

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**Capacidad antagónica de *Glomus intraradices* en oomicetos  
radiculares de *Persea americana* Mill (Palto), Ayacucho**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR:**

**Joel Arone Díaz**

**Ayacucho – Perú**

**2020**

*A Dios por darme vida y guiar siempre mi camino.*

*A mis queridos padres Olimpia Díaz Retamozo y Leoncio Arone Gómez (†).*

*A mis hermanos Reneé, Robert Nelson, Maribel, Otilia y Sonia.*

*A mis sobrinos Carol, Renzo, Valeria, Daniela, Andrea, Valentina y Leonardo.*

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *alma máter* de mi formación profesional; Facultad de Ciencias Agrarias y a la gloriosa Escuela Profesional de Agronomía, por sus enseñanzas a través de sus docentes.

En especial a la Ph. D. Nery Luz Santillana Villanueva, por su asesoramiento, orientación, apoyo, tiempo y su amistad.

En especial al M. Sc. Fernando Nicolás Barrantes Del Águila, por su apoyo generoso, sus enseñanzas, su paciencia y su amistad.

A la M. Sc. Angela Juana Requis Quintanilla por sus sugerencias en la ejecución de este trabajo de investigación.

Al Ing. Mario Darwin Orihuela Ascarza, por haberme brindado su colaboración oportuna.

A mis amigos y demás personas que me brindaron su cooperación e intervinieron en la realización de mi trabajo de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de tablas .....	vii
Índice de figuras.....	viii
Índice de anexos.....	x
Resumen.....	11
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
1.1. El palto .....	14
1.1.1. Taxonomía .....	14
1.1.2. Botánica .....	14
1.1.3. Razas .....	14
1.1.4. Ciclo de vida .....	15
1.1.5. Ecología del palto.....	15
1.1.6. Enfermedad de la tristeza del palto .....	16
1.2. Patógenos de la tristeza del palto .....	17
1.2.1. Clasificación taxonómica.....	17
1.2.2. Características morfológicas .....	17
1.2.3. Síntomas generados.....	19
1.2.4. Procesos asociados a los síntomas .....	20
1.3. Hongos micorrízicos arbusculares .....	21
1.3.1. <i>Glomus intraradices</i> .....	21
1.4. Control biológico .....	24
1.4.1. Fundamentos de control biológico sobre fitopatógenos .....	26
1.5. Actividad antagónica de hongos micorrízicos arbusculares en fitopatógenos....	27
1.6. Otros microorganismos antagónicos para oomicetos radiculares .....	30

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA ..... 34**

2.1.	Ubicación del ensayo .....	34
2.2.	Material biológico .....	34
2.3.	Aislamiento e identificación de oomicetos patógenos .....	34
2.3.1.	Fase de campo .....	34
2.3.2.	Fase de laboratorio .....	35
2.4.	Capacidad antagónica <i>in vitro</i> de <i>Glomus intraradices</i> en oomicetos aislados ..	38
2.4.1.	Obtención de biomasa de <i>Glomus intraradices</i> .....	38
2.4.2.	Aislamiento de esporas de <i>Glomus intraradices</i> .....	39
2.4.3.	Conteo y selección de esporas .....	39
2.4.4.	Extracción de metabolitos inhibitorios solubles de esporas de <i>Glomus intraradices</i> .....	40
2.4.5.	Medios de cultivos modificados .....	40
2.4.6.	Efecto de los metabolitos inhibitorios solubles en oomicetos .....	41
2.4.7.	Evaluación de la capacidad antagónica <i>in vitro</i> .....	42
2.4.8.	Análisis estadístico de datos .....	42
2.5.	Actividad antagónica en maceta de <i>Glomus intraradices</i> en oomicetos aislados	43
2.5.1.	Condiciones del invernadero .....	43
2.5.2.	Obtención de plántulas de palto .....	43
2.5.3.	Tratamientos .....	44
2.5.4.	Inoculación de plántulas de palto con <i>Glomus intraradices</i> .....	44
2.5.5.	Inoculación de plántulas de palto con aislamientos seleccionados .....	46
2.5.6.	Evaluación de parámetros .....	47
2.5.7.	Diseño experimental y análisis de datos .....	48

## **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 49**

3.1.	Aislamiento e identificación de oomicetos patógenos .....	49
3.1.1.	Muestreo de parcelas con palto .....	49
3.1.2.	Aislamiento .....	49
3.1.3.	Identificación de aislamientos .....	50
3.1.4.	Prueba de patogenicidad .....	52

3.2.	Capacidad antagónica <i>in vitro</i> de <i>Glomus intraradices</i> en tres aislamientos de oomicetos ( <i>Phytophthora</i> y <i>Phytopythium</i> ) .....	54
3.2.1.	Tendencia de crecimiento de tres oomicetos aislados, en medio de cultivo inhibitorio AHM con metabolitos de <i>Glomus intraradices</i> .....	54
3.2.2.	Media de crecimiento radial logrado .....	57
3.2.3.	Porcentaje de inhibición .....	58
3.3.	Actividad antagónica de <i>Glomus intraradices</i> en oomicetos ( <i>Phytophthora</i> y <i>Phytopythium</i> ) en macetas .....	62
3.3.1.	Colonización de raíces por <i>Glomus intraradices</i> .....	62
3.3.2.	Sintomatología foliar y radicular desarrolladas por oomicetos en plántulas de palto variedad Topa Topa .....	63
3.3.3.	Materia seca radicular .....	68
3.3.4.	Materia seca de la parte aérea .....	69
3.4.	Relaciones patológicas entre la prueba <i>in vitro</i> y en macetas .....	70
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>
	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>74</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>86</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 2.1. Lugares muestreados.....	35
Tabla 2.2. Tratamientos establecidos en la prueba <i>in vitro</i> .....	41
Tabla 2.3. Temperatura máxima, mínima y media mensual en el invernadero de Rhizobiología.....	43
Tabla 2.4. Análisis físico - química del sustrato.....	44
Tabla 2.5. Tratamientos evaluados en la prueba en macetas.....	44
Tabla 3.1 Ecuaciones de regresión simple entre el crecimiento radial (Y) y el tiempo de crecimiento (X).....	56
Tabla 3.2. Crecimiento radial logrado a los ocho días de evaluación <i>in vitro</i> por los tres oomicetos en medio no inhibitorio AHM y medio inhibitorio AHM-MIS.....	57
Tabla 3.3. Reducción porcentual de infección radicular por presencia de <i>Glomus intraradices</i> en plántulas inoculadas con tres oomicetos patógenos.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 2.1. Árboles de palto con síntomas de tristeza.....	35
Figura 2.2. Ubicación de disco con inóculo de oomiceto patógeno en placa con medio.....	42
Figura 2.3. Inoculación de plántulas de palto con <i>Glomus intraradices</i> .....	45
Figura 2.4. Inoculación de plántulas de palto con micelio de oomicetos seleccionados.....	47
Figura 3.1. Características macroscópicas (A) y microscópicas (B) de <i>Phytophthora</i> sp. A01. Esporangios (Es), Hifas (H), Clamidospora (Cl).....	51
Figura 3.2. Características macroscópicas (A) y microscópicas (B) de <i>Phytophthora</i> sp. A02. Clamidospora (Cl), Hifa (H), Hinchamiento hifal (Hi), Esporangio (Es).....	51
Figura 3.3. Características macroscópicas (A) y microscópicas (B) de <i>Phytophythium</i> sp. Esporangio (Es), Clamidospora (Cl), Hifa (H)...	52
Figura 3.4. Síntomas de marchitez causados por tres aislamientos de oomicetos patógenos a los siete días de la inoculación. Testigo (T), <i>Phytophthora</i> sp. A01 (A), <i>Phytopythium</i> sp. (B) y <i>Phytophthora</i> sp. A02 (C).....	53
Figura 3.5. Tendencia de crecimiento radial de las colonias de oomicetos en medios no inhibitorio AHM y medio inhibitorio AHM-MIS.....	55
Figura 3.6. Prueba de Duncan (0.05) para el crecimiento radial logrado por los oomicetos en medio AHM y medio AHM-MIS.....	58
Figura 3.7. Prueba de Duncan para el porcentaje de inhibición ejercida por los metabolitos inhibitorios solubles de <i>Glomus intraradices</i> en oomicetos patógenos ( <i>Phytopythium</i> sp., <i>Phytophthora</i> sp. A01 y A02).....	59
Figura 3.8. Evidencia gráfica de la acción inhibitoria de los metabolitos de <i>Glomus intraradices</i> en el crecimiento radial de tres aislamientos de oomicetos.....	61
Figura 3.9. Estructuras formadas de <i>Glomus intraradices</i> en raíces y rizósfera de palto luego de la colonización. Hifas (A), arbusculo (B) y espora (C).....	62

Figura 3.10.	Síntomas de marchitez foliar generados por oomicetos en plántulas de palto. T1: <i>G. intraradices</i> + <i>Phytophthora</i> sp. A01, T4: Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A01 (a); T2: <i>G. intraradices</i> + <i>Phytopythium</i> sp., T5: Testigo <i>Phytopythium</i> sp. (b); T3: <i>G. intraradices</i> + <i>Phytophthora</i> sp. A02, T6: Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A02 (c).....	63
Figura 3.11.	Síntomas de necrosis en raíces de palto inoculados con tres oomicetos. <i>G. intraradices</i> + <i>Phytophthora</i> sp. A01 (T1), <i>G. intraradices</i> + <i>Phytopythium</i> sp (T2), <i>G. intraradices</i> + <i>Phytophthora</i> sp. A02 (T3), Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A01 (T4), Testigo <i>Phytopythium</i> sp. (T5), Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A02 (T6)	65
Figura 3.12.	Prueba de Duncan para el porcentaje de raíz enferma de plántulas de palto inoculados con tres oomicetos patógenos.....	66
Figura 3.13.	Prueba de Duncan para la materia seca radicular de plántulas de palto inoculados con tres oomicetos patógenos.....	68
Figura 3.14.	Prueba de Duncan para la materia seca aérea de plántulas de palto inoculados con tres oomicetos patógenos.....	69
Figura 3.15.	Esquema de las relaciones patológicas entre las pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> y en macetas.....	72

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1. Caldo mínimo en sales utilizado en la extracción de metabolitos inhibitorios solubles de <i>Glomus intraradices</i> .....	87
Anexo 2. Jugo V8 clarificado utilizado en la preparación del medio selectivo para el aislamiento de oomicetos.....	88
Anexo 3. Análisis de varianza del crecimiento radial logrado por tres oomicetos patógenos en medio AHM y medio AHM-MIS.....	89
Anexo 4. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición ejercido por los metabolitos de <i>Glomus intraradices</i> en tres oomicetos patógenos radiculares del palto.....	89
Anexo 5. Análisis de varianza del porcentaje de raíz en enferma de plántulas de palto inoculados con tres oomicetos patógenos.....	89
Anexo 6. Análisis de varianza del contenido de materia seca radicular de plántulas de palto inoculados con tres oomicetos patógenos.....	89
Anexo 7. Análisis de varianza del contenido de materia seca de la biomasa aérea de plántulas de palto inoculados con tres oomicetos patógenos	89
Anexo 8. Registro de datos obtenidos de las variables evaluadas en la prueba de antagonismo en maceta (Severidad patogénica radicular, Materia seca radicular, Materia seca aérea).....	90
Anexo 9. Registro de evaluación de crecimiento radial de los tres oomicetos (cm).....	91
Anexo 10. Aislamiento de esporas de <i>Glomus intraradices</i> para la extracción de sus metabolitos.....	93
Anexo 11. Proceso de extracción de los metabolitos de <i>Glomus intraradices</i>	94

