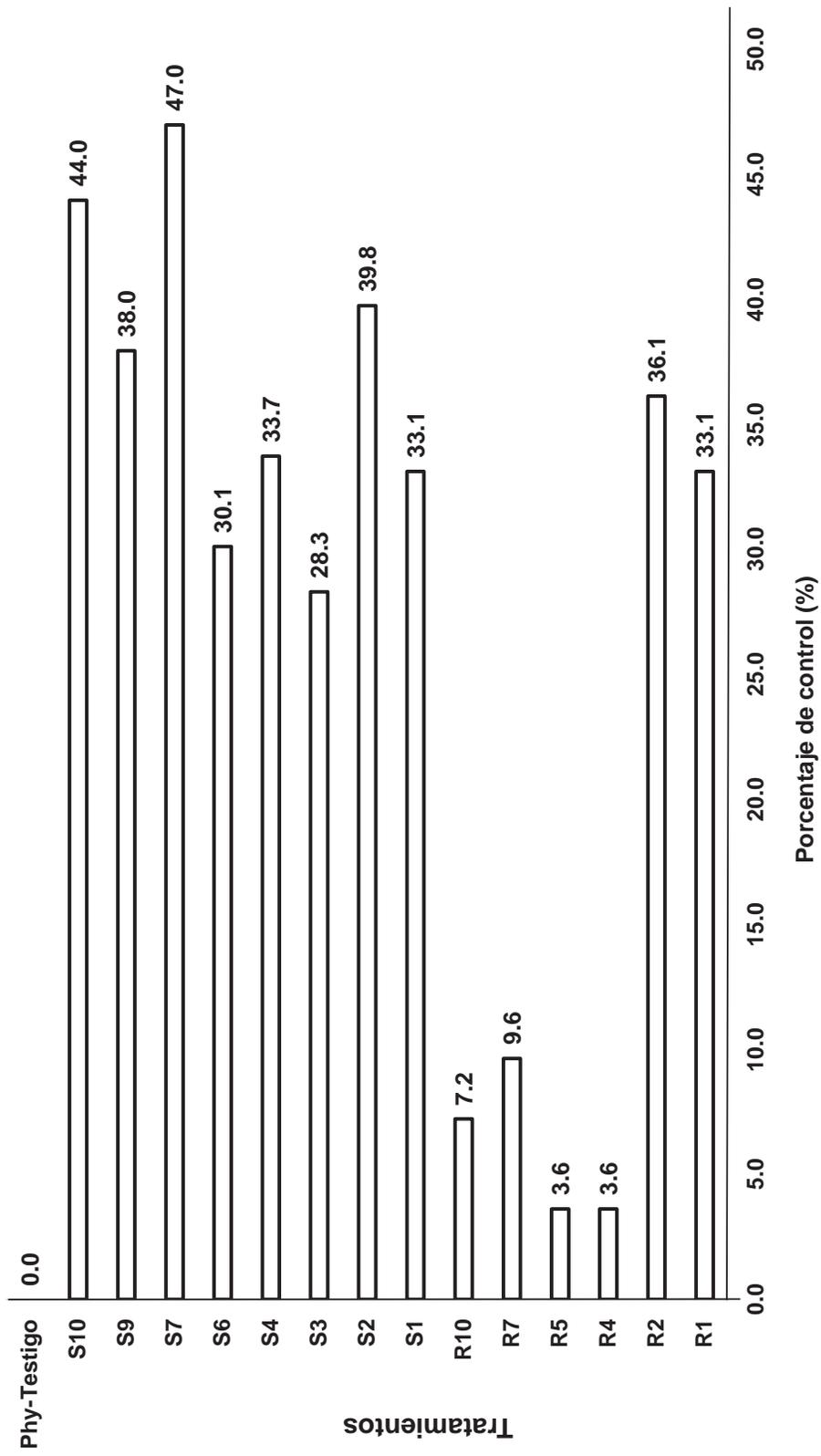


Figura 15: Porcentaje de control de *P. cinnamomi* frente a *Pseudomonas* spp. en prueba *in vitro* a los 7 días después de la siembra (La Molina, 2015).

En las pruebas de caracterización bioquímica, según Manual de Bergey, realizadas a las cepas de *Pseudomonas* spp. seleccionadas (R2, R5, R7, R10, S6 y S10) se obtuvo los resultados (Cuadro 6) en el cual se determina que las cepas evaluadas no correspondan a *Pseudomonas aeruginosa* (patogénica al hombre).

Cuadro 6: Reacción de distintas cepas de *Pseudomonas* spp. a las pruebas bioquímicas (Schaad, 2001).

	Produce pigmentos fluorescentes	Crecimiento a 4°C	Crecimiento a 41°C	Licua ción de gelatina
<i>P. fluorescens</i>	+	+	-	+/-
<i>P. putida</i>	+	+	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	+	+
Cepa R2	+	+	-	-
Cepa R5	+	+	-	-
Cepa R7	+	+	-	-
Cepa R10	+	+	-	-
Cepa S10	+	+	-	-
Cepa S6	+	+	-	-

En el Cuadro 6 se observa la reacción positiva de fluorescencia bajo UV (366 nm) para todas las cepas promisorias de la presenta investigación las cuales corresponden a *Pseudomonas* fluorescentes, un rasgo característico de todas las especies de éste género (Noval, 1991).

Rodríguez *et al.* (2005) demostraron que para aislar *Pseudomonas aeruginosa* (patógeno oportunista en humanos) se debe cultivar la bacteria en un medio de cultivo carente de carbohidratos (medio de cultivo gelatina), así demostrar la presencia de gelatinasas. Las cepas promisorias de *Pseudomonas* dieron resultado negativo a esta prueba (cuadro 6). Por tanto, resultan no patogénicas al hombre.

Pseudomonas putida y *Pseudomonas fluorescens* son incapaces de crecer a 42 °C y no producen piocianina a diferencia de *P. aeruginosa*, corroborado por la UK Standards for Microbiology Investigations (2015).

6.3 EVALUACIÓN EN INVERNADERO

Para el ensayo se seleccionaron 6 cepas de *Pseudomonas* spp. (R2, R5, R7, R10, S6 y S10) que mostraron crecimientos por encima del micelio de *P. cinnamomi*, debido a que la acción de éstas cepas produjo la degradación del fitopatógeno tornándose en una masa gelatinosa amarilla. Luego se evaluó el efecto de la inoculación de cepas de *Pseudomonas* spp. sobre *Phytophthora cinnamomi*. Los resultados se muestran en los cuadros 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13. Las pruebas ANOVA y Tukey en los Anexos 3-17.

6.3.1 EVALUACIÓN DE LA SEVERIDAD EN RAÍCES DE PALTO

Los tratamientos R5, S10, R10, R7 y R2 (60.4, 66.2, 69.0, 77.5, 78.4 y 90.7 % respectivamente) presentan porcentaje de severidad que no resulta significativamente diferente del tratamiento inoculado con el patógeno. Por otro lado el tratamiento S6 presenta diferencia significativa con el tratamiento testigo y el tratamiento inoculado con *P. cinnamomi* con sólo 44.8 % de severidad en raíces de palto (Cuadro 7 y Figura 16).

Cuadro 7: Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. y de la infección de *P. cinnamomi* sobre la severidad (%) de raíces de palto, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Cepas	Severidad (%)
T1	R2	60.4 ab
T2	R5	90.7 a
T3	R7	66.2 ab
T4	R10	69.0 ab
T5	S10	78.4 a
T6	S6	44.8 b
T7	Phy	77.4 a
T8	Testigo	6.5 c

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

Se han descrito varios mecanismos posibles por los cuales las *Pseudomonas* del suelo suprimen a las condiciones relacionadas con la patogenicidad. Es así que De la Fuente *et al.* (2000) identificaron tres cepas nativas de *Pseudomonas* fluorescentes (UP61, UP143 y UP148) productoras de HCN, sideróforos fluorescentes como pioverdina, proteasas y antibióticos [2,4 diacetilfloroglucinol (DAPG), PLT (pioluterina), PRN (pirrolnitrina) y

derivados de fenazina] con actividad antifúngica. La producción de antibióticos por *Pseudomonas fluorescentes* también fue descrita por Thomashow y Weller (1996).

En el Cuadro 16, las cepas R5 y S10 mostraron valores de severidad (90.72 y 78.45 %, respectivamente) por encima del testigo inoculado con *P. cinnamomi* (77.46 %), ésta pérdida de capacidad antagónica podría explicarse por la disminución de la población de estas cepas, así lo explican Van Overbeek, *et al.* (1997) que el suelo no rizosférico puede ser desfavorable para el crecimiento microbiano, y la introducción de suspensiones bacterianas a menudo resultan en disminuciones rápidas en el tamaño de la población y en la actividad.