## RESUMEN

El antagonismo de *Glomus intraradices* en tres oomicetos radiculares patógenos del palto se evidenció en estudios *in vitro* y en cultivo de plántulas en macetas. De los 27 aislamientos de oomicetos obtenidos de raicillas con necrosis, se seleccionaron dos tipos de *Phytophthora* sp. y uno de *Phytophthium* sp. Para la prueba *in vitro* se utilizó metabolitos inhibitorios solubles extraídos de *Glomus intraradices*. La evaluación del crecimiento radial de las colonias se registró durante ocho días, utilizándose medios inhibitorios y no inhibitorios. El estudio antagónico en macetas se inició inoculando *Glomus intraradices* en plántulas de palto de 30 días de edad para micorrización de las raicillas. Los aislamientos de oomicetos se propagaron en semillas de trigo precocidos. Para comprobar la simbiosis entre *Glomus intraradices* y raíces de palto se realizó la prueba de tinción a 150 días de la inoculación. Comprobada la colonización de las raicillas, se inoculó las plántulas de palto con los oomicetos en soporte de trigo. La evaluación de severidad de infección radicular, incidencia de raíces enfermas, materia seca radicular y aérea se realizó a 84 días de la inoculación. Se determinó que los metabolitos de *Glomus intraradices* ejercen inhibición significativa de crecimiento micelial de 22.9% en *Phytophthora* sp. A01, 19.7% en *Phytophthora* sp. A02 y 15.4% en *Phytophthium* sp. En macetas, *Glomus intraradices* logró reducir 9.06% la severidad de daño en raicillas con *Phytophthora* sp. A01; 24.21% en *Phytophthora* sp. A02 y 1.01% en *Phytophthium* sp. *Glomus intraradices* evitó significativamente la reducción de la materia seca radicular y aérea de las plántulas en presencia de los oomicetos patógenos.

**Palabras claves:** *Glomus intraradices*, oomicetos, palto.

## INTRODUCCIÓN

El palto (*Persea americana* Mill) es el frutal que ha adquirido importancia relevante en los valles interandinos de la región Ayacucho por su alta rentabilidad, alta demanda y fácil comercialización. La ventaja regional para el cultivo es la calidad de los suelos para esta especie y el clima templado de los valles interandinos. Los frutos se han constituido en un producto notable para la agro exportación, superando al espárrago, plátano, mango, café y mandarina (MINAGRI, 2019). Sin embargo, aun cuando las posibilidades de producción son altamente favorables, los problemas fitosanitarios constituyen la principal limitante del cultivo.

En muchos lugares donde se cultivan el palto, el mayor problema fitosanitario es la enfermedad conocida como la tristeza del palto, ocasionada por oomicetos (*Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp.), que generan daños radiculares por necrosis y reducción de la producción (Hernández, 2016; Torres, 2017). Las alternativas de producción limpia a nivel mundial, para esta enfermedad, sugieren evitar el uso de agroquímicos nocivos y preferir los biocidas y fertilizantes naturales, para fortalecer la calidad nutracéutica del fruto. Las posibilidades de lograr este objetivo central de la producción son amplias, una de las tecnologías consiste en el uso de microorganismos antagonistas para los oomicetos.

La supresión preventiva o erradicante de los oomicetos patógenos del palto tiene dos orientaciones que se utilizan en el control integrado de la enfermedad; la primera, utiliza insumos químicos de alta capacidad química, biodegradables y efectivos; la segunda, incluye técnicas de control biológico usando microorganismos antagonistas.

En la investigación se planteó el uso del antagonista *Glomus intraradices*, un hongo micorrízico arbuscular, para evaluar su capacidad de reducir o atenuar los efectos patológicos de tres aislamientos de oomicetos en las raíces de plántulas de palto. Para

ello, se diseñó la evaluación en dos partes: *in vitro* para evaluar inhibición del crecimiento radial de la colonia (DCR con seis tratamientos, tres repeticiones) y en macetas (DCR con ocho tratamientos, cinco repeticiones) para determinar la capacidad de *Glomus intraradices* en la protección radicular de raicillas ante infecciones por oomicetos. Por las consideraciones anteriores se plantearon los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Determinar la capacidad antagónica de *Glomus intraradices* en oomicetos radiculares de palto.

### **Objetivos específicos**

1. Aislar e identificar oomicetos que ocasionan pudrición radicular en el palto.
2. Evidenciar el efecto inhibitorio de *Glomus intraradices* en el crecimiento radial de oomicetos *in vitro*.
3. Evidenciar la capacidad antagónica de *Glomus intraradices* en la actividad patogénica radicular de oomicetos en plántulas de palto en macetas.

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1. EL PALTO

##### 1.1.1. Taxonomía

Según Scora y Bergh (1990), la clasificación taxonómica del palto es la siguiente:

División	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Espermatophita	Dicotiledónea	Ranales	Lauraceae	<i>Persea</i>	<i>americana</i>

##### 1.1.2. Botánica

Mejía (2011) y Bernal *et al.*, (2014) describen al palto como una especie que presenta dicogamia y protoginia, flores dispuestas en panículas que se abren dos veces, actuando primero como flores femeninas y posteriormente como masculinas. Normalmente puede alcanzar los 20 metros de altura a más, con una copa amplia de formas globosas y acampanadas, cuyo diámetro puede alcanzar los 25 metros. El sistema radicular está compuesto por una raíz pivotante con ramificaciones laterales, raíces secundarias y terciarias que nacen inmediatamente por debajo del cuello de la planta y se distribuyen en mayor porcentaje en los primeros 60 cm. El tallo del árbol de palto es cilíndrico, erecto, leñoso, ramificado, con una corteza áspera a veces surcada longitudinalmente. Las ramas son extendidas que sostienen hojas lanceoladas pasando por todas sus variaciones y frutos de tipo baya que contiene una sola semilla; además, pueden mostrar múltiples formas debido a múltiples cultivares.

##### 1.1.3. Razas

Bernal *et al.*, (2014) como Ataucusi (2015) señalan que la especie *Persea americana* se clasifica en tres razas ecológicas: Raza mexicana caracterizada por producir frutos pequeños con cáscara delgada de color verde o morado, encontrándose en su interior una semilla pequeña; dentro de esta raza destacan las variedades Duke, Topa Topa y

Zutano; Raza guatemalteca, produce frutos de cáscara gruesa, áspera al tacto, dura y de color verde oscuro o morado, las variedades dentro de esta raza son como la Hass y la Naval; Raza antillana, a ésta pertenecen las variedades conocidas como criollas con frutos de gran tamaño que pueden alcanzar hasta los 2.500 gramos, de formas ovales, redondas o piriformes; con una corteza brillante tersa, flexible, delgada, no granular de color verde, verde amarillento, verde brillante, amarillo rojizo, rojo, morado o negro y con una semilla de gran tamaño.

#### **1.1.4. Ciclo de vida**

Amórtegui *et al.*, (2001) explican que el palto tiene un ciclo de vida prologado, que puede ser de 25 años para los cultivares criollos y de 15 a 18 años para las variedades mejoradas. Durante todo su ciclo muestra un crecimiento activo debido a la dominancia apical o crecimiento débil de las yemas terminales, dando la posibilidad de manera simultánea al desarrollo de yemas axilares que dan origen a la floración. Así mismo, señalan que su vida presenta cuatro etapas: Inicial (producción de plántulas) con una duración de 7 a 10 meses; desarrollo del árbol hasta su estado juvenil, de 1 a 4 años; inicio y estabilización de la producción, de 4 a 8 años y plena producción durante el estado adulto, de 8 a 25 años.

#### **1.1.5. Ecología del palto**

Los paltos se cultivan desde los 0 a 2 700 msnm (Ataucusi, 2015), la lluvia es un factor de mayor incidencia en el cultivo, en la región andina es necesario 1 200 mm de lluvia distribuida en el año, el exceso de lluvia afecta la floración y cuajado de frutos (Mejía, 2011), dando una tendencia a la proliferación de enfermedades; las condiciones edáficas requeridas por el palto son suelos muy bien drenados, profundos, franco arenoso y de textura liviana con pH 5.6 a 6.5 (Ataucusi, 2015; Bernal y Díaz, 2008; Gardiazábal, 1990); la temperatura influye en la producción del palto; así, de las tres razas, la mexicana se adapta a climas muy fríos, soportando temperaturas de hasta 2.2°C, teniendo como temperaturas óptimas de 5 a 17°C. La raza guatemalteca, se adapta a condiciones subtropicales, con temperaturas óptimas de 4 a 19°C, mientras que la raza antillana, se adapta a temperaturas de 18 a 26°C (Bernal y Díaz, 2008); para una mejor respuesta del cultivo se requiere agua de riego con una conductividad eléctrica límite de 1.2dSm-1, relación de absorción de sodio inferior a dos y contenido máximo de cloruros de 120 ppm (Sarmiento, 2018).

### **1.1.6. Enfermedad de la tristeza del palto**

Torres (2017) considera que la tristeza del palto es la enfermedad más importante que afecta a este árbol frutal, que es causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands; por su parte, Oviedo (2018) reporta para los cultivos de palto de la costa peruana que *Phytophthora cinnamomi* y *Phytophthium vexans* se asocian a la pudrición radicular conocida como tristeza del palto. Hernández (2016), así como Hernández *et al.*, (2019) reportan para Michoacán en México a *Phytophthium vexans* y *Pythium amazonianum* como nuevos agentes de la tristeza del palto. Cadenas (2007) en Ayacucho, determinó en su trabajo de Fitopatógenos que afectan la palta Hass y Fuerte en Luricocha y Huanta como principal oomiceto causante de la pudrición radicular a *Phytophthora* sp. y como secundario a *Pythium* sp.

INTAGRI (2015) sostiene que la enfermedad tristeza del palto prospera en terrenos planos, con deficiencias en los sistemas de drenaje, y en suelos pesados de sitios de alta precipitación. Siendo el contenido de arcilla, la capacidad de retención de humedad y la conductividad hidráulica del suelo los factores determinantes en la incidencia y severidad del patógeno causante de la enfermedad.

Torres (2017) menciona que la tristeza del palto se caracteriza por un decaimiento progresivo, inicialmente presentan hojas flácidas, las hojas se curvan, se marchitan y lentamente comienzan a tornarse amarillas, eventualmente se produce la defoliación completa del árbol. Además, la brotación del árbol se reduce o no existe. Se observa una muerte de ramillas y ramas, una alta floración y fructificación de bajo calibre. Latorre (1998) acota que existe una tendencia a generar frutos pequeños con síntomas de quemadura solar debido a la carencia de sombra por reducción de la cantidad de hojas en la copa del árbol.

Según INTAGRI (2015), la primera manifestación de esta enfermedad es el marchitamiento de la planta por la pudrición de las raíces. La pudrición se observa en las raíces, en las laterales del cuello, extendiéndose en el tronco hasta unos 50 cm aproximadamente, desarrollando canchales de color café claro a oscuro. El daño a la raíz disminuye la capacidad de absorción de agua y nutrientes, lo que se manifiesta en una pérdida de turgencia y marchitez de hojas. Al disminuir la producción de citoquininas y giberelinas, junto con un incremento en el suministro etileno hacia la parte superior de

la planta, se aprecia un retraso en el crecimiento de brotes, clorosis de hojas, muerte de yemas, floración excesiva y producción abundante de frutos de baja calidad.

## 1.2. PATÓGENOS DE LA TRISTEZA DEL PALTO

Los principales patógenos asociados a la tristeza del palto son los Peronosporales como *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophythium vexans* y *Pythium* sp. (Cadenas, 2007; Hernández, 2016; Torres, 2017; Oviedo, 2018; Hernández *et al.*, 2019).

*Phytophthora cinnamomi* es uno de los patógenos de plantas más devastadoras del mundo que afecta cerca de 5000 especies de plantas, incluidas muchas de importancia agrícola (Rodríguez *et al.*, 2015; Almaraz-Sánchez *et al.*, 2016; Hardham y Blackman, 2018).

*Phytophythium* es un género recientemente establecido que consiste en especies que anteriormente se clasificaron en el clado filogenético *Pythium* (Bala *et al.*, (2010). Estas especies son morfológicamente similares a *Pythium* spp., pero están genéticamente más cerca de *Phytophthora* sp (De Cock *et al.*, 2015).

MacDonald *et al.*, (1994) señalan que las especies de *Pythium* en sistemas de producción agrícola ocasionan pudrición de semillas, ahogamiento de plántulas, pudrición de raíces, frutos y otros órganos vegetales que se encuentran en contacto con el suelo. Tienen un amplio rango de hospedantes, por lo que pueden sobrevivir largos períodos de tiempo en el campo en hospedantes alternos, incluidas las malezas.

### 1.2.1. Clasificación taxonómica

Reino	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
			Peronosporaceae	<i>Phytophthora</i>	<i>cinnamomi</i>
Chromista	Oomycetes	Peronosporales	Pythiaceae	<i>Pythium</i>	
				<i>Phytophythium</i>	

### 1.2.2. Características morfológicas

#### a) *Phytophthora cinnamomi*

Coria (2009), Crone *et al.*, (2013) y Oviedo (2018) describen que *Phytophthora cinnamomi* posee un micelio formado por hifas hialinas, aseptadas y ramificadas. Las

hifas presentan abundantes hinchazones, éstos pueden tener forma esférica, elipsoidal o angular, aunque también adquieren una forma irregular conocida como hinchazones en cadena, y pueden ser intercalares, terminales o estar aislados, formando cadenas o racimos.

Coria (2009) sostiene que el aspecto de la colonia en medio de cultivo es tipo roseta o camelia debido al crecimiento deprimido y algodónoso del micelio que tiene lugar a intervalos irregulares.

Palmateer *et al.*, (2006) y Coria (2009) describen que los esporangios se forman sobre los esporangioforos donde presentan formas elipsoidales, ovoidales a ovoides alargados sin protuberancia alargada (apapilada), con medidas de 23 y 63 micras de largo por 15 a 30 micras de ancho sin papila.

*Phytophthora cinnamomi* presenta clamidosporas abundantes, globosas las cuales se muestran solitarias terminales o en grupos como racimos de uvas (Oviedo, 2018).

Ho y Zentmyer (1977) informan que las zoosporas son ovoides, puntiagudos en el extremo anterior, con un surco longitudinal a lo largo del cuerpo de zoospora. Son móviles y biflageladas en su mayoría mononucleadas.

#### **b) *Phytophthium* sp**

Bala *et al.*, (2010) y De Cock *et al.*, (2015) mencionan que las especies de *Phytophthium* se caracterizan por poseer esporangios de forma globosa a ovoide con una papila distintiva o no papilada y a menudo proliferando internamente como las de *Phytophthora* con esporangios no papilados. En su mayoría estas especies presentan célula femenina (oogonia) grande y lisa, oosporas de paredes gruesas y uno a dos células masculinas (anteridios) alargados o lobulados, aplicados lateralmente al oogonio.

Oviedo (2018) manifiesta que *Phytophthium* sp., presenta micelio hialino no septado y zoosporangios con tubos de descarga. Además, señala que estos oomicetos en medios de cultivo como CMA-PAR, presentan un crecimiento claveloide y superficial.

### c) *Pythium* sp

Ho (2018) describe que las especies de *Pythium* tienen micelios cenocíticos, hialinos y de ramificación libre con un crecimiento rápido, presentan oogonios que pueden ser globulares a limoniformes, terminales o intercalares en hifas no diferenciadas con la pared oogonial lisa o adornada con proyecciones de varias longitudes y distribuidas de manera uniforme o desigual. El anteridio es unicelular que puede ser sésil o intercalar en las hifas o terminales en un tallo especial; monoclinicas si se originan en el tallo oogonial, declinadas si se originan en una hifa diferente que no está estrechamente relacionada con la que subtiende el oogonio o la hiógina, si la porción proximal del tallo oogonial se convierte en un anteridium.

Según Oviedo (2018), *Pythium* sp. presenta un micelio bien desarrollado, hialino aseptado; clamidosporas terminales o intercalares con una doble pared; zoosporangios que muestran hinchamientos intercalares y algunos terminales con formas globosos, limoniformes, sub esféricos o filamentosos lobulado a toruloso; oogonias que contiene a la oófera, terminales o intercalares, globosas y de pared lisa; oospora plerótica o aplerótica en el interior del oogonio; anteridio terminal unidos al oogonio.

#### 1.2.3. Síntomas generados

Hardham (2005) y Palmateer *et al.*, (2006) dan a conocer que los síntomas que causa *Phytophthora cinnamomi* es principalmente pudrición de las raíces finas y fibrosas que se ennegrecen, se vuelven frágiles y eventualmente mueren.

Hardham (2005) menciona que los árboles gravemente infectados por oomicetos muestran un follaje escaso con hojas de color verde pálido, a menudo marchito y la muerte regresiva ocurre en etapas avanzadas debido al resultado de la interferencia con la transpiración de las raíces a los brotes.

Según Marais *et al.*, (2002) y Rodríguez *et al.*, (2015), el árbol afectado por *Phytophthora cinnamomi* manifiesta sus primeros síntomas visibles en la parte aérea del frutal. Las hojas son pequeñas, de colores verde pálido, a menudo marchitos con puntas marrones, y caen fácilmente. Los brotes mueren por las puntas, las ramas laterales empiezan a secarse en sentido descendente y las hojas terminan por secarse, permaneciendo unidas a las ramas durante un tiempo hasta caerse, finalmente el árbol

detiene su crecimiento. La muerte de los árboles se produce a partir de unos pocos meses hasta varios años, dependiendo de las características del suelo, las prácticas culturales y las condiciones ambientales.

Rodríguez *et al.*, (2015) sostienen que *Phytophthora cinnamomi* afecta a las raíces del palto generando pudrición de raíces absorbentes y secundarias, que hace que disminuya la absorción de agua y nutrientes. Las raíces adquieren una coloración oscura y una consistencia quebradiza, que seguidamente se necrosan y mueren. La muerte del palto se puede dar en plantaciones establecidas como en plántulas en vivero. Estos últimos pueden morir de manera prematura cuando se produce una necrosis a nivel del cuello, en muchas ocasiones éstos, no manifiestan síntomas y no se distinguen de las no infectadas.

Weste (1975) determinó que plantas de *Nothofagus cunninghamii* inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* fueron atrofiadas. El síntoma principal evidenciado fue la pudrición de la raíz. El síntoma secundario fue una clorosis irregular de las hojas, seguido por el secado y rizado de las hojas. La clorosis desapareció en un mes, las hojas se volvieron gris verdosas, luego marrones y finalmente la planta murió.

Bala *et al.*, (2010), Beckerman (2011) y Cram *et al.*, (2012) señalan que los síntomas generados en plantas por especies de *Pythium* y *Phytophthora* son similares. Los primeros síntomas de las infecciones por *Pythium* incluyen retraso del crecimiento; sin embargo, un examen cuidadoso de las puntas de las raíces al principio de la infección muestra solo puntas muertas. Con las pudriciones de la raíz causadas por estos patógenos, las raíces parecen empapadas de agua, la corteza de la raíz se desprende fácilmente, dejando una fibra de tejido vascular. En los tallos de los esquejes, puede desarrollarse una podredumbre suave y acuosa. Bajo tierra, las raíces se atrofian con pocas raíces laterales y absorbentes. El daño a menudo se limita a las raíces finas, aunque en casos graves la necrosis puede extenderse a los tejidos de la raíz más fibrosa.

#### **1.2.4. Procesos asociados a los síntomas**

Marais *et al.*, (2002) describe que el proceso de patogenicidad de los oomicetos hacia su hospedante inicia con la infección, con zoosporas y crecimiento de micelio a través del contacto de raíz a raíz que inicia la mayoría de las infecciones.

Las zoosporas son atraídas quimiotácticamente por los exudados de las raíces, se enquistan y germinan para producir tubos de germinación que penetran las raíces; a medida que crecen las hifas, liberan enzimas que destruyen el tejido de la raíz, haciendo que éstas se pudran y absorben azúcares como fuente de alimento (Beckerman, 2011).

Una vez que el oomiceto patógeno se ha establecido dentro de las raíces de un hospedante, se establece dentro del tejido cortical no lignificado y dentro del xilema. Esta acción bloquea el tejido conductor y evita la absorción de agua y nutrientes. Las plantas hospedantes pueden resistir la infección con la formación de lesiones bloqueantes o resistir la entrada al tener células epidérmicas resistentes en los pelos de la raíz. Aquellos que no mueren lo harán, una vez que la destrucción de su tejido conductor llegue al punto en que no puedan mantenerse (Marais *et al.*, 2002; Weste *et al.*, 2002).

### 1.3. HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

García-Seco (2017) expresa que estos microorganismos son simbioses obligados, pertenecientes al phylum Glomeromycota, que no se pueden desarrollar plenamente si no es con la asociación con una planta. Forman simbioses con el 80% de las plantas terrestres; por su parte, Carreón (2008) señala que tienen un efecto positivo en el desarrollo y sanidad del hospedante simbiótico, así como en la tolerancia y acumulación de metales pesados.

Kamel *et al.*, (2016) afirman que los hongos micorrízicos arbusculares se asocian con la gran mayoría de las plantas terrestres, proporcionando beneficios nutricionales y protegiendo a los hospedantes del estrés biótico y abiótico.