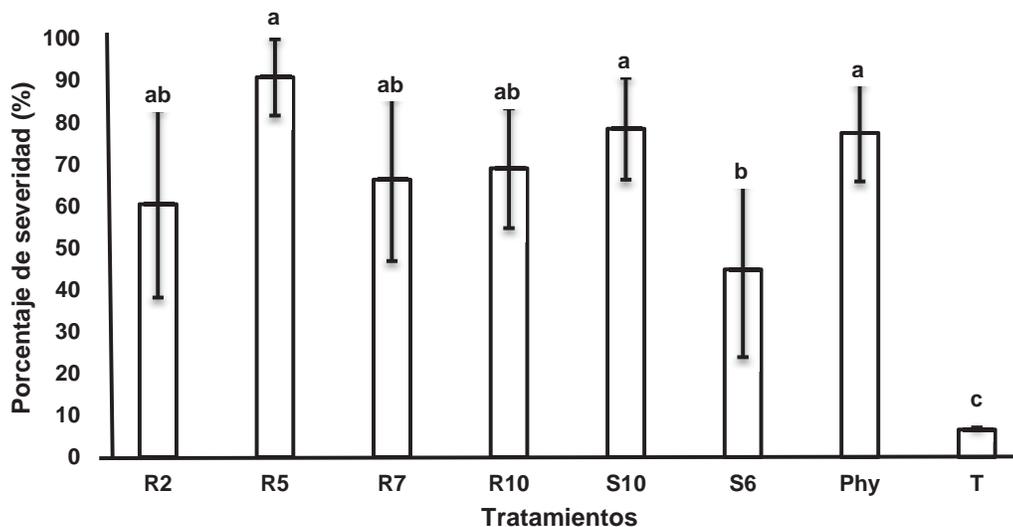


Figura 16: Porcentaje de severidad de *P. cinnamomi* frente a la inoculación de cepas de *Pseudomonas* spp. en palto bajo condiciones de invernadero.

En la Figura 17 se observa que el mejor tratamiento en el control de *P. cinnamomi* en invernadero fue el T6 (inoculado con la cepa S6 de *Pseudomonas* spp.) con un 59.04 % de control.

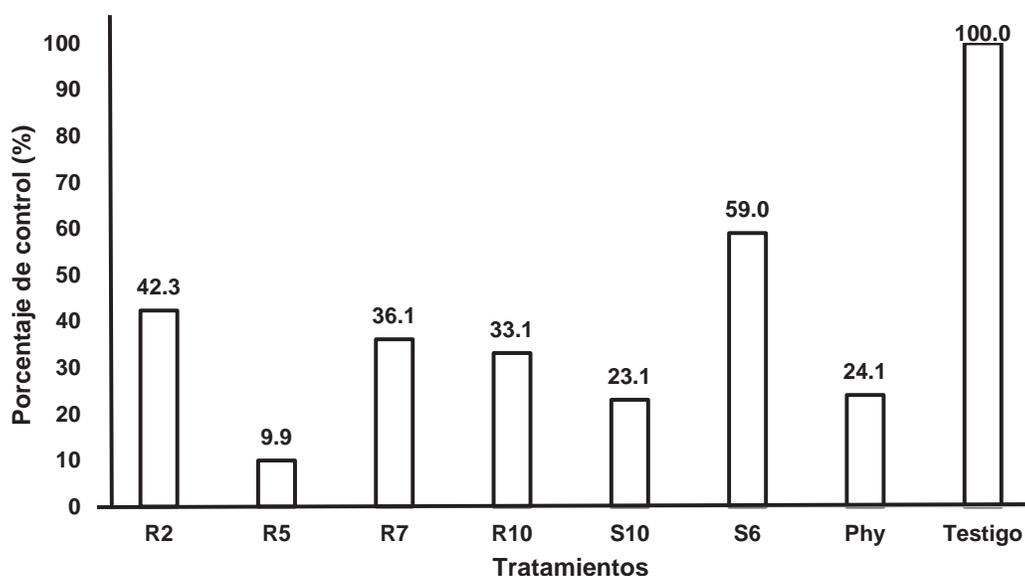


Figura 17. Porcentaje de control de *P. cinnamomi* frente a la inoculación de cepas de *Pseudomonas* spp. en palto bajo condiciones de invernadero.

Por tanto el efecto del tratamiento S6 podría explicarse por mecanismos como la competencia por el hierro, la competencia por sitios de colonización y por los nutrientes exudados de la raíz, así como la inducción de mecanismos de defensa de las plantas (Van Weels *et al*, 1997). Otro mecanismo de control es la producción de enzimas extracelulares, como las quitinasas, laminarasas y glucanasas que pueden degradar las paredes de las células fúngicas. Van Weels *et al* (1997) aislaron una cepa de *Pseudomonas stutzeri* que produjo quitinasa y laminarasa extracelulares, y encontraron que estas enzimas digieren y lisan el micelio de *Fusarium solani*.

6.3.2 EVALUACIÓN DE LA LONGITUD DE RAÍCES DE PALTO

El efecto de *Pseudomonas* spp., en la longitud de raíces de palto presentó diferencia significativa entre tratamientos. En todos los tratamientos se observó menor longitud de raíces en comparación del tratamiento testigo (Cuadro 8). Por tanto las cepas de *Pseudomonas* inoculadas influyeron en el crecimiento radicular, pero no lograron diferencia significativa respecto al testigo.

Los tratamientos S6, R2 y S10 presentaron longitudes de raíces mayores (1142.2, 841.1 y 989.1, respectivamente) al control inoculado con el patógeno (648.1), siendo los mejores

según la prueba de Tukey (Cuadro 8), dichos resultados serían explicados por Marques *et al* (2010) quienes afirman que la producción de IAA por PGPR generalmente provoca la elongación y acumulación de P y N en los tejidos de la planta. En el sistema radicular, se ha visto que los altos niveles de IAA incrementan la formación de raíces laterales y adventicias, pero inhibe el crecimiento de la raíz primaria.

Cuadro 8: Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. y de la infección de *P. cinnamomi* sobre la longitud de raíces de palto, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Cepas	Longitud de raíces
T1	R2	989.1 b
T2	R5	160.6 c
T3	R7	672.2 bc
T4	R10	640.5 bc
T5	S10	841.1 b
T6	S6	1142.2 b
T7	Phy	648.1 bc
T8	Testigo	3924.6 a

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

En la Figura 18 se observa mayor intervalo de varianza en las repeticiones del T8 (testigo absoluto).

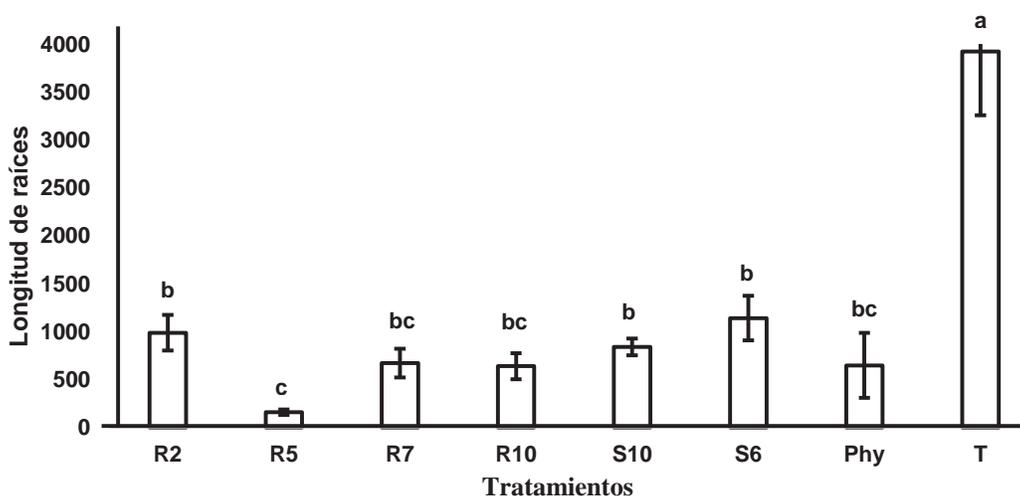


Figura 18. Longitud de raíces de palto de tratamientos inoculados con cepas *Pseudomonas* spp. frente a *P. cinnamomi* bajo condiciones de invernadero.

6.3.3 EVALUACIÓN DEL INCREMENTO DE ALTURA DE PLANTA DE PALTO

De los 6 tratamientos probados, la inoculación de las cepas S6 y R2 presentaron mayor incremento de altura, 11.4 y 9.3 cm respectivamente, en comparación con el tratamiento testigo (Cuadro 9 y Figura 19). No existe diferencia significativa entre los tratamientos S6 y R2 según la prueba Tukey al 95 %. Este mejoramiento del crecimiento también fue observado en la década de los 70, donde algunas cepas de *Pseudomonas* fluorescentes mejoraban el crecimiento de papa y caña de azúcar cuando eran aplicadas a las semillas (Schroth y Hancock, 1982).

Cuadro 9: Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. y de la infección de *P. cinnamomi* sobre el incremento de altura (cm) de palto, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Cepas	Incremento de altura (cm)
T1	R2	9.3 ab
T2	R5	4.0 d
T3	R7	7.6 bc
T4	R10	5.1 cd
T5	S10	3.1 d
T6	S6	11.4 a
T7	Phy	2.1 d
T8	Testigo	4.5 d

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

En la figura 19 se observa que en todos los tratamientos con inoculación de *Pseudomonas* spp. los valores de la media están por encima de la del testigo inoculado con *P. cinnamomi* (2.1 cm). Los tratamientos inoculados con cepas de *Pseudomonas* spp. presentan mayor amplitud del intervalo de varianza de sus repeticiones.

Las *Pseudomonas* pueden actuar como promotores del crecimiento de plantas en dos formas: directamente por supresión de patógenos o indirectamente a través de la secreción de fitohormonas y vitaminas, o por incremento de la absorción de minerales por planta.

Glick (1995) propone que las *Pseudomonas* pueden manifestar sus efectos promotores de crecimiento de forma indirecta, estimulando la acciones benéfica de otros microorganismos asociados a la raíces, como las micorrizas. Cuando la estimulación del

crecimiento vegetal se produce en ausencia de otros microorganismos, debido a la producción de fitohormonas estimuladoras del crecimiento vegetal o a la degradación de precursores del etileno en la raíz por parte de estas bacterias.

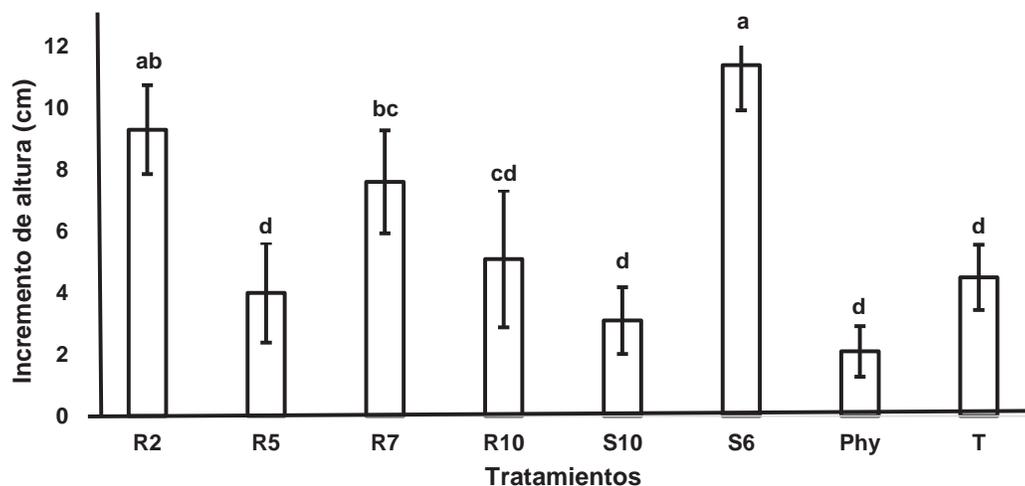


Figura 19. Incremento de altura de palto de tratamientos inoculados con cepas *Pseudomonas* spp. frente a *P. cinnamomi* bajo condiciones de invernadero.

6.3.4 EVALUACIÓN DEL PESO FRESCO RADICULAR

En cuanto al peso fresco foliar, los tratamientos S10 y S6 (45.68 y 45.22 g) presentan diferencia significativa respecto al tratamiento inoculado con *P. cinnamomi* (30.88 g), pero menor al tratamiento testigo absoluto (148.64 g), observado en el Cuadro 10. Para esta variable las repeticiones de cada tratamiento fueron valores cercanos, así menor intervalo de varianza.

Cuadro 10: Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. y de la infección de *P. cinnamomi* sobre el peso fresco radicular (g) de palto, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Cepas	Peso fresco foliar (g)
T1	R2	33.32 b c
T2	R5	17.34 c
T3	R7	31.50 b c
T4	R10	31.50 b c
T5	S10	45.68 b
T6	S6	45.22 b
T7	Phy	30.88 b c
T8	Testigo	148.64 a

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

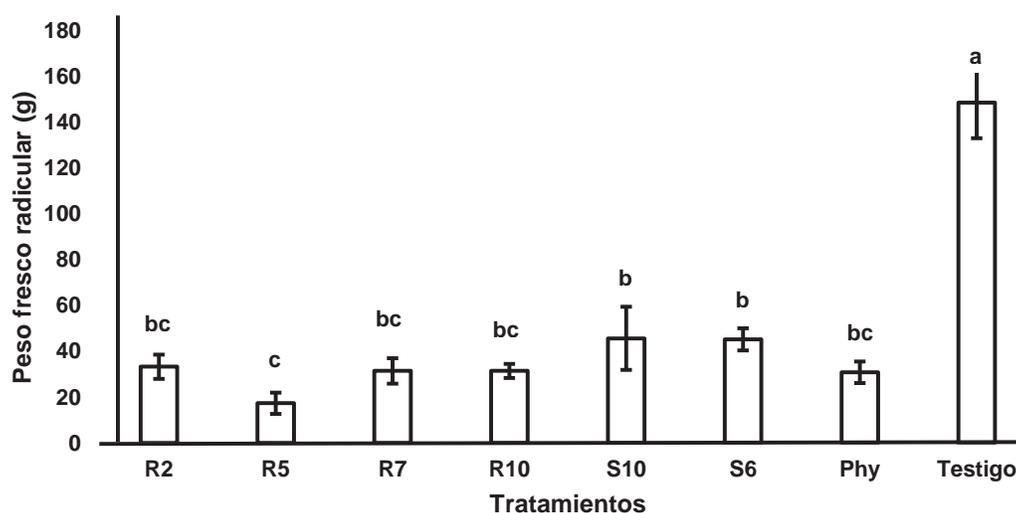


Figura 20: Peso fresco radicular de palto de tratamientos inoculados con cepas *Pseudomonas* spp. frente a *P. cinnamomi* bajo condiciones de invernadero.

6.3.5 EVALUACIÓN DE LA MATERIA SECA RADICULAR

Con respecto al porcentaje de materia seca de raíces, existe diferencia significativa entre los tratamientos, resultando mejor el tratamiento S10 con 29 % de materia seca de raíces, en comparación con el testigo inoculado con *P. cinnamomi* (18.68 %). Faggioli *et al.* (2007) también observaron que la inoculación de plantas de maíz con PGPR no influye significativamente en la altura pero si en el porcentaje de materia seca (cuadro 11 y figura 21)

Cuadro 11: Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. y de la infección de *P. cinnamomi* sobre la materia seca radicular (%) de palto, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Cepas	Materia seca radicular (%)
T1	R2	24.2 a b c d
T2	R5	25.7 a b c
T3	R7	27.9 a b
T4	R10	27.5 a b
T5	S10	29.6 a
T6	S6	22.1 b c d
T7	Phy	18.6 d
T8	Testigo	20.3 c d

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

En la figura 21 se observa que de los mejores tratamientos (R2, R5, R7 y S10), el tratamiento T4 (cepa R7) presentó menor intervalo de varianza en sus repeticiones.

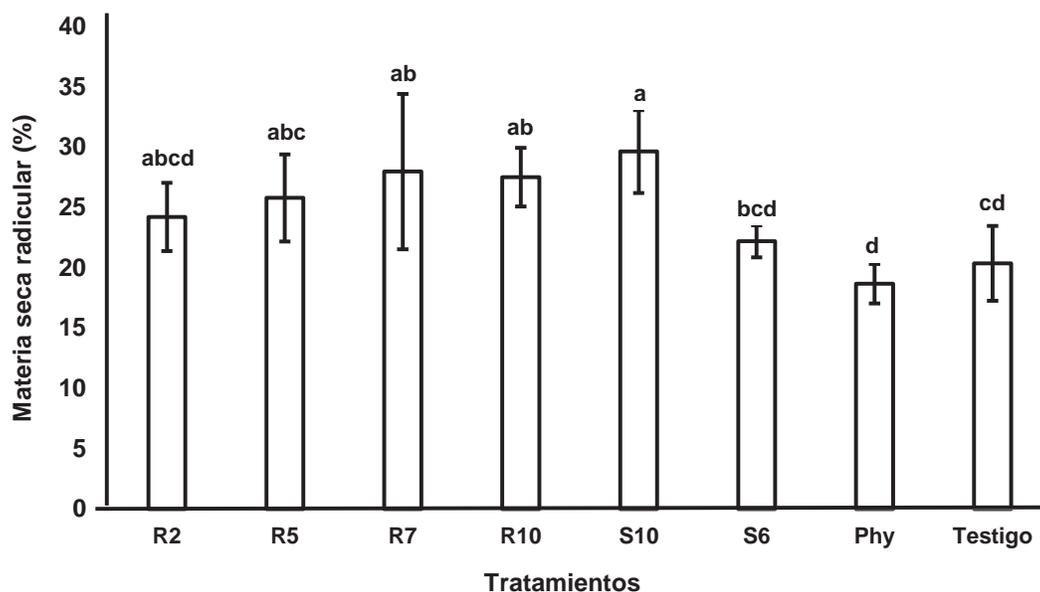


Figura 21: Materia seca radicular (%) de palto de tratamientos inoculados con cepas *Pseudomonas* spp. frente a *P. cinnamomi* bajo condiciones de invernadero.

6.3.6 EVALUACIÓN DEL PESO FRESCO FOLIAR

En cuanto al peso fresco foliar, los tratamientos R7 y S6 (110.4 y 91.8 g) presentan diferencia significativa respecto al tratamiento inoculado con *P. cinnamomi* (48.7 g), pero menor al tratamiento testigo absoluto (156.68 g), observado en el Cuadro 12.

Cuadro 12: Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. y de la infección de *P. cinnamomi* sobre el peso fresco foliar (g) de palto, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Cepas	Peso fresco foliar (g)
T1	R2	74.8 bcd
T2	R5	66.7 cd
T3	R7	110.3 b
T4	R10	69.0 cd
T5	S10	81.6 bcd
T6	S6	91.7 bc
T7	Phy	48.6 d
T8	Testigo	154.6 a

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

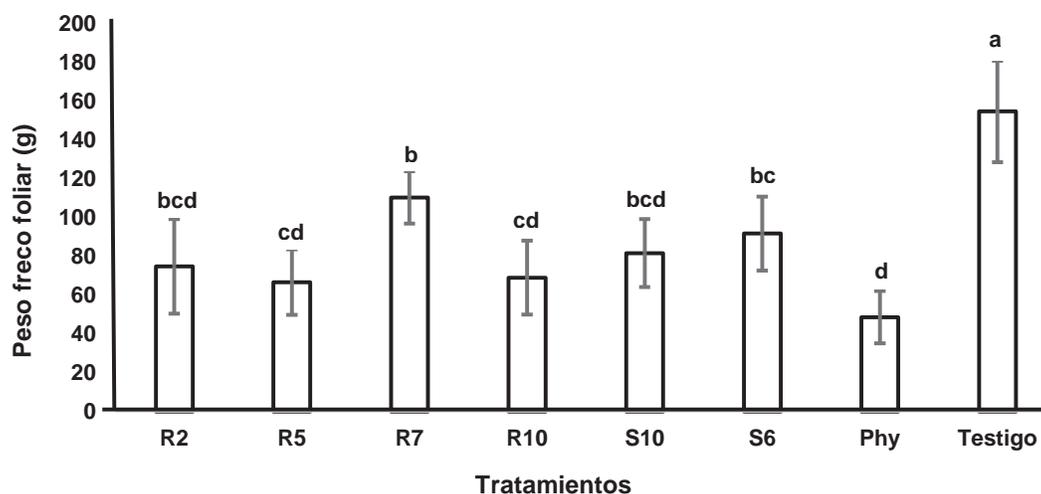


Figura 22: Peso fresco foliar de palto de tratamientos inoculados con cepas *Pseudomonas* spp. frente a *P. cinnamomi* bajo condiciones de invernadero.