#### 1.3.1. *Glomus intraradices*

Es una especie de hongo micorrízico arbuscular que, como endomicorriza obligada, puede formar asociaciones mutuamente beneficiosas con las plantas (Tian *et al.*, 2017).

#### a. Clasificación taxonómica

Según Schübler y Walker (2010), la clasificación taxonómica es:

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>intraradices</i>

### **b. Características morfológicas**

Schübler *et al.*, (2001), Redecker y Raab (2006), Schübler y Walker (2010) describen a las especies de *Glomus* con hifas intra radicales enrolladas y ramificadas; vesículas de pared delgada de formas elipsoidales; arbuscúlos aplanados o cilíndricos adelgazándose sucesivamente en ramificaciones. Las esporas de *Glomus* se forman por gemación a partir de la punta de una hifa, pueden ser solitarias, en agregados laxos o en esporocarpos, son glomoides, tienen una pared con varias capas, originadas a partir de la hifa esporogénica, la que usualmente queda unida a la espora madura y encuentran en la parte superficial o cerca de la superficie del suelo.

Según Fracchia (2002), las esporas de *Glomus* se muestran en forma terminal sobre hifas vegetativas, poseen una pared gruesa en la madurez y pueden presentar distintos tipos de ornamentaciones. Además, destaca que el género *Glomus*, es el más numeroso dentro de las Glomales, con aproximadamente 80 especies.

### **c. Fisiología de la micorrización**

Fracchia (2002) explica que la simbiosis entre la planta hospedante y el hongo se da en cuatro etapas. La primera, llamada etapa presimbiótica, incluye el proceso de germinación de las esporas y el crecimiento del micelio en el suelo de los distintos propágulos de los hongos micorrícicos arbusculares, hasta encontrar la raíz de una planta hospedante. La segunda comprende el proceso de reconocimiento y establecimiento en la raíz por parte de las hifas y la formación de las primeras estructuras intra radicales. Posteriormente sigue la etapa de extensión, donde el hongo coloniza extensivamente la raíz y desarrolla extra radicalmente una profusa red de micelio. Finalmente, existe una etapa de esporulación, en la que el hongo desarrolla las esporas de resistencia dentro o fuera de las raíces.

Gerdemann (1968) como Friberg (2001) sostienen que la simbiosis inicia cuando la espora de tipo asexual germina cuando hace un reconocimiento de células de raíces jóvenes, una vez germinada la hifa genera un apresorio que ayuda a desarrollar un micelio intra radicular entre las células internas y la capa epidérmica de la raíz. La hifa produce arbuscúlos mediante la penetración generando en la planta invaginaciones en la plasmalema. En las células donde se forman los arbuscúlos, el almidón desaparece y los núcleos duplican su tamaño, posteriormente aumenta la actividad metabólica. Los

arbusculos liberan carbono de la planta generando en el suelo una extensa red de hifas. Así, el micelio externo se encarga de transportar agua y nutrientes al interior.

#### **d. Mecanismos de control de hongos micorrízicos en fitopatógenos**

INTAGRI (2016a) menciona que algunos hongos micorrízicos producen antibióticos que inhiben a los patógenos de raíz, generan hifas creando así una barrera física que ofrece una protección al hospedante ante fitopatógenos.

Jaizme-Vega y Rodríguez-Romero (2006) señalan que un mecanismo de control ejercido por los hongos micorrízicos es la competencia por fotosintatos y por espacios en la raíz.

Cordier *et al.*, (1998) como Jaizme-Vega y Rodríguez-Romero (2006) indican los hongos formadores de micorrizas arbusculares producen cambios en la morfología y topología de las raíces, estas alteraciones en algunos casos consisten en acortamiento de la raíz principal y un incremento de las raíces secundarias. Además, las modificaciones de la raíz generan un incremento de la lignificación de la endodermis de las raíces del hospedante que dificulta la invasión por fitopatógenos.

Jaizme-Vega y Rodríguez-Romero (2006), Fiorilli *et al.*, (2011) y Mustafa *et al.*, (2017) mencionan que la protección de los hongos micorrízicos hacia el hospedante se debe a la inducción de la resistencia sistémica a través de la producción de elicitores por parte de estos microorganismos. Donde la planta susceptible a patógenos puede incrementar la producción de sustancias fenólicas y peróxido de hidrógeno en los sitios de ingreso del patógeno. Además, un incremento en la concentración de ácido salicílico, ácido abscísico, quitinasas, isoflavonoides y arginina en raíces como en otros sectores de la planta hospedante.

#### **e. Micorrización del palto con hongos del género *Glomus***

Fracchia (2002) indica que en toda simbiosis de carácter mutualista existe una transferencia bidireccional de nutrientes entre hongo y raíz. En la simbiosis de micorrizas arbusculares ocurre una alteración fisiológica de la planta cuyo efecto más apreciable es la mejor nutrición de la misma y un consecuente incremento de su biomasa. Por otro lado, el componente fúngico de la simbiosis recibe los compuestos

carbonados necesarios para su crecimiento, los cuales provienen de la actividad fotosintética de la planta hospedante.

Hernández (2001) realizó un ensayo de inoculación de paltos de la raza mexicana con el hongo micorrízico *Glomus intraradices* y en combinación del hongo con diferentes fertilizantes. Por medio de la tinción de raíces, comprobó que el hongo evaluado era capaz de establecerse en las raíces de palto entre 50% y 70% de colonización de raíces. Comprobó que *Glomus intraradices* tuvo un efecto positivo en el incremento de la masa foliar y radicular de las plántulas de palto, considerando que una colonización superior a 50% o 60% es beneficioso para el hospedante. En condiciones similares de invernadero, Aravena (2002) dio a conocer que existe una buena relación simbiótica como resultado del 81.3% de colonización de raíces de paltos (raza mexicana).

En otras condiciones de trabajo, Huanca (2016) en su investigación realizada, al inocular *Glomus intraradices* en plantas de palto de la variedad Ettinger y Zutano encontró porcentajes de micorrización que van desde 68% a 89.9%. Además, determinó que el hongo micorrízico incrementa el tamaño de raíces y en consecuencia mayor vigorosidad de las plántulas de palto.

Montañez (2009) observó una respuesta positiva a la inoculación con cepas nativas de hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus* sp. y *Acaulospora* sp.) en plantas de palto, que fueron aislados y multiplicados bajo condiciones controladas. La biomasa en cada órgano de plantas de palto en fase de vivero se vio favorecida por la inoculación con los hongos micorrízicos. El porcentaje de colonización de raíces fue de 82.50% para *Acaulospora* sp. y 77.36% para *Glomus* sp.

#### **1.4. CONTROL BIOLÓGICO**

Singh (2014) menciona que el control biológico de fitopatógenos se basa principalmente en dos enfoques, el manejo de las poblaciones de microorganismos antagonistas residentes en el suelo o en la planta y la incorporación de estos microorganismos benéficos a los tejidos vegetales para prevenir los daños en el hospedante.

La supresión de enfermedades mediante el uso de agentes biológicos es la manifestación sostenida de interacciones entre el hospedante (planta), el patógeno, el agente antagonista, la comunidad microbiana alrededor de la planta y el entorno físico (Handelsman y Stabb, 1996; Pal y McSpadden, 2006; Chandrashekara *et al.*, 2012).

Cotes (2019) expresa que el control biológico de fitopatógenos tiene como propósitos fundamentales, mitigar los efectos nocivos de éstas y las consecuentes pérdidas económicas; reducir o reemplazar el uso de plaguicidas químicos e integrar las estrategias compatibles y sinérgicas para mejorar la efectividad en el manejo de fitopatógenos.

Ntushelo *et al.*, (2019) dan a conocer que los agentes de control biológico emplean diversas estrategias para lograr sus objetivos antagónicos durante su crecimiento, con la producción de compuestos activos (metabolitos) encontrados en especies para inhibir el crecimiento de patógenos.

Xavier y Boyetchko (2004) afirman que el control biológico presenta muchos beneficios, entre ellos ser parte esencial del ambiente, relativamente seguro, libre de riesgos y compatible con la agricultura sustentable. Los hongos micorrízicos arbusculares forman uno de esos grupos de organismos que pueden actuar como protectores de las plantas.

Cotes (2019) manifiesta que la implementación de los agentes de control biológico ayuda a proteger el ambiente, a crear posibilidades para aumentar los rendimientos de los cultivos y a aumentar el suministro de productos agrícolas libres de residuos químicos para el consumidor. Además, señala que, a pesar de los esfuerzos hechos durante décadas para promover el control biológico mediante el uso de microorganismos, su utilización aún sigue siendo limitada, teniendo en cuenta que el mercado mundial de bioplaguicidas solo representa un 5% del mercado de los productos fitosanitarios. Sin embargo, en los últimos años factores tales como la creciente población y las preocupaciones por la seguridad alimentaria, el rápido crecimiento de la demanda de productos libres de residuos de agroquímicos, los cambios en las prácticas agrícolas y el aumento de las preocupaciones ambientales han llevado al crecimiento en la demanda de agentes de control biológico.

Según Singh (2014), los microorganismos registrados y utilizados, en el mundo, en el control biológico de fitopatógenos son *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Gliocladium* spp., *Trichoderma* spp., *Beauveria bassiana*, *Metarrhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Hirsutella* especies, *Verticillium chlamydosporium*, *Streptomyces griseoviridi*, *Streptomyces lydicus*, *Ampelomyces quisqualis*, *Fusarium oxysporum* (no patogénico), *Burkholderia cepacia*, *Coniocytrium minitans*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium tumefaciens* fs. *Tumefaciens*, *Pythium oligandrum*, *Phlebia gigantean*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium islanidicum* (para el maní), *Chaetomium globosum*, *Aspergillus niger*, Hongos micorrízicos arbusculares, *Myrothecium verrucaria*, *Photorhabdus luminescences akhurstii*, *Serratia marcescens*, *Piriformospora indica* y otros.

#### **1.4.1. Fundamentos de control biológico sobre fitopatógenos**

Tanto Rubio y Fereses (2005) como INTAGRI (2016b) y Moreno-Velandia *et al.*, (2018) alegan que los mecanismos por los cuales actúan los microorganismos antagonicos en fitopatógenos incluyen: antibiosis, competencia, sideróforos, micoparasitismo y resistencia sistémica inducida.

- a. Antibiosis:** Consiste en que los microorganismos colonizan las raíces en crecimiento y liberan moléculas antibióticas alrededor de la raíz, perjudicando así los patógenos próximos al órgano.
- b. Competencia:** Los microorganismos de control biológico actúan compitiendo por los nutrientes y espacio disponible alrededor de la raíz.
- c. Sideróforos:** La producción de estos metabolitos permite a los microorganismos considerados como agentes de control biológico competir con los patógenos, especialmente porque los compuestos secretados quelatan la mayor parte de hierro, disminuyendo su disponibilidad para otros microorganismos.
- d. Micoparasitismo:** Proceso complejo en la interacción del antagonista y patógeno, que ocurre en cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento, y la actividad lítica.