6.3.7 MATERIA SECA FOLIAR

En el Cuadro 13, entre los tratamientos no existe diferencia significativa; pero en la figura 30 se observa que las repeticiones de los tratamientos T2 (R5), T3 (R7) y T5 (S10) presentan valores máximos por encima del valor máximo del testigo absoluto (T).

Cuadro 13: Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. y de la infección de *P. cinnamomi* sobre la materia seca foliar (%) de palto, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Cepas	Materia seca foliar (%)
T1	R2	32.2 a
T2	R5	36.3 a
T3	R7	36.3 a
T4	R10	31.9 a
T5	S10	33.1 a
T6	S6	33.1 a
T7	Phy	31.6 a
T8	Testigo	36.0 a

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

En la figura 23 se observa que los valores de la media de los tratamientos inoculados con *Pseudomonas* spp. (R2, R5, R7, R10, S10 y S6) están por encima de la media del tratamiento inoculado con *P. cinnamomi*.

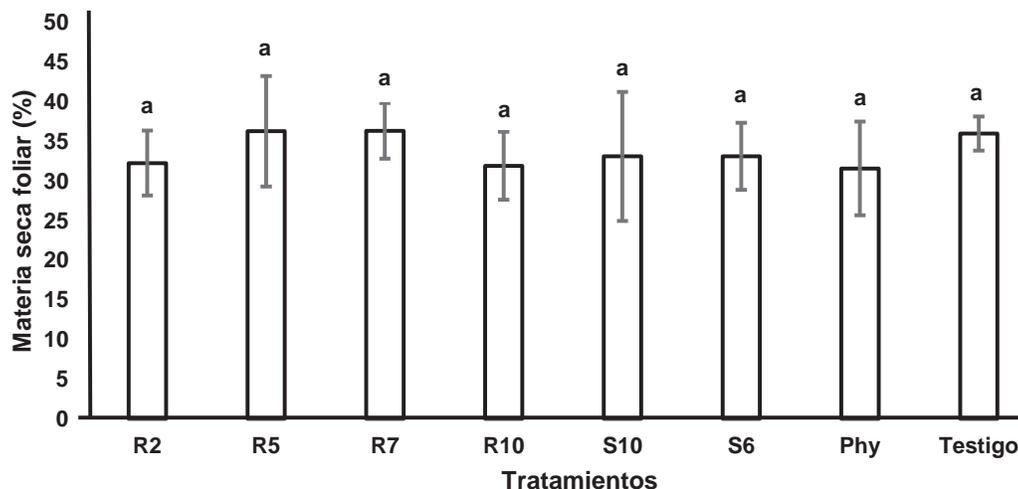


Figura 23: Materia seca foliar (%) de palto de tratamientos inoculados con cepas *Pseudomonas* spp. frente a *P. cinnamomi* bajo condiciones de invernadero.

En el Cuadro 14 y Figura 24 se observa que el mejor tratamiento en el control de *P. cinnamomi* es el T6 (cepa S6), sin embargo esta cepa no logra alcanzar un alto porcentaje de materia seca radicular. Por otro lado con la inoculación de la cepa S10 (T5) se consigue mayor desarrollo radicular, por tener mayor valor en porcentaje de materia seca.

Cuadro 14: Efecto de la inoculación de cepas de *Pseudomonas* spp. y de la infección de *P. cinnamomi* sobre la severidad, incremento de altura, biomasa foliar y radicular, materia seca foliar y radicular y longitud de raíces de palto, bajo condiciones de invernadero (La Molina, 2016)

Tratamientos	Cepas	Severidad (%)	Incremento de la altura (cm)	Biomasa foliar (g)	Materia seca foliar (%)	Longitud de raíces (cm)	Biomasa de raíces (g)	Materia seca de raíces (%)
T1	R2	60.4 ab	9.3 ab	74.86 bcd	32.2 a	989.1 b	33.3 bc	24.2 abcd
T2	R5	90.7 a	4.0 d	66.70 cd	36.3 a	160.6 c	17.3 c	25.7 abc
T3	R7	66.2 ab	7.6 bc	110.38 b	36.3 a	672.2 bc	31.5 bc	27.9 ab
T4	R10	69.0 ab	5.1 cd	69.04 cd	31.9 a	640.5 bc	31.5 bc	27.5 ab
T5	S10	78.4 a	3.1 d	81.68 bcd	33.1 a	841.1 b	45.6 b	29.6 a
T6	S6	44.8 b	11.4 a	91.76 bc	33.1 a	1142.2 b	45.2 b	22.1 bcd
T7	Phy	77.4 a	2.1 d	48.68 d	31.6 a	648.1 bc	30.8 bc	18.6 d
T8	T	6.5 c	4.5 d	154.68 a	36.0 a	3924.6 a	148.6 a	20.3 cd
C.V (%)		24.85	25.17	22.07	15.48	26.17	17.55	13.98

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

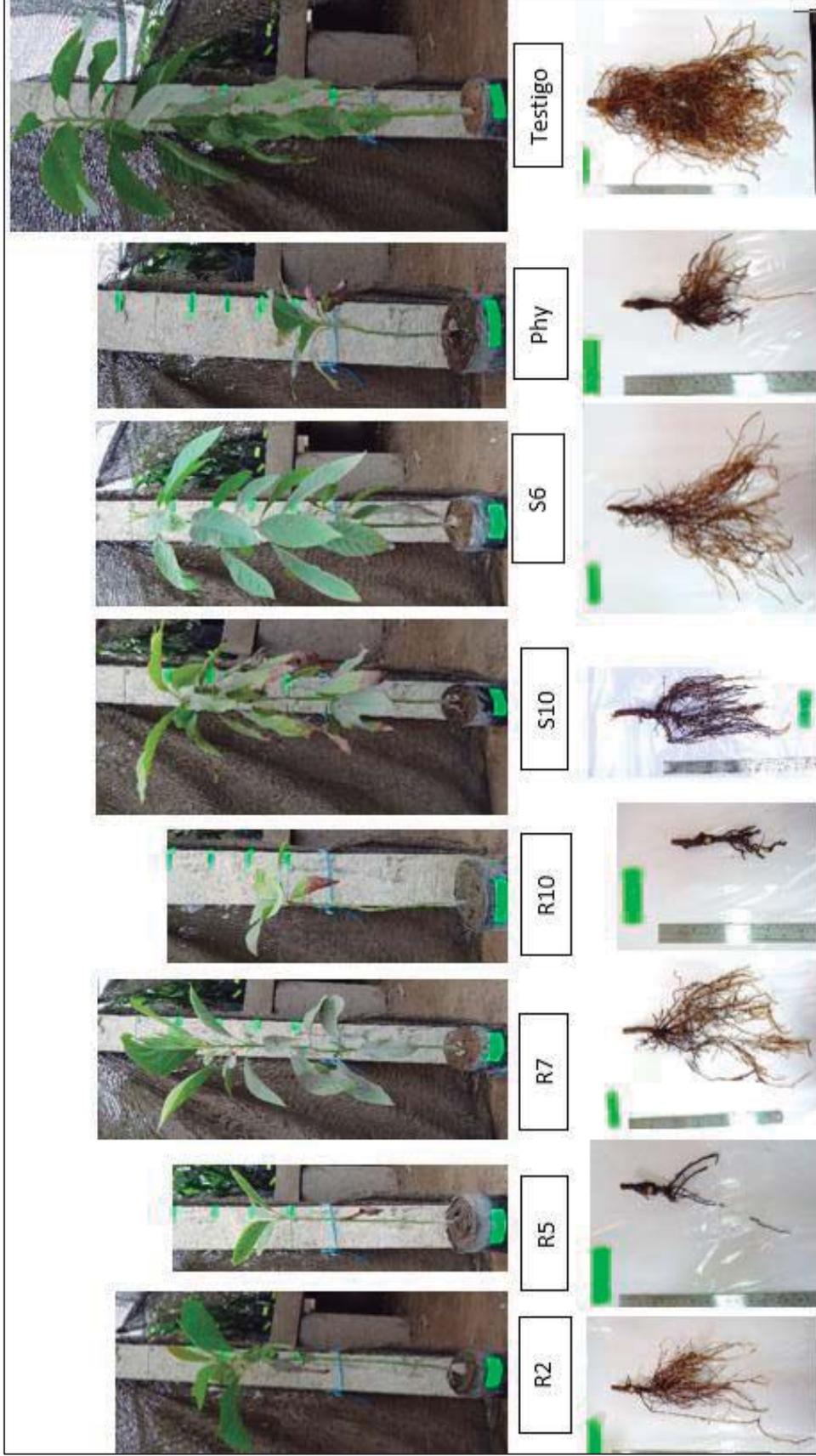


Figura 24. Fotografía de área foliar y radicular de palto inoculados con *Pseudomonas* spp. y *P. cinnamomi* (La Molina, setiembre 2016).