- e. **Resistencia sistémica inducida:** Muchos productos de microorganismos de control biológico inducen el sistema de señalización, lo cual puede resultar en la protección de toda la planta contra las enfermedades causadas por microorganismos patógenos.

### 1.5. ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN FITOPATÓGENOS

Si bien la mejor nutrición de las plantas micorrizadas es el efecto más importante y contundente en la formación de la simbiosis, existen otros efectos de naturaleza aparentemente no nutricional como la resistencia a distintos tipos de estrés bióticos o abióticos y la capacidad antagónica en diferentes fitopatógenos (Facchia, 2002; Kamel *et al.*, 2016).

Referente a la capacidad antagónica de los hongos micorrízicos arbusculares, Jaizme-Vega y Rodríguez-Romero (2006) mencionan que está comprobado que los hongos micorrízicos arbusculares generan cambios químicos y fisiológicos en los tejidos del hospedante en el que se relacionan con la presencia de patógenos de suelo en raíces micorrizadas, tales como un incremento en las concentraciones de quitinasas, una acumulación de arginina en raíces y un aumento de isoflavonoides con una determinada resistencia a patógenos.

Diferentes autores han demostrado la capacidad antagónica de los hongos micorrízicos en diferentes fitopatógenos, así, por ejemplo, Trinidad-Cruz *et al.*, (2017) encontraron un efecto biocontrolador de dos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares contra *Fusarium oxysporum* en plantas de *Agave cupreata*. En invernadero, semillas de *Agave cupreata* fueron inoculadas con cuatro consorcios de hongos micorrízicos arbusculares nativos y un inóculo comercial. De ellos solo el consorcio nativo compuesto por *Acaulospora spinosa*, *Claroideoglobus claroideum*, *Claroideoglobus etunicatum* y *Glomus* sp. y el inóculo comercial que contiene esporas de *Glomus intraradices* mostraron efectos controladores, donde la severidad de la marchitez del agave fue de un promedio de daño de 33% con respecto al testigo inoculado con *Fusarium oxysporum* que presentó daños de 74%.

Orihuela (2017) reporta que los metabolitos extraídos de las especies *Glomus ambisporum*, *Sclerocystis sinuosum*, *Claroideoglobus etunicatum*, *Glomus maculosum*,

*Glomus mosseae*, *Diversispora spurca*, *Septoglomus constrictum* y *Acaulospora sp.*, mostraron efectos inhibitorios en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, con valores de 48.38%, 45.82%, 45.24, 43.80, 41.92, 41.47, 40.60 y 39.80% respectivamente en condiciones *in vitro*.

Mustafa *et al.*, (2017) detectaron que el hongo *Funneliformis mosseae* puede proteger al trigo contra el patógeno foliar *Blumeria graminis*. Los trigos fueron investigados bajo condiciones controladas. La infección por *Blumeria graminis* en las hojas de trigo se redujo en un 78% en las plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas. Las raíces de trigo inoculadas con *Funneliformis mosseae* revelaron una resistencia sistémica en hojas a *Blumeria graminis*, después de un cultivo de 6 semanas. Esta resistencia se asoció con una acumulación de compuestos fenólicos y peróxido de hidrógeno en los sitios de penetración de *Blumeria graminis*.

Nogales (2009) estudió la interacción del patógeno *Armillaria mellea* y el hongo micorrízico *Glomus intraradices*. Catorce semanas después, pudo observar los síntomas de pudrición y necrosis causados por el patógeno en las raíces de vid, aunque no llegó a observar síntomas en la parte aérea. La micorriza tuvo un efecto estimulador de crecimiento en la parte aérea de las plantas de vid, independientemente de si estaban inoculados o no con *Armillaria mellea*, pero este efecto no fue significativo en las raíces. El patógeno, por el contrario, provocó una reducción de la biomasa radicular, que fue aliviada en parte por el efecto de la micorriza. Además, manifiesta que existe un efecto de bioprotección indirecto de *Glomus intraradices*, contra *Armillaria mellea* en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad, bajo condiciones *in vitro*.

Castillo *et al.*, (2019) realizaron un ensayo que consistía en la utilización de *Trichoderma harzianum* pretratado con *Glomus* spp, como un medio para controlar el marchitamiento por *Fusarium* en plántulas de plátano. La aplicación de *Glomus* spp. ofreció una protección del 100% a las plántulas de banano contra *Fusarium* R4 teniendo como indicativo la ausencia del síntoma de marchitez. Una combinación de *Trichoderma harzianum* y *Glomus* spp. también dio un efecto significativo contra el marchitamiento por *Fusarium* a través de la progresión tardía de la enfermedad en las plántulas, pero no fue sinérgico.

Cordier *et al.*, (1998) dan a conocer que el hongo *Glomus mosseae* es capaz de conferir protección contra *Phytophthora parasítica* en raíces de tomate. Han demostrado que la resistencia sistémica localizada inducida participa en el control de patógenos en las raíces con un sistema experimental de raíz dividida. Indican que la disminución del desarrollo de patógenos en las partes de raíces micorrizadas se asocia con la acumulación de compuestos fenólicos y las respuestas de defensa de las células de las plantas. Como respuesta de defensa, en las raíces de tomate observaron formaciones de aposiciones en la pared celular reforzadas por callosa en plantas inoculadas solo con el hongo antagonista como en las inoculaciones hongo micorrízico + patógeno y como respuesta sistémica inducida observaron un engrosamiento de la pared celular de las raíces del hospedante, tanto en raíces con micorrizas y sin micorrizas dentro de una misma planta de tomate; y no así, en plantas testigo solo *Phytophthora parasítica*.

Estudios realizados por Sundram *et al.*, (2014) reportan el efecto combinado de hongos micorrícicos arbusculares con bacterias endofíticas en la reducción de la pudrición basal en la palma aceitera causada por *Ganoderma boninense*. La aplicación de los HMA con dos bacterias endófitas se evaluó en vivero y posteriormente en campo. *Glomus intraradices* UT126 redujo individualmente el desarrollo de la enfermedad, pero la combinación de los dos HMA con *Pseudomonas aeruginosa* UPMP3 mejoró significativamente la eficacia de control tanto en viveros como en campo, reduciendo la enfermedad de la pudrición basal del tallo al 57 y 80%, respectivamente.

En Italia, Fiorilli *et al.*, (2011) estudiaron si la simbiosis del tomate con *Glomus mosseae* modifica la respuesta de la planta a la infección del patógeno *Botrytis cinerea*. En las hojas de las plantas de tomate, observaron un índice de enfermedad más alto en las plantas de control (60.3%) en comparación con las plantas micorrícicas (37.5%). Midieron los niveles de estas hormonas en las hojas de las plantas micorrícicas y no micorrícicas. Si bien el ácido jasmónico no se detectó y no se observaron diferencias en el contenido de ácido salicílico; detectaron un menor contenido de ácido abscísico en las plantas micorrícicas versus control.

Doley *et al.*, (2015) efectuaron un estudio en macetas con plántulas de maní para observar la función que tiene el hongo *Glomus fasciculatum* en el control *Sclerotium rolfsii*. Las plántulas de maní se trataron con el HMA y el patógeno o ambos después de

30, 60 y 90 días de plantar. Los hongos HMA fueron inoculados antes de la inoculación con el patógeno. *Sclerotium rolfsii* causó pudrición del tallo en plántulas de maní, como se esperaba, pero la inoculación con *Glomus fasciculatum* mejoró significativamente la resistencia de las plántulas al disminuir la severidad de la pudrición del tallo y aumentar el crecimiento de las plántulas inoculadas. Después de 90 días de plantarse, los síntomas de la enfermedad se redujeron (50%) en plántulas de maní tratadas con *Glomus fasciculatum*, en comparación con el testigo sin hongo micorrízico (80.56 %).

Cristóbal *et al.*, (2010) evaluaron efecto de la inoculación de hongo *Glomus intraradices* en plantas de tomate variedad Maya como protector ante *Meloidogyne* sp. Los parámetros de evaluación fueron número de agallas por planta (NA), número de hembras por gramo de raíz teñida (NHe) y número de huevos por gramo de raíz licuada (NHu). De las estimaciones realizadas solo se detectó diferencias entre tratamientos con la variable NHu; sin embargo, el número de agallas fue mayor en el tratamiento testigo sin la inoculación de *Glomus intraradices*, con un promedio de 467 agallas por planta. Los autores observaron que conforme se incrementaban las dosis de inóculo *Glomus intraradices*, disminuyó la formación de agallas en las plantas, y calcularon una diferencia en promedio de 39% menos de formación de agallas en los tratamientos inoculados con el hongo micorrízico.

## **1.6. OTROS MICROORGANISMOS ANTAGÓNICOS PARA OOMICETOS RADICULARES**

INTAGRI (2015) menciona que distintos tipos de hongos han sido asociados como antagonistas de *Phytophthora cinnamomi* en suelo, los más estudiados son las especies clasificadas en los géneros *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus*. El uso de *Glomus fasciculatum* y la bacteria *Pseudomonas* sp. de forma individual o en combinación son ideales para la fase de germinación y establecimiento de paltos var. Hass, como estrategia de manejo integrado han demostrado aumentar la biomasa área y radicular.

Ramírez *et al.*, (2014) en su investigación realizada en Colombia evaluaron en condiciones de invernadero el efecto de cepas de *Trichoderma* sp., *Glomus fasciculatum* y una cepa de *Pseudomonas* sp., en el desarrollo de plántulas de *Persea americana*, sin inocular e inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*. Encontró que *Glomus fasciculatum* y *Pseudomonas* sp., solos o en combinación, favorecen el desarrollo de plántulas de

palto y reducen en 45% la enfermedad de la marchitez, mientras que *Trichoderma* sp. presentó los mejores resultados en la reducción del progreso de la enfermedad de marchitez en plantas inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* con 64%.

Mamani (2017) encontró que la actividad biológica de bacterias del género *Pseudomonas* controlan al patógeno radicular *Phytophthora cinnamomi*. Aisló y seleccionó 6 cepas (R2, R5, R7, R10, S10 y S6) de bacterias del género *Pseudomonas* de la rizósfera de palto con las que realizó pruebas para evaluar su capacidad controladora, en condiciones *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 plántulas de palto de 4 meses de edad y posteriormente se inoculó al patógeno. Las mejores cepas en el control de *Phytophthora cinnamomi* fueron S6, R2, R7 y R10 que controlaron un 55.2, 39.5, 33.7 y 31.0%; respectivamente.

En México, Andrade-Hoyos *et al.*, (2017) evaluaron la capacidad antagónica de tres cepas de *Trichoderma* (*Trichoderma viridae*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma* spp. Cepa C2) para el control de *Phytophthora cinnamomi*. Realizaron un ensayo de antagonismo *in vitro* por triplicado para cada una de las cepas de *Trichoderma* y *Phytophthora cinnamomi*. *Trichoderma viride* obtuvo un crecimiento radial de 0.438 mm en comparación a *Phytophthora cinnamomi* que obtuvo crecimiento de 0.119 mm. En cuanto a la capacidad antagónica dual entre *Trichoderma harzianum* y *Phytophthora cinnamomi* fue de 0.493 mm, en comparación con *Phytophthora cinnamomi* que creció 0.117 mm, obteniendo un crecimiento *in vitro* a las 8 h de 0.433 mm. Así mismo, tuvieron contacto ambos micelios a las 64 h. El mecanismo de acción que utilizó el antagonista *Trichoderma* fue por el sobrecrecimiento en el patógeno.