6.3.8 CONTEO DE *Pseudomonas* spp. AISLADAS DE SUELO Y RAÍCES DE PALTO BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO

A partir del sustrato utilizado en el invernadero, se hicieron aislamientos de suelo y raíz de cada tratamiento. Se observó presencia de *Pseudomonas* spp. en diluciones de 10^5 a 10^7 (Cuadro 15 y Figura 25). Bloemberg *et al.*, (2001) recalcan la importancia de la colonización de las raíces y la competencia de la rizósfera en el uso de rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas en la práctica agrícola. De ahí la importancia de evaluar la presencia de *Pseudomonas* fluorescentes, por el Número Más Probable (NMP).

Las cepas inoculadas de *Pseudomonas* spp. se mantuvieron presentes a lo largo del experimento en invernadero.

Cuadro 15: Conteo de *Pseudomonas* spp. aisladas de plántulas de palto de invernadero (La Molina, 2016)

Tratamiento	NMP/g
R2	1.1×10^7 organismos/g de raíz
R5	1.1×10^7 organismos/g de suelo
R7	2.1×10^5 organismos/g de suelo
R10	1.1×10^7 organismos/g de raíz
S10	1.1×10^7 organismos/g de suelo
S6	1.1×10^7 organismos/g de suelo

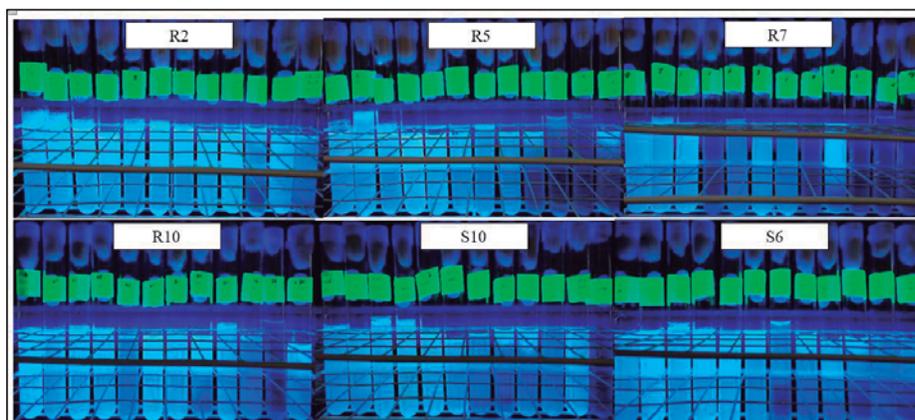


Figura 25: Evaluación de NMP/g suelo y raíz aisladas de los tratamientos inoculados (La Molina, 2016)

VII. CONCLUSIONES

1. El suelo muestreado de la zona de Casma presentó mayor población de *Pseudomonas* spp.
2. Los aislamientos de *Pseudomonas* spp. aislados de suelo muestran mayor efecto controlador sobre *Phytophthora cinnamomi* que los provenientes de raíces, evaluado en *in vitro*.
3. La cepa de *Pseudomonas* spp. S6 (T6) muestra mayor control de *P. cinnamomi* en invernadero.
4. La cepa de *Pseudomonas* spp. S10 (T5) muestra mayor desarrollo radicular en invernadero.
5. Se descartó que todas las *Pseudomonas* spp. inoculadas fueran patogénicas al hombre (*Pseudomonas aeruginosa*).

VIII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar formas de incrementar poblaciones de *Pseudomonas* spp. promisorias para ser aplicados en campo.
2. Se recomienda usar la combinación de las cepas S6 y S10, aisladas durante el experimento.
3. Evaluar persistencia de *Pseudomonas* spp. en el suelo a lo largo del tiempo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ait Barka, E., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J. y Audran, C. 2000. Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiol Lett 186, 91-95.
- Ait Barka, E., Gognies, S., Nowak, J., Audran, C. y Belarbi, A. 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biol Control 24, 135-142.
- Alvarado-Rosales, D., Saavedra-Romero, L., y Almaraz-Sánchez, A. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands. asociado al encino (*Quercus* spp.) en Tecoaapa, Guerrero, México. Agrociencia, 42, 565-572.
- American Public Health Association. Microbiological examination. In Standard methods for the examination of water and wastewater. 20^oed. Washington. APHA AWWA WEF, 1998, 9-31.
- Andres F., Arias M., Bello A., Borrueal L. Fisac R., Lacasa A. López M., Nombela G., Noveal C., Rey M., Tello C., Valedolivas A. y F. Varés. 1991. Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógeno, Ed. MAPA. Madrid. 485 p.
- Arteaga W. Perspectivas globales para el mango y la palta peruana. 2016. Revista Red Agrícola Perú 34. 60-61.
- Atlas R. y Bartha R. 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Pearson Education, S. A., Madrid. 677 p.
- Aveling T. y Rijkenberg F. 1986 Infection of susceptible avocado by *Phytophthora cinnamomi*. South African avocado growers association yearbook 9:55-56.
- Bangera M., Weller D. y Thomashow L. 1994. Genetic analysis of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthetic locus from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. 383-386.
- Barr S. 1992. Mycology 84, 1-11.

- Benhamou, N., Gagné, S., Le Queré, D., y Debhbi, L. 2000. Bacterial- mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 90:45-56.
- Bloemberg G. y Lugtenberg B. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria, *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 343-350.
- Broadbent P. y Baker KF. 1974. Comportamiento de *Phytophthora cinnamomi* en el suelo supresivo y favorable a la pudrición de raíz. *Diario Australiano de Investigación Agrícola* 25:121-137. Congreso Mundial del Aguacate, Viña del Mar Chile.
- Burges, A. 1960. Introducción a la microbiología de suelos. Editorial Acribia. Zaragoza España. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170:3164 – 3169.
- Cahill D. 1998. General biology and ecology of *Phytophthora* with special reference to *Phytophthora cinnamomi*. In: Gadek, P. A. 1998 (ed.) Patch deaths in tropical Queensland rainforest: association and impact of *Phytophthora cinnamomi* and other soil borne pathogens. Coop. Research Centre for Tropical Rainforest Ecology and Management, Technical report, 98 pp. Cairns Australia.
- Calabrese F. 1992. El Aguacate. 249p. Mundiprensa. Madrid, España
- Casale W., Minassian J., Menge C., Lovatt, E., Pond E., Jhonson y F. Guillement. 1995. Urban and agricultural wastes for use as mulches on avocado and citrus and for delivery of microbial biocontrol agents. *Journal of Horticultural Science* 70(2):315–332.
- Chernin, L. and Chet, I. 2002. Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests, pp. 171-225. In: *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications.* (R. Burns, and R. Dick, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York.
- Cook, R., Thomashow D., Weller D., Fujimoto M., Mazzola G., Banger y D. Kim. 1995. Molecular mechanisms of defense by rizobacterias against root disease. *Procedures of the National Academy of Sciences U.S.A.* 92: 4197-4201.
- Darvas, J. y Backer O. 1984. Failure to control *Phytophthora cinnamomi* and *Pythium splendens* with metelaxyl after its prolonged use. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 7, 177-178.
- De-Bashan, E., Holguin, G., Glick, R. y Bashan. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macro fauna, control biológico, planta-*

- microorganismo. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. Chapter 8. Published by: Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. pp. 170-224.
- De la Fuente L., Bajsan N., Quagliotto L., Fabiano E., Pérez C., Altier N. y Arias A. 2000. Interactions among rhizobia and biocontrol agents in forage legumes. In: Pedrosa F. *et al.* (eds), Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity- Kluwer Academic Press. 552 p.
- Diby P., Saju K. A., Jisha P., Sarma Y., Kumar A. y Anandaraj M. 2005. Mycolitic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici*, the foot pathogen of black pepper (*Piper nigrum* L.). Division of Crop Protection, Indian Institute of Spices Research, Marikkunnu P.O., Calicut, Kerala-673 012, India. *Annals of Microbiology*, 55 (2) 129-133.
- Drenth A. y Sendall B. 2001. CRC for Tropical Plant Protection Indooroopilly Research Centre Plant Pathology Building 80 Meiers Road Indooroopilly QLD 4068. Australia.
- Du Plessis S. 1991. Factor important for optimal scheduling of avocado orchards. *South African Avocado Grower's Association Yearbook* 14: 91-93.
- Durand, B. y S. Du Plessis. 1990. Irrigation of avocado orchards *Farming in South Africa*. 2p.
- Durbin R. 1959. Factor affecting the vertical distribution of *Rhizoctonia solani* with special reference to CO₂ concentration. *Am.J.Bot* 46(1):22-25.
- Ekelund F. y R. Ronn. 1994. Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 321-353.
- Erwin D., y O. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota. P: 84, 178, 263, 265-266
- Ezra D., Hess M. y Strobel A. 2004. New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile antibiotic-producing fungus. *Microbiology* 150: 4023-4031.
- Faggioli S., Cazorla C., Vigna A. y Berti F. 2007. Fertilizantes Biológicos en maíz. Ensayo de inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*. Jornada de Actualización técnica de maíz N° 5. EEA INTA.
- Fernández J. 2015. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de café (*Coffea arabica* L. var. 'Típica') en sus primeros estadios de su desarrollo. UNALM. Tesis para optar el título profesional de Biólogo.