En Tarapoto, Márquez-Dávila *et al.*, (2010) extrajeron los metabolitos inhibitorios solubles de aislamientos endófitos de *Clonostachys* sp. El aislamiento Cl-41 mostró significativamente mayor capacidad de antibiosis con 26.68 % contra *Phytophthora palmivora*.

Mejía (2018) evaluó plantas de arándanos inoculados con micelios de *Phytophthora cinnamomi* propagados en trigo. Los mejores tratamientos comparados con el testigo

para el control de *Phytophthora cinnamomi* bajo condiciones de invernadero lo constituyen los tratamientos: testigo sin inocular con el menor porcentaje de raíz enferma (6,42%), seguido de *Trichoderma harzianum* con 25.71%. Los tratamientos inoculados con *Trichoderma* sp. (CH 02), *Trichoderma* sp. (CH 01) y *Trichoderma* sp. (CH 03), tuvieron un porcentaje de raíz enferma aún mayor, con 47.85%, 51.42%, 59.28%, respectivamente. Por otro lado, el tratamiento que tuvo el mayor porcentaje de raíz enferma fue *Trichoderma viride* (LM 02) que tuvo un 67.14%.

Liu *et al.*, (2019) en estudios de campo y laboratorio llegaron a evaluar dos cepas de *Bacillus*; *Bacillus amyloliquefaciens* JDF3 y *Bacillus subtilis* RSS-1, que tuvieron un efecto inhibitor eficaz sobre *Phytophthora sojae*. Un experimento en maceta indicó que *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* aumentaron la resistencia de la soja a *Phytophthora sojae*, y sus efectos de control fueron 70.7% y 65.5%, respectivamente. En etapa *in vitro* en cultivo dual *Phytophthora sojae* se inhibió significativamente con *Bacillus subtilis* RSS-1 y *Bacillus amyloliquefaciens* JDF3. Las tasas de inhibición fueron 71.4% y 67.1%, respectivamente.

En estudios realizados por Bae *et al.*, (2016), se extrajeron metabolitos de ocho aislamientos de *Trichoderma* de cultivos líquidos usando acetato de etilo y se analizaron sus actividades contra siete aislados de *Phytophthora*. El extracto de *Trichoderma virens* (KACC 40929) ejerció inhibición contra siete especies de *Phytophthora* (18 a 100%), teniendo la más alta contra *Phytophthora sojae* (100%); el extracto de *Trichoderma brevicompactum* (KACC 40931) ejerció inhibición contra seis especies de *Phytophthora* (9 a 93%), más alta contra *Phytophthora infestans* (93%). El extracto de *Trichoderma virens* (KACC 40717) mostró actividad contra tres especies con una inhibición del 16% al 87%.

El-Sayed *et al.*, (2019) identificaron en un ensayo *in vitro* dirigido por bioactividad del hongo *Aspergillus flavipes* como un fuerte inhibidor para el crecimiento de varias especies de *Phytophthora*. El extracto extracelular crudo de cultivos de caldo de *Aspergillus flavipes* mostró una inhibición significativa del crecimiento de varios *Phytophthora* spp, con valores de CE<sub>50</sub> que oscilaron entre 0.018 y 0.02 unidades. En cultivo dual dos aislamientos de *Phytophthora parasítica* (05-287 y 12-1) y *Phytophthora arecae* fueron los más sensibles a *Aspergillus flavipes*, mostrando un

promedio de 35% de inhibición del crecimiento, mientras que las otras especies de *Phytophthora* (*cinnamomi*, *capsici*, *tropicalis*, *palmivora*) mostraron aproximadamente 23.6 a 28.4% de inhibición del crecimiento.

## **CAPÍTULO II METODOLOGÍA**

### **2.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO**

La investigación se desarrolló en los ambientes del laboratorio e invernadero de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Escuela Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, distrito de Jesús Nazareno, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho a 2756 msnm, cuyas coordenadas son 13°09'20.07" Latitud Sur y 74°13'13.70" Longitud oeste.

### **2.2. MATERIAL BIOLÓGICO**

Inóculos del hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* obtenidas del producto comercial MYCOSIM TRI TON; oomicetos aislados de raíces de palto, recolectados del distrito de Luricocha - Huanta y plántulas de palto de raza mexicana, variedad Topa Topa obtenidas a partir de semilla botánica.

### **2.3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE OOMICETOS PATÓGENOS**

#### **2.3.1. Fase de campo**

##### **a. Zonas de muestreo**

Los lugares de muestreo se determinaron de acuerdo a informaciones brindadas por la Agencia Agraria Huanta y el Servicio Nacional de Sanidad Agraria-Ayacucho. Se seleccionaron los distritos de Luricocha y Huanta de la provincia de Huanta (Tabla 2.1), dentro de cada distrito se visitaron fundos y parcelas con paltos en los cuales se sospechaba la afección de éstos, por la pudrición radicular.

**Tabla 2.1.** Lugares muestreados

N°	Distrito	Comunidad	Cultivo	Portainjerto
01	Luricocha	Pichiurará	Palto Fuerte	Mexicano
02	Luricocha	Pachapunya	Palto Fuerte	Mexicano
03	Luricocha	Luricocha	Palto Hass	Mexicano
04	Luricocha	Azángaro	Palto Fuerte	Mexicano
05	Huanta	Palmayocc Baja	Palto Fuerte	Mexicano

### **b. Toma de muestras en campo**

En cada campo visitado se recorrió el área abarcado por éste y se eligió dos árboles de palto en base a la sintomatología secundaria, considerando presencia de ramas muertas, decaimiento y clorosis del follaje. Haciendo uso de un pico, de cada árbol se tomaron dos muestras de raíces con pequeño volumen de suelo. Las muestras se colectaron en dos puntos cardinales opuestos (norte, sur) y proximales al cuello del árbol de palto.



**Figura 2.1.** Árboles de palto con síntomas de tristeza

Cada muestra fue depositada en bolsas de plástico acompañada con una etiqueta escrita a lápiz; seguidamente, todas las muestras codificadas fueron colocadas dentro de una caja de tecnopor conteniendo hielo como refrigerante para mantener una temperatura baja y evitar la proliferación de microorganismos saprófitos. Las muestras fueron trasladadas lo más rápido posible al laboratorio.

### **2.3.2. Fase de laboratorio**

Las muestras obtenidas se procesaron en el laboratorio de Rhizobiología el mismo día del muestreo, para evitar la proliferación de microorganismos saprófitos.

### **a. Preparación de medios de cultivo**

Para el aislamiento de los patógenos se preparó el medio selectivo V8-PARB (Jeffers, 2006) que permite solo el crecimiento de oomicetos, utilizando como base 100 ml/L de jugo V8 clarificado (Anexo 2) y la adición de tres antibióticos 0.01g/L de Pimaricina, 0.25g/L de Ampicilina, 0.01g/L de Rifampicina y 0.05g/L del fungicida Benomil. Para promover su desarrollo micelial se preparó el medio agar harina de maíz (AHM) (1g/L de maicena, 18g/L de agar, 20g/L de azúcar y 2g/L de extracto de levadura). Los ingredientes de los medios de cultivo se diluyeron en 500 ml de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C a una presión de 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 30 minutos. Luego, los medios se distribuyeron en placas de Petri estériles y se conservaron en refrigeración.

### **b. Siembra de raicillas**

Para eliminar el suelo adherido de las muestras de raíces, se lavaron cuidadosamente con agua de caño estéril hasta que las raíces quedaran limpias. De cada muestra se seleccionaron raicillas que mostraban síntomas de pudrición radicular y se cortaron en fragmentos de 1 a 1.5 cm de longitud aproximadamente, conteniendo 50% de tejido sano y 50 % de tejido enfermo.

Dentro de una cámara de flujo laminar, los fragmentos de raíces se sumergieron en placas estériles conteniendo hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, con el propósito, al igual que el alcohol de eliminar otros microorganismos superficiales; a continuación, se sumergieron en una solución de alcohol al 76% durante tres minutos; acto seguido, se sumergieron en agua destilada estéril durante cuatro minutos, luego fueron colocadas sobre papel toalla absorbente estéril para eliminar el excedente de agua; posteriormente, se procedió a la siembra en las placas de Petri conteniendo medio V8-PARB, colocando 6 fragmentos de raicillas de manera equidistante.

Las placas sembradas con raíces se incubaron a oscuridad en una estufa a 24°C por cuatro días; observándose diariamente el crecimiento de las colonias en los puntos de siembra.

### **c. Obtención de colonias puras**

Una vez visualizadas las colonias poco desarrolladas en los puntos de siembra, se procedió a extraer discos de un extremo de cada colonia en activo crecimiento para repicarlas a

placas de Petri conteniendo medio agar harina de maíz (AHM), en cada placa se repicó dos discos de distintas colonias en puntos opuestos. Las placas repicadas se incubaron a 24 °C durante cinco días, siendo observadas diariamente debido a que algunas colonias tenían un crecimiento más rápido que otras. Basándose en las formas de crecimiento de las colonias, se hizo un agrupamiento de ellas y se procedió a repicarlas nuevamente, un tipo de colonia por cada placa de Petri conteniendo el mismo medio de cultivo.

Del total de 27 aislamientos logrados se seleccionaron 3 aislamientos más representativos según la forma de colonia.

#### **d. Identificación de los aislamientos**

Los aislamientos seleccionados se identificaron de acuerdo a la morfología de las colonias y características de las estructuras vegetativas y reproductivas consideradas según las descripciones de distintos autores que se indican a continuación:

- **Observación de la colonia**

Para los estudios de morfología de las colonias de los distintos aislamientos se tuvieron en cuenta el hábito de crecimiento del micelio y patrones del micelio según descripciones por Van Der Plaats-Niterink (1981), Drenth y Sendall (2001), Jeffers (2006) y Calle (2017).

- **Observación de estructuras**

Previo al estudio de las características morfológicas de estructuras, cada aislamiento se indujo a producir estructuras de propagación. Para ello, en condiciones asépticas se extrajo dos discos de inóculo de cada placa de Petri por aislamiento que se encontraban en crecimiento activo al quinto día de ser repicado; luego, se sumergieron en 15 ml de solución salina de cloruro de calcio al 0.01% estéril contenidas en placas de Petri (Islam *et al.*, 2004; Balci y Bienapfl, 2013). Por último, se dejó a incubar a temperatura ambiente por 24 horas bajo luces fluorescentes (Jeffers, 2006).

Para realizar los montajes se extrajeron discos de 3mm de diámetro aproximadamente a partir del borde de las colonias que se encontraban en crecimiento dentro de la solución salina y se colocaron sobre un porta objetos de vidrio conteniendo una gota de azul de lactofenol, finalmente se cubrieron con un cubre objetos.