- Fishal M., Meon S. y Yun M. 2010. Induction of tolerance to *Fusarium wilt* and defense-related mechanisms in the plantlets of susceptible Berangan Banana preinoculum with *Pseudomonas* spp. (UPMP3) and *Burkholderia* spp. (UPMB3). *Agricul . Sci. China* 9:1140-1149.
- Flores C., Fernández B., Aguirre C. y A. Ridao. 2007. Supresión de la podredumbre radical del Palto en un suelo de Jujuy, Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). VI Congreso Mundial Palta Aguacate Avocado, Viña del Mar, Chile. 12 al 16 de noviembre de 2007.
- Frankowski, L., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G. y H. Bahl. 2001. Purification and propiedades of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Archives of Microbiology*, 176(6) 421-6.
- Fridlender M., Inbar J. y I. Chet. 1993. Biological control of soil borne plant pathogens by a β -1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol Biochem* 25: 1211-1221.
- Gardiazabal F. y G. Rosenberg. 1991. Cultivo del palto. Quillota, Universidad Católica del Valparaíso, Facultad de Agronomía. 201 p.
- Gardiazabal F. 2007. Principales factores que determinan una alta producción y calibre en paltos. Disponible en <http://seminario.asoex.cl>. Leído el 21 de enero de 2007.
- Gil G. 1997. El Potencial Productivo. 342p. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- Glick R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol.* 41: 109–117.
- Gregoriou C. 1980. Some aspect of shoot and root growth of avocado under lowland tropical conditions. *California Avocado Society Yearbook* 64: 85-88.
- Gregory P. 1992. Crecimiento y funcionamiento de las raíces. 275p. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffé F. y W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43 895–914 10.1139/m97-131
- Herrera M. y M. Narrea. 2011. Manejo integrado de palto. Guía técnica curso-taller. Jornada de capacitación UNALM-Agrobanco. Moquegua-Perú. 6 pp.
- Hiltner L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* 98, 59-78.

- Ho, H. y S. Chang. 1992. A re-evaluation of *Phytophthora* species described by K. Sawada in Taiwan. *Mycotaxon*, 43: 297-316.
- Holt G., Krieg R., Sneath A., Staley T. y T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9 th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MS, USA.
- Howell R. y D. Stipanovic. 1978. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium *Phytopathol.* 69:480-482.
- Iavicoli A., Boutet E., Buchala A., y J. Métraux. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:851-858.
- Jeffers N., Martin J. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.*, 70: 1038-1043.
- Kapulnik, Y. 2002. Plant growth promoting by rhizosphere bacteria. Plant roots the hidden half. Ed Marcel Dekker. Nueva York. Estados Unidos de América. 869-887P.
- Lamari L. 2002. ASSESS: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification. APS Press, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Lemus F. 2009. Sensibilidad de cepas de *Phytophthora cinnamomi* Rands a fungicidas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Uruapan. Michoacán. Revisado junio 2014: <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/5427/1/SENSIBILIDADDECEPASDEPHYTOPHTHORACINNAMOMIRANDSAFUNCIDAS.pdf>
- Lynch J.1990. *The Rhizosphere*. Wiley. Chichester, England.
- Mac Faddin J. 1980. *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Marais J. y De La Harpe A. 1981. Some aspects of *Phytophthora cinnamomi* Rands infection of grapevines. Stellenbosch, RSA South African Avocado Growers' Association Yearbook. 4:109-115.
- Marais L., Menge J., Bender G. y B. Feber. 2002. *Phytophthora* root rot. Avoresearch a California avocado commission publication volumen 2 issue 1.
- Marques C., Pires C., Moreira H., Rangel S. y Castro L. 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol. Biochem.* 42 1229–1235 10.1016/j.soilbio.2010.04.014

- Martínez C. 2010. Diversidad y selección de *Pseudomonas* fluorescentes provenientes de la rizósfera y suelo como promotores de crecimiento y desarrollo de plantas de papa. UNALM. Lima, Perú. 32-49 pp.
- Mazzola M., Cook R., Thomashow L., Weller D. y L. Pierson. 1992. Contribution of Phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 58(8):2616-2624.
- Mejía V. y Ramos A. 2003. Evaluación de 7 tratamientos para el control de la Tristeza del aguacatero causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands: en Choro Mpio. De Salvador Escalante, Mich. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agrobiología. Presidente Juárez. UMSNH. Uruapan, Michoacán, México.
- McDonald D y M. Duniway. 1978. Influence of the matric and osmotic components of water potential on zoospore discharge in *Phytophthora*. *Phytopathology* 68, 751-757.
- Mcintosh, 1964. *Phytophthora* spp. in soils of the Okangan and Similkameen Valleys of British Columbia. *Canadian Journal of Botany*, 42: 1411-1415.
- MINAGRI. Anuario "Producción agrícola 2014". 161pp
- Mohammed E., Pérez C. 2004. Requena *et al.* Evaluación del biocontrol de *P. capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología* 26:61-68. España.
- Montelongo R. 2010. *Phytophthora cinnamomi* Rands causante de la tristeza del aguacatero, su importancia y control. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Uruapan, Michoacán, setiembre 2010, pp 10-17. Revisado junio 2014: <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/5267/1/PHYTOPHTHORACINNAMOMIRANDSCAUSANTEDELATRISTEZADELAGUACATEROSUIMPORTACIAYCONTROL.pdf>
- Mora A., D. Téliz, G. Gustavo y J. Etchevers. 1999. La Tristeza del Aguacate. En: *El Aguacate y su Manejo Integrado*. Ed. Mundi-Prensa. Pp 166-168.
- Mora A., Téliz D., Mora G. y Etchevers J. 2000. Enfermedades de la raíz "La tristeza del aguacate". *El aguacate y su manejo integrado*. Ed. Mundi Prensa. 158-168 pp.
- Mora A., Téliz D., Mora G. y Etchevers, J. 2007. Tristeza del aguacate (*Phytophthora cinnamomi*). En: Téliz, D. y Mora, A. *El aguacate y su manejo integrado*. Mundi prensa. Pp 192-201.

- Morales J. 2013. Evaluación de la producción y calidad de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cv Canon obtenido mediante biofertilización. Tesis para obtener el grado de maestro en Ciencia y Tecnología de alimentos. Programa de posgrado en Alimentos del centro de la república. Universidad Autónoma de Queretano. México.
- Nelson E. 1992. Biological control of plant diseases, progress and challenges for the future. Plenum Press, Nueva York, pág. 353-357.
- NMP PARA LA DETERMINACION DE COLIFORMES Y *ESCHERICHIA COLI* EN ALIMENTOS Fecha emisión: 23-08-2002 Fecha revisión: 20-01-2012 Sección Microbiología de Alimentos PRT-712.02-004 Página 1 de 8.
- Noval C. 1991. Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nemátodos fitopatógenos. Género de *Pseudomonas*. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Madrid. 242 y 388 pp.
- Nyoman A. y D. Ian. 2006. Mycoparasitic and Antagonistic Inhibition on *Phytophthora cinnamomi* Rands by Microbial Agents Isolated from Manure Composts. Plant Pathology Journal 5 (3): 291-298.
- Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny L. y P. Thonart. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ. Microbiol. 9: 1084-1090
- Orlikowski B. 1995. Studies on the Biological control of *Phytophthora cryptogea* Pethybr. Et Laff. II. Effectiveness of Trichoderma and *Gliocladium* spp. in the control of *Phytophthora* foot root of gerbera J. Phytopathol., 143: 341-343.
- Palleroni, J. 1984. Genus *Pseudomonas*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Krieg, N.R., and Holt, J.G. (eds). Baltimore, MD, USA: Williams y Wilkins, pp. 141-199.
- Palleroni, J. 2005. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, Vol. 2 The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria
- Patterson, J. y M. Sogin. 1992. Eukaryote origins and protistan diversity. The origin and evolution of prokaryotic and eukaryotic cells. Hartman H y Matsuno K.
- Pegg G., Coates M., Korsten L. y Harding M. 2007. Enfermedades foliares del fruto y en el suelo. En: El Palto, Botánica, producción y usos. Wiley, A. W. Schaffer, B, y Wolstenholme, B. M. Ediciones universitarias de Valparaíso. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso 275-309 pp.

- Pegg G., M. Coates, L. Korsten, y M. Harding. 2002. Foliar, fruit and soil borne diseases. In: Whaley, A. W., Schaffer, B. and Wolstenholme B. N. (eds.), Avocado: Botany, Production and Uses. CABI Publishing, pp. 299-338.
- Phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 58(8):2616-2624.
- Perez A., Rojas J., y J. Fuente. 2010. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Revista Acta Biológica Colombiana* 15:1-18.
- Raaijmakers J., Vlami M. y J. De Souza. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 537-547.
- Reis, M. 1991. Mancha en red de la cebada: Biología, epidemiología y control de *Drechslera teres*. Serie técnica N° 3. INIA, La Estanzuela. 20 p.
- Rodríguez E., Gamboa M., Hernández F. y J. García. 2005. *Bacteriología General. Principios y prácticas de Laboratorio.*
- Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology* 20: 225-241.
- Sakiyama C., Paula E., Pereira P., Borges A. y D. Silva. 2001. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letter in Applied Microbiology*. 33: 117-121.
- Salazar S. y J. Cortés. 1986. Root distribution of mature avocado trees growing in soils of different texture. *California Avocado Society Yearbook* 70: 165-174.
- Sanchez M., Sanchez J., Navarro C., Fernandez P. y Trapero A. 2003. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 87-108.
- Sandoval J. y Borys W. 1984. Distribución de raíces de aguacatero *Persea americana* Mill., en el área de influencia del volcán Parícutín. *Revista Chapingo* 9 (45/46): 61-69.
- Schaad W. 2001 *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* / edited by N.W. Schaad for the Bacteriology Committee of the American Phytopathological Society. 1988. 84-108 pp.
- Schoroth N. y G. Hancock. 1982. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science* 216, 1376-1381.
- Silva H. y J. Rodríguez. 1995. *Fertilización de plantas frutales.* 519p. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