Las estructuras de los aislamientos se observaron con la ayuda de un microscopio óptico compuesto. Se tomaron registros fotográficos de las principales estructuras característicos de los oomicetos y se compararon con las descripciones de diversos autores (Calle, 2017; Oviedo, 2018; Van Der Plaats-Niterink, 1981; Drenth y Sendall, 2001; De Cock *et al.*, 2015; Redekar *et al.*, 2019; Palmater *et al.*, 2006; Crone *et al.*, 2013; Coria, 2009).

#### **e. Prueba de patogenicidad**

En el ensayo se evaluó la susceptibilidad de plántulas de palto de la variedad Topa Topa obtenidas en condiciones asépticas frente a tres oomicetos seleccionados.

El ensayo se llevó a cabo con plántulas de paltos de tres meses de edad en recipientes de vidrio de 200 ml, cuyo sustrato principal estaba compuesto por agua estéril.

#### **• Propagación del patógeno en soporte orgánico**

Se utilizaron como sustrato de crecimiento del patógeno, semillas precocidas de trigo contenidas en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 30 minutos por dos veces consecutivas. En cada placa de Petri conteniendo trigo, en condiciones asépticas se sembró cuatro discos de micelio de los patógenos y se incubaron a 24°C en oscuridad durante 20 días, hasta observar la cobertura micelial por ambas caras de las placas. La inoculación se realizó a razón de 5 gramos de trigo con inóculo, por recipiente.

Las plántulas de palto inoculadas con los patógenos se observaron diariamente durante 7 días. Las plántulas decaídas fueron procesadas para confirmar que los aislamientos inoculados fueron los responsables de sus decaimientos, para ello se realizó la extracción y siembra de raicillas en medio de cultivo V8-PARB con la técnica mencionada en el punto 2.3.2.b.

## **2.4. CAPACIDAD ANTAGÓNICA IN VITRO DE *Glomus intraradices* EN OOMICETOS AISLADOS**

### **2.4.1. Obtención de biomasa de *Glomus intraradices***

Para la obtención de biomasa de *Glomus intraradices*, se inoculó 5 plántulas de palto con una edad de 40 días aproximadamente con el producto comercial MYCOSIM TRI

TON conteniendo inóculos de *Glomus intraradices* (Explicación detallada en el ítem 2.5), estas plántulas inoculadas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura dentro de un invernadero.

Al transcurrir 5 meses aproximadamente se eliminó la parte aérea de las 5 plántulas y se dejó de regar por dos semanas. Luego de este tiempo, el contenido rizosférico de las plántulas se vació y se guardó en bolsas plásticas y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

#### **2.4.2. Aislamiento de esporas de *Glomus intraradices***

El aislamiento de las esporas se realizó siguiendo la técnica de tamizado en húmedo y decantado propuesto por Gerdemann y Nicolson (1963).

Se preparó una solución de 100 gramos de suelo rizosférico y raíces en 3 litros de agua de caño, se agitó mecánicamente por un periodo de 5 minutos y se dejó decantar por un tiempo de 30 minutos. Luego de este periodo, se hizo pasar la suspensión por un juego de tamices de tamaño de poro de 45, 250 y 500  $\mu\text{m}$ , ubicados sucesivamente en forma decreciente y se lavó con abundante agua corriente repitiéndose la acción dos veces. La fracción obtenida del tamiz de 45  $\mu\text{m}$  se puso en suspensión en 50 ml de agua destilada estéril contenidas en recipientes de vidrio estériles. El contenido se transfirió a un papel filtro contenidas en placa de Petri para su conteo.

#### **2.4.3. Conteo y selección de esporas**

De la suspensión de esporas aisladas contenidas en 50 ml de agua destilada estéril, haciendo uso de una pipeta automática, se tomaron 4 sub muestras de 100  $\mu\text{l}$  y fueron vertidas en un papel filtro contenidas en placas de Petri. El conteo se realizó con la ayuda de un estereoscopio a un aumento de 80x y una aguja de disección, teniendo en cuenta la similitud en forma, color y tamaño. Los resultados de las contabilizaciones de las cuatro sub muestras se promediaron y se multiplicó por el volumen inicial de la suspensión.

#### **2.4.4. Extracción de metabolitos inhibitorios solubles de esporas de *Glomus intraradices***

De la suspensión de esporas contabilizadas, con la ayuda de una pipeta automática se extrajo una muestra de 14 ml (50 esporas/ml) y fue depositada en un matraz Erlenmeyer estéril para ser desinfectadas.

##### **a. Desinfección superficial de esporas**

El proceso de desinfección de esporas se realizó en un matraz Erlenmeyer conteniendo una muestra de 14 ml de suspensión de esporas, a la cual se agregó una solución desinfectante compuesta por 0.2 ml/L de gentamicina, 0.01g/L de rifampicina, 0.006g/L de natamicina y 0.125g/L de ampicilina sódica. Se agitó manualmente por 5 minutos aproximadamente; luego, se vertió la mezcla en un tamiz de 45  $\mu\text{m}$  previamente esterilizado para ser enjuagadas 4 veces con agua destilada estéril, para quitar los restos de la solución desinfectante. Finalizado el enjuague, las esporas contenidas en el tamiz se transfirieron a un tubo de ensayo estéril con agua destilada estéril. De esta manera las esporas de *Glomus intraradices* estaban listas para la extracción de sus metabolitos. Todo el proceso de desinfección se realizó dentro de una cámara de flujo laminar de laboratorio de Rhizobiología.

##### **b. Producción de metabolitos**

Se siguió la técnica descrita por Bailey *et al.*, (2008). En un balón de vidrio estéril conteniendo 150 ml de caldo mínimo en sales modificado (Sekar *et al.*, 2011) con 0,1% de ácido aspártico, se inoculó la suspensión de esporas desinfectadas y se incubaron en una estufa a 24°C por seis días, con una remoción diaria en un agitador orbital por un periodo de una hora a 110 rpm. Las esporas y otras estructuras se eliminaron por filtración con la ayuda de un papel filtro estéril cerca de un mechero de Bunsen, el filtrado se centrifugó a 3 000 rpm durante 15 minutos, posteriormente se esterilizó colocando en baño María a 90°C durante 2 horas. El filtrado estéril se dejó reposar por un tiempo prudencial para que de inmediato sea mezclada con el medio de cultivo de AHM lo más pronto posible.

#### **2.4.5. Medios de cultivos modificados**

Para evaluar el efecto inhibitorio de los metabolitos del hongo micorrízico, se preparó dos tipos de medios de cultivos: a) medio inhibitorio (AHM-MIS) compuesto como

medio base por agar harina de maíz al cual se le adicionó el extracto de los metabolitos inhibitorios solubles (MIS) con una proporción de volumen de agua estéril (1:1) para ambos componentes, adicionándose un volumen semejante de agar en AHM, para compensar el volumen del MIS; b) Medio de cultivo agar harina de maíz AHM como testigo para ver el crecimiento y desarrollo de los patógenos en estudio.

#### 2.4.6. Efecto de los metabolitos inhibitorios solubles en oomicetos

##### a. Tratamientos y diseño experimental

Los tratamientos se plantearon en el Diseño Completamente Randomizado, con seis tratamientos experimentales y tres repeticiones por tratamiento.

Los tratamientos establecidos para el presente ensayo se describen en la tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Tratamientos establecidos en la prueba *in vitro*

Tratamiento	Descripción
T1	<i>Glomus intraradices</i> (MIS*) + <i>Phytophthora</i> sp. A01
T2	<i>Glomus intraradices</i> (MIS*) + <i>Phytophthium</i> sp.
T3	<i>Glomus intraradices</i> (MIS*) + <i>Phytophthora</i> sp. A02
T4	Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A01
T5	Testigo <i>Phytophthium</i> sp.
T6	Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A02

MIS\*: Metabolitos inhibitorios solubles

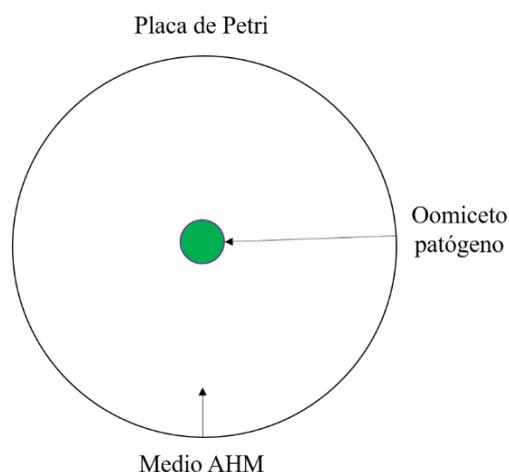
##### b. Unidad experimental

Las unidades experimentales de observación fueron las placas de Petri con el crecimiento y desarrollo de los patógenos evaluados.

##### c. Siembra de oomicetos patógenos

Para establecer la capacidad antagónica de los metabolitos solubles de *Glomus intraradices* en los oomicetos patógenos, se procedió a extraer un disco de agar de 5 mm de diámetro conteniendo inóculos de oomicetos, del borde de la colonia con 5 días de crecimiento utilizando un sacabocado estéril y un soporte con aguja de punta fina desinfectada al flameo. La siembra de los discos de agar se realizó en el centro de cada placa de Petri, como se observa en la figura 2.2.

Las placas de Petri sembradas se envolvieron con papel Kraft y se incubaron en oscuridad dentro de una estufa a 24°C por ocho días.



**Figura 2.2.** Ubicación de disco con inóculo de oomiceto patógeno en placa con medio

#### **2.4.7. Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro***

##### **a. Crecimiento de patógenos**

Consistió en registrar cada 24 horas el crecimiento micelial (cm/día) de las colonias de los oomicetos en medio de cultivo AHM y en medio AHM-MIS en cada unidad experimental. Las mediciones se realizaron dentro de una cámara de flujo laminar haciendo uso de una regla graduada, hasta que los tratamientos testigo llenaran la superficie de las placas de Petri.

##### **b. Porcentaje de inhibición**

El porcentaje de inhibición micelial se calculó con los datos de crecimiento micelial del patógeno en medio de cultivo AHM (Agar harina de maíz) como testigo y el crecimiento micelial del patógeno en medio AHM – MIS (Agar harina de maíz + metabolitos inhibitorios solubles), aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \left( \frac{\text{Crecimiento en AHM} - \text{Crecimiento en AHM-MIS}}{\text{Crecimiento micelial en AHM}} \right) \times 100$$

#### **2.4.8. Análisis estadístico de datos**

Los resultados obtenidos se sometieron al análisis de varianza (ANVA) y a la prueba de comparación de promedios de Duncan (0.05), para observar las diferencias entre los tratamientos.