- Stone K., Bacon W. y White R. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined [J]. In: Bacon CW, White Jr JF, editors. *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker; p.3-29.
- Tapia P. 1993. Aproximación al ciclo fenológico del palto (*Persea americana* Mill, cv Hass) para la zona de Quillota, Quinta Región. 141p. Taller de titulación Ing. Agr. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía, Quillota, Chile
- Thomashow S. y M. Weller. 2000. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. En: *Plant-Microbe Interactions*, Volume I. G. Stacey and N. Keen (Eds.). Chapman and Hall, Nueva York, 187-235.
- Toyoda H., Hashimoto R., Utsumi H., Kobayashi S. y Ouchi. 1988. Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid-resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its applications to biological control of Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 78. pp 1307-1311.
- Tumbull V., J. Ogle, M. Stirling y J. Dart, 1992. Preliminary investigations into the influence of *Pseudomonas cepacia* on infection and survival of proteas in *Phytophthora cinnamomi* infected potting mix. *Sci. Hortic.*, 52:257-263.
- Turnbull V., J. Ogle, M. Stirling y J. Dart. 1992. Preliminary investigations into the influence of *Pseudomonas cepacia* on infection and survival of proteas in *Phytophthora cinnamomi* infected potting mix. *Sci. Horti8c.*, 52:257-263.
- UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Pseudomonas* species and other NonGlucose Fermenters. UK Standards for Microbiology Investigations | Issued by the Standards Unit, Public Health England. Bacteriology – Identification. ID 17. Issue no: 3. Issue date: 13.04.15. 2-41 pp.
- Van Overbeek S., Van Veen A., y D. Van Elsas. 1997. Induced reporter gene activity, enhanced stress resistance, and competitive ability of a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* strain released into a fieldplot planted with wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1965–1973.
- Van Weels M., Pietersen J., Trijssenaar A., Van't Westende A., Hartog, F y C. Van Loon. 1992. Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 716-724.
- Vidhyasekaran P. 2004. Concise encyclopedia of plant pathology. Food Products Press & Haworth Reference Press of Haworth Press, 246-252.

- Villa M., Frías A. y Gonzales G. 2005. Evaluación de cepas de *Pseudomonas* spp. para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).
- Villablanca I. 1994. Estudio comparativo de la distribución y densidad de raíces absorbentes en paltos (*Persea americana* Mill.) cv. Hass en función de los patrones de distribución uso consumo del agua en el suelo evaluados bajo dos sistemas de riego presurizado (goteo y micro aspersión). 117p. Taller de Titulación, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Quillota, Chile.
- Voisard C., Keel C., Hass D., y G. Defago. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* 8:351-358.
- Wager A. 1942. *Phytophthora cinnamomi* and wet soil in relation to the dyingback of avocado trees. *Hilgardia* 14:517-532.
- Walsh, F., Morrissey, P. y F. O’Gara. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 289-95.
- Waterhouse M. y M. Waterston. 1966. *Phytophthora cinnamomi*. En C.M.I. description of pathogenic fungi and bacteria No. 113 CAB INTERNATIONAL 1998.
- Weller D. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soil borne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology* 97:250-256.
- Weller D., Landa B., Mavrodi O., Schroeder K., De La Fuente L., Bankhead S., Molar R., Bonsall R., Mavrodi D. y L. Thomashow. 2007. Role of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in plant defense. *Plant Biology* 9(1): 4-20.
- Weste, G.; Vithanage, K. 1979. Survival of chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi* in several non-sterile, host-free forest soils and gravels at different soil water potentials. *Australian Journal of Botany* 27, 1-9.
- Whiley A., J. Chapman y J. Saranah. 1988. Water lose by floral structures of avocado (*Persea Americana* Mill.) cv. Fuerte during flowering. *Australia Journal of Agricultural Research*. 39:457-467.
- Whiley W., Wolstenholme N., Saranah B. y Anderson A. 1987. Effect of root temperatures on growth of two avocado rootstock cultivars. Australia, Maroochy Horticultural Research Station. (Report nº 5).

- Wiegand H. 1999. Efectos de la utilización de mulch de acícula de pino, corteza de pino, paja con guano de caballo y guano de pavo sobre la productividad del palto *Persea americana* Mill cv Hass. 115p. Taller de Titulación Ing. Agr. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. Quillota, Chile.
- Wolstenholme N. 1987. Theoretical and applied aspect of avocado yield as affected by energy budgets and carbon partitioning. California Avocado Grower's Association Yearbook 10: 58-61.
- Yang C., E. Crowley y A. Menge, 2001. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. FEMS Microbiol. Ecol., 35:129-136
- Zentmyer A. y A. Thorn. 1967. Hosts of *Phytophthora cinnamomi*. California avocado society yearbook 51:177-178.
- Zentmyer A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and diseases it causes. Phytopathological Monograph. Phytopathology. Soc. 96 pp.
- Zentmyer A. 1985. Origen and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. Calif. Avocado Soc. Yrbk. 69: 89-94
- Zentmyer A., Menge J. y H. Ohr. 1994. *Phytophthora* root rot. Compendium of tropical fruit diseases. St. Paul, Minnesota. The American Phytopathological Society. Pp. 77-79.
- Zentmyer A y M. Mircetich. 1966. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 56, 710-712.
- Zentmyer A. y J. Richards. 1952. Pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* to avocado trees, and the effect of irrigation on disease development. Phytopathology 42: 35-37.

X. ANEXOS

Anexo 1: Datos de avance de *P. cinnamomi* en centímetros frente a *Pseudomonas* spp. en prueba *in vitro*.

Tratamientos	4dds	5dds	7dds
R1	5.55	5.55	5.55
R2	5.3	5.3	5.3
R4	5.5	6.6	8
R5	5.3	6.5	8
R7	5.1	6.3	7.5
R10	5.25	6.35	7.7
S1	5.55	5.55	5.55
S2	5	5	5
S3	5.95	5.95	5.95
S4	5.5	5.5	5.5
S6	5.8	5.8	5.8
S7	4.4	4.4	4.4
S9	5.15	5.15	5.15
S10	4.65	4.65	4.65
Testigo	6.55	7.55	8.3

Anexo 2: Datos de porcentaje de severidad de *P. cinnamomi* frente a *Pseudomonas* spp. en prueba *in vitro*.

Tratamiento	4dds	5dds	7dds
R1	66.9	66.9	66.9
R2	63.9	63.9	63.9
R4	66.3	79.5	96.4
R5	63.9	78.3	96.4
R7	61.4	75.9	90.4
R10	63.3	76.5	92.8
S1	66.9	66.9	66.9
S2	60.2	60.2	60.2
S3	71.7	71.7	71.7
S4	66.3	66.3	66.3
S6	69.9	69.9	69.9
S7	53.0	53.0	53.0
S9	62.0	62.0	62.0
S10	56.0	56.0	56.0
Testigo	78.9	91.0	100.0

Anexo 3: Cuadro de datos de las variables evaluadas en palto en invernadero luego de la inoculación de *P. cinnamomi* y cepas de *Pseudomonas* spp. (La Molina, 2016).

Tratamiento	Severidad (%)	Longitud de raíces	Incremento de altura (cm)	Peso fresco raíces (g)	Materia seca raíces (%)	Peso fresco foliar (g)	Materia seca foliar (%)
1	49.78	892.58	11.5	39.1	27.9	86.6	34.2
1	32.00	735.27	8	29.7	26.5	49.8	25.1
1	92.80	978.38	8.5	36.4	22	92.1	32.7
1	63.55	1162.71	8.5	35.3	22.9	98.5	35.1
1	64.18	1176.71	10	26.1	21.7	47.3	34.3
2	82.35	155.99	5	12.7	29.9	60.6	37.5
2	99.92	121.43	2	17	24.3	54.6	32.2
2	99.30	158.20	2.5	12.9	24.7	63.8	47.4
2	80.45	172.63	5.5	21.4	28.9	58.2	29.1
2	91.58	194.89	5	22.7	21.1	96.3	35.3
3	65.54	523.45	6	31	30	98.6	38.3
3	39.93	596.28	6	33.4	26.4	101.6	31.5
3	91.55	576.107	10	29.7	17.5	112.8	40.3
3	76.57	868.78	8	24.1	33.2	106.4	37.5
3	57.78	796.37	8	39.3	32.7	132.5	34.1
4	54.33	475.06	3	27.7	25.3	62.8	35.8

Tratamiento	Severidad (%)	Longitud de raíces	Incremento de altura (cm)	Peso fresco raíces (g)	Materia seca raíces (%)	Peso fresco foliar (g)	Materia seca foliar (%)
4	82.78	526.18	3.5	29.1	30.8	54.9	29.5
4	83.22	697.14	4	32	28.7	55.5	27.7
4	54.60	700.35	7.5	33.8	25	70.8	29.4
4	70.24	803.79	7.5	34.9	27.7	101.2	37.3
5	71.87	838.19	2.5	59	25.1	85.4	38.3
5	83.45	716.60	2	31.9	27.6	61.6	18.7
5	82.78	822.78	2.5	30.8	33.9	71	37.1
5	61.23	867.32	4.5	58.5	29.8	82.4	35.4
5	92.95	960.52	4	48.2	31.7	108	36.1
6	31.85	981.10	14	50.3	22.5	115.5	33.3
6	16.32	822.87	11	49.8	20.9	81.3	29
6	65.28	1276.63	10.5	43.6	23.5	75.1	34.5
6	47.43	1382.34	10.5	43.7	23.3	77.6	29.5
6	63.36	1248.24	11	38.7	20.7	109.3	39.4
7	89.84	321.64	2	25.2	15.8	63.7	37.9
7	71.53	588.34	3.5	31.4	19.6	40.9	31.1
7	78.70	333.26	2	35.4	19.5	35	22
7	86.18	958.29	1.5	27.1	18.9	41	33.8
7	61.08	1038.93	1.5	35.3	19.6	62.8	33.2

Tratamiento	Severidad (%)	Longitud de raíces	Incremento de altura (cm)	Peso fresco raíces (g)	Materia seca raíces (%)	Peso fresco foliar (g)	Materia seca foliar (%)
8	6.89	3444.47	3.5	147.5	17.7	164	33.4
8	6.46	3098.27	4.5	160.6	23.6	173.1	36.9
8	7.39	3922.97	5	131.1	23.9	166.1	39.1
8	6.03	4522.52	6	167.8	18.4	161.7	35.7
8	6.12	4634.79	3.5	136.2	18.2	108.5	34.9

Anexo 4: Procedimiento ANOVA para la severidad en plántones de palto

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	7	23850.75038	3407.25005	14.47
Error	32	7534.63232	235.45726	
Total corregido	39	31385.38270		

Fuente	Pr > F
Modelo	<.0001
Error	
Total corregido	

Variable dependiente: Y

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.759932	24.85773	15.34462	61.72975

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor
Tra	7	23850.75038	3407.25005	14.47

Anexo 5: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para la severidad en plántones de palto

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	32
Error de cuadrado medio	235.4573
Valor crítico del rango estudentizado	4.58106
Diferencia significativa mínima	31.437

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tra
A	90.720	5	2
A	78.456	5	5
A	77.466	5	7
B A	69.034	5	4
B A	66.274	5	3
B A	60.462	5	1
B	44.848	5	6
C	6.578	5	8

Anexo 6: Procedimiento ANOVA para la longitud de raíces de plantones de palto

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	7	47671638.36	6810234.05	78.21
Error	32	2786325.81	87072.68	
Total corregido	39	50457964.18		

Fuente	Pr > F
Modelo	<.0001
Error	
Total corregido	

Variable dependiente: Y

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.944779	26.17566	295.0808	1127.310

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor
Tra	7	47671638.36	6810234.05	78.21

Anexo 7: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para la longitud de raíces de plantones de palto

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	32
Error de cuadrado medio	87072.68
Valor crítico del rango estudentizado	4.58106
Diferencia significativa mínima	604.54

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tra
A	3924.6	5	8
B	1142.2	5	6
B	989.1	5	1
B	841.1	5	5
C B	672.2	5	3
C B	648.1	5	7
C B	640.5	5	4
C	160.6	5	2

Anexo 8: Procedimiento ANOVA para incremento de altura en plántones de palto

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	7	365.9437500	52.2776786	23.80
Error	32	70.3000000	2.1968750	
Total corregido	39	436.2437500		

Fuente	Pr > F
Modelo	<.0001
Error	
Total corregido	

Variable dependiente: Y

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.838852	25.17513	1.482186	5.887500

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor
Tra	7	365.9437500	52.2776786	23.80

Anexo 9: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para incremento de altura en plántones de palto

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	32
Error de cuadrado medio	2.196875
Valor crítico del rango estudentizado	4.58106
Diferencia significativa mínima	3.0366

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tra
A	11.4000	5	6
B A	9.3000	5	1
B C	7.6000	5	3
D C	5.1000	5	4
D	4.5000	5	8
D	4.0000	5	2
D	3.1000	5	5
D	2.1000	5	7

Anexo 10: Procedimiento ANOVA para para peso fresco radicular en plántones de palto

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	7	60673.26000	8667.60857	122.03
Error	32	2272.91600	71.02862	
Total corregido	39	62946.17600		

Fuente	Pr > F
Modelo	<.0001
Error	
Total corregido	

Variable dependiente: Y

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.963891	17.55436	8.427848	48.01000

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor
Tra	7	60673.26000	8667.60857	122.03

Anexo 11: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para peso fresco radicular en plántones de palto

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	32
Error de cuadrado medio	71.02862
Valor crítico del rango estudentizado	4.58106
Diferencia significativa mínima	17.266

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tra
A	148.640	5	8
B	45.680	5	5
B	45.220	5	6
C B	33.320	5	1
C B	31.500	5	3
C B	31.500	5	4
C B	30.880	5	7
C	17.340	5	2

Anexo 12: Procedimiento ANOVA para % materia seca radicular en plántones de palto

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	7	526.4950000	75.2135714	6.39
Error	32	376.5560000	11.7673750	
Total corregido	39	903.0510000		

Fuente	Pr > F
Modelo	<.0001
Error	
Total corregido	

Variable dependiente: Y

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.583018	13.98150	3.430361	24.53500

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor
Tra	7	526.4950000	75.2135714	6.39

Anexo 13: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para % materia seca radicular en plántones de palto

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	32
Error de cuadrado medio	11.76737
Valor crítico del rango estudentizado	4.58106
Diferencia significativa mínima	7.0278

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tra
A	29.620	5	5
B A	27.960	5	3
B A	27.500	5	4
B A C	25.780	5	2
B D A C	24.200	5	1
B D C	22.180	5	6
D C	20.360	5	8
D	18.680	5	7

Anexo 14: Procedimiento ANOVA para peso fresco foliar en plántones de palto

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	7	37641.12175	5377.30311	14.51
Error	32	11861.46800	370.67088	
Total corregido	39	49502.58975		

Fuente	Pr > F
Modelo	<.0001
Error	
Total corregido	

Variable dependiente: Y

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.760387	22.07322	19.25281	87.22250

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor
Tra	7	37641.12175	5377.30311	14.51

Anexo 15: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para peso fresco foliar en plántones de palto

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	32
Error de cuadrado medio	370.6709
Valor crítico del rango estudentizado	4.58106
Diferencia significativa mínima	39.443

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tra
A	154.68	5	8
B	110.38	5	3
C B	91.76	5	6
C B D	81.68	5	5
C B D	74.86	5	1
C D	69.04	5	4
C D	66.70	5	2
D	48.68	5	7

Anexo 16: Procedimiento ANOVA para %Materia Seca Foliar

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	7	145.184000	20.740571	0.75
Error	32	879.192000	27.474750	
Total corregido	39	1024.376000		

Fuente	Pr > F
Modelo	0.6283
Error	

Variable dependiente: Y

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.141729	15.48947	5.241636	33.84000

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor
Tra	7	145.1840000	20.7405714	0.75

Fuente	Pr > F

Anexo 17: Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para %Materia Seca Foliar

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	32
Error de cuadrado medio	27.47475
Valor crítico del rango estudentizado	4.58106
Diferencia significativa mínima	10.739

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tra
A	36.340	5	3
A	36.300	5	2
A	36.000	5	8
A	33.140	5	6
A	33.120	5	5
A	32.280	5	1
A	31.940	5	4
A	31.600	5	7

Anexo 18: Conteo de *Pseudomonas* spp. (NMP/g) aisladas de suelos de costa.

Zona		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	NMP/g
Lima	Suelo	3	3	3	3	0	0	2.3x10 ⁶ organismos /g de suelo
	Raíz	3	3	3	3	0	0	2.3x10 ⁶ organismos/g de raíz
Huaral	Suelo	3	3	3	2	0	0	9.3x10 ⁵ organismos /g de suelo
	Raíz	3	3	3	1	0	0	4.3x10 ⁵ organismos/g de raíz
Casma	Suelo	3	3	3	3	3	3	>1.1x10 ⁸ organismos /g de suelo
	Raíz	3	3	3	3	3	3	>1.1x10 ⁸ organismos/g de raíz

Anexo 19: Conteo de *Pseudomonas* spp. aisladas de plántulas de palto de invernadero (La Molina, 2016)

Tratamiento	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	NMP/g
R2	3	3	3	3	1.1x10 ⁷ organismos/g de raíz
R5	3	3	3	2	1.1x10 ⁷ organismos/g de suelo
R7	3	2	2	0	2.1x10 ⁵ organismos/g de suelo
R10	3	3	3	2	1.1x10 ⁷ organismos/g de raíz
S10	3	3	3	2	1.1x10 ⁷ organismos/g de suelo
S6	3	3	3	3	1.1x10 ⁷ organismos/g de suelo

Anexo 20: Para serie de 3 tubos con 0.1, 0.001 y 0.001 g. NMP por gramo con un 95% de confianza.

Tubos Positivos			NMP/g	Lim. Conf.		Tubos Positivos			NMP/g	Lim. Conf.	
0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto	0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

Anexo 21: Medios de cultivo

- Agua peptonada

Ingredientes	Gramos/Litro
Digerido péptico de tejido animal	10
Cloruro sódico	5
Final pH a 25°C	7.2+-0.2

Suspender 15 gramos en 1000 ml de agua destilada. Esterilizar a 15 libras de presión y 121°C por 15 minutos.

- Pseudomonas Agar F (King B)

Ingredientes	Gramos/Litro
Acido caseína	10
Peptona	16
Sulfato potásico	10
Cloruro de magnesio	1.4
Agar	11
Final pH at 25°C	7.1+-0.2

Suspender 48.9 gramos y 10 gramos de Glicerol en 1000 ml de agua destilada. Esterilizar a 15 libras de presión y 121°C por 15 minutos.

- Triptona Soya Agar (TSA)

Ingredientes	Gramos/Litro
Digerido pancreático de caseina	15
Digerido papaínico de soja	5
Cloruro sódico	5
Agar	15
Final pH at 25°C	7.3+-0.2

Suspender 40 gramos en 1000 ml de agua destilada. Esterilizar a 15 libras de presión y 121°C por 15 minutos.