## 2.5. ACTIVIDAD ANTAGÓNICA EN MACETA DE *Glomus intraradices* EN OOMICETOS AISLADOS

### 2.5.1. Condiciones del invernadero

El ensayo del antagonismo *in vivo* se desarrolló en condiciones del invernadero de Rhizobiología, donde internamente se adaptó una malla Raschel con 65% de sombra. En el tiempo que duró el estudio se registraron las temperaturas máximas y mínimas diarias (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3.** Temperatura máxima, mínima y media mensual en el invernadero de Rhizobiología

Año	2019								
Mes	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Setiembre	Octubre	Noviembre
T° Máxima (°C)	27.6	25.9	22.3	18.9	19.5	20.9	25.5	26.0	22.7
T° Mínima (°C)	16.1	13.8	11.0	9.1	10.2	12.0	15.4	15.3	17.8
T° Promedio (°C)	21.8	19.8	16.7	14.0	14.8	16.5	20.5	20.6	20.3

### 2.5.2. Obtención de plántulas de palto

#### a. Obtención de la semilla

Las semillas utilizadas en la investigación fueron extraídas de frutos con madurez fisiológica, cosechados del tercio medio de la copa de un árbol de palto de la raza mexicana de propiedad de la familia Escobar Chumbes en el distrito de Huanta, comunidad de Chacco. Las semillas extraídas se lavaron con abundante agua para eliminar restos de pulpa adherida y se dejaron secar bajo sombra durante 48 horas; luego, se seleccionaron semillas de peso promedio de 27 gramos.

#### b. Germinación de semillas

Las semillas seleccionadas se sometieron a la eliminación de la testa y cortes en los cotiledones (apical 8mm, basal 3mm y laterales 5mm aproximadamente) (Conde, 2018). A continuación, fueron tratadas con una solución de 200g/200L de un fungicida agrícola (Parachupadera); seguidamente, se sembraron en un contenedor de polietileno con tapa, conteniendo como sustrato viruta húmeda y esterilizada en autoclave a 120 °C. Todo el proceso descrito fue con el fin de acelerar la germinación de las semillas.

#### c. Preparación de sustrato y repique

Se constituyó un sustrato descrito por Conde (2018), con 30% de tierra negra, 30% de tierra agrícola, 15% de arena fina y 25% de estiércol de caprino. Se humedeció la

mezcla a capacidad de campo y se procedió a llenar con sustrato latas de 2 kg; a continuación, fueron colocadas en un cilindro de metal y esterilizadas durante 30 minutos utilizando leña como combustible para producir llama y generar calor (Chávez, 2015). El sustrato esterilizado se colocó en bolsas negras de polietileno de medidas 12” x 8” x 0.02”, con capacidad para 2.5 Kg.

**Tabla 2.4.** Análisis físico - químico del sustrato

Clase textural	pH (H <sub>2</sub> O)	C.E. (dS/m)	CaCO <sub>3</sub> (%)	M.O (%)	Nt (%)	Elementos disp. (ppm)		Cationes cambiables (Cmol(+)/Kg)					C.I.C. (Cmol(+)/Kg)	
						P	K	Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Al <sup>+3</sup>		H <sup>+</sup>
Fr-Ao	7.43	3.518	0.5	4.15	0.2	17.2	148.8	8.14	4.32	0.76	1.48	0.0	0.0	14.9

**Fuente:** Laboratorio de análisis de suelos y aguas “Nicolás Roulet” de la UNSCH-2019

Cuando las semillas presentaron signos visibles de germinación (radícula de 1 cm aproximadamente) fueron repicadas a los sustratos estériles contenidos en bolsas de polietileno.

### 2.5.3. Tratamientos

Las plántulas obtenidas fueron seleccionadas considerando el tamaño de la parte aérea y fueron distribuidas para el estudio del antagonismo in vivo, en un total de ocho tratamientos experimentales con cinco repeticiones, los cuales se describen de acuerdo al siguiente detalle:

**Tabla 2.5.** Tratamientos evaluados en la prueba en macetas

Tratamiento	Descripción
T1	<i>Glomus intraradices</i> + <i>Phytophthora</i> sp. A01
T2	<i>Glomus intraradices</i> + <i>Phytophthium</i> sp.
T3	<i>Glomus intraradices</i> + <i>Phytophthora</i> sp. A02
T4	Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A01
T5	Testigo <i>Phytophthium</i> sp.
T6	Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A02
T7	Testigo <i>Glomus intraradices</i>
T8	Testigo sin inoculación

### 2.5.4. Inoculación de plántulas de palto con *Glomus intraradices*

Para la inoculación con *Glomus intraradices* se utilizó 5g/plántula de producto comercial MYCOSIM TRI TON, cuando los paltos tenían una edad de 40 días.



**Figura 2.3.** Inoculación de plántulas de palto con *Glomus intraradices*

Para evidenciar la infección de las raíces de las plántulas de palto por *Glomus intraradices*, se tomó al azar tres plántulas del grupo de inoculadas, a los 150 días aproximadamente después de ser puestas en contacto con los inóculos del hongo micorrízico. A continuación, se procedió a realizar la determinación del porcentaje de colonización, utilizando el método de tinción de raíces descrita por Phillips y Hayman (1970) modificado por Siverding (1983).

#### **a) Tinción de raíces**

Las raíces de palto fueron separadas del sustrato con mucho cuidado y se lavaron con agua de caño. Seguidamente, se seleccionaron las raíces secundarias y las más tiernas, las cuales se cortaron en secciones de 1 a 1.5 cm de longitud; luego, se depositaron en dos tubos de ensayo a razón de 0.5g/tubo.

A los tubos de ensayo conteniendo las raíces se les añadió KOH al 10% hasta que todas las raíces quedaran cubiertas. Se procedió a calentar los recipientes conteniendo las muestras en baño María a 90°C por 10 minutos, luego se eliminó el KOH y se enjuagó con agua destilada, se sumergieron las raíces en peróxido de hidrógeno al 0.3% durante un minuto.

Para realizar el clareo y acidificación de las raíces se aplicó HCl al 10% y se dejó sumergidas en la solución durante 15 minutos, se desechó el HCl y sin ser enjuagadas, a

las muestras se les añadió fucsina ácida al 0.05% y nuevamente fueron sometidas a baño María por 15 minutos.

Se extrajo los tubos del baño María y se dejó enfriar, para posteriormente eliminar el exceso de colorante; luego, las raíces teñidas se colocaron en placas de Petri conteniendo lactoglicerol y se dejaron sumergidas en ella durante 24 horas.

#### **b) Determinación del porcentaje de colonización**

Se utilizó el método de evaluación de campos colonizados y no colonizados propuesta por Sieverding (1983).

Se tomaron láminas portaobjetos y se trazaron líneas paralelas longitudinalmente. Las raíces teñidas, con ayuda de una pinza fueron colocadas en forma perpendicular a las líneas trazadas sobre la lámina portaobjetos y cubiertos con un cubre objetos. Empleando un microscopio con aumento de 40x, haciendo que el objetivo cruce los segmentos de raíces se contaron los campos colonizados con hifas y arbusculos y campos no colonizados.

El porcentaje de colonización se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Colonización} = \left( \frac{\text{N}^\circ \text{ de campos colonizados}}{\text{N}^\circ \text{ de campos observados}} \right) \times 100$$

#### **2.5.5. Inoculación de plántulas de palto con aislamientos seleccionados**

La inoculación de las plántulas con los patógenos, se realizó cuando éstos contaban con una edad de 150 días aproximadamente.

#### **a) Multiplicación de los patógenos**

Siguiendo la técnica modificada de Palmucci (2015) y Hernández (2016), las semillas de trigo precocidas se esterilizaron dos veces en placas de Petri a 120 °C durante 30 minutos. En cada placa de Petri se puso 4 discos de agar conteniendo inóculos de los oomicetos seleccionados y se pusieron a incubar por un periodo de 20 días a 24 °C.

## b) Inoculación del patógeno

Del total de placas de Petri conteniendo trigo con inóculo, se seleccionaron las que tenían cobertura micelial en ambas caras de la placa y sin la presencia de otros agentes contaminantes. El inóculo se extrajo de las placas de Petri y fueron colocados en una bandeja desinfectada, para ser homogenizadas. La aplicación del inóculo a las plántulas se realizó depositando 5g de trigo con inóculo por kilogramo de sustrato (Oviedo, 2018) a una profundidad de 5 cm teniendo contacto con las raíces.

Se realizó un riego pesado a todas las unidades experimentales, regándolas con 500 ml de agua de caño oreada cada dos días, hasta observar los primeros síntomas secundarios (clorosis y decaimiento de la parte aérea).



**Figura 2.4.** Inoculación de plántulas de palto con micelio de oomicetos seleccionados

### 2.5.6. Evaluación de parámetros

La actividad antagónica de *Glomus intraradices* en oomicetos patógenos se determinaron a través de mediciones de las siguientes variables:

#### a. Severidad patogénica radicular (S)

Las raíces fueron separadas del sustrato y lavadas con agua corriente, las que se pesaron en una balanza analítica, para obtener el peso total de raíces. Para calcular el índice de severidad se extrajeron las partes dañadas de las raíces y así obtener el peso de raíces con síntomas de pudrición. Con los datos de los pesos obtenidos se calculó el porcentaje de peso de raíz dañada por los oomicetos con la siguiente ecuación:

$$S = \left( \frac{\text{Peso de raíces enfermas}}{\text{Peso total de raíces}} \right) \times 100$$

**b. Incidencia patogénica radicular (I)**

Se examinó a las plántulas registrando si presentaban o no síntomas de pudrición radicular. Expresándolas en términos porcentuales haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$I = \left( \frac{\text{N}^\circ \text{ de plántulas con necrosis en la raíz}}{\text{N}^\circ \text{ de plántulas observadas}} \right) \times 100$$

**c. Materia seca radicular**

Las raíces frescas fueron pesadas en una balanza analítica, se colocaron dentro de sobres de papel y fueron llevadas a una estufa a una temperatura de 60 °C durante dos días consecutivos. Concluido el tiempo de las muestras de raíces en la estufa se procedió a registrar su peso seco.

**d. Materia seca de la masa aérea**

La determinación de la materia seca de la parte aérea de las plántulas se realizó poniendo las hojas y tallos del palto, previo picado con tijera de podar, en sobres de papel Kraft. A continuación, se colocaron dentro de una estufa a 60 °C durante 48 horas. Finalizado el secado las muestras de la masa aérea, se procedió a su pesaje respectivo.

**2.5.7. Diseño experimental y análisis de datos**

Los 8 tratamientos establecidos se dispusieron en el Diseño Completamente Randomizado. Con los datos obtenidos, se procedió a realizar el análisis de varianza y la prueba de significación de Duncan con un nivel de confianza del 95%, para comparar los promedios obtenidos en los diversos parámetros de evaluación.

## **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE OOMICETOS PATÓGENOS**

##### **3.1.1. Muestreo de parcelas con palto**

Según el muestreo efectuado, la distribución de raíces infectadas fue amplia, observándose la sintomatología de necrosis en todas las comunidades visitadas, lo cual indica que los patógenos radiculares se encuentran distribuidos en muchas parcelas, independientemente de los cultivares existentes. Al respecto, Torres (2017) informa que la distribución de los patógenos que causan la tristeza en el palto se encuentra casi en todos los territorios donde crecen estos frutales y en muchos suelos que mantienen humedad durante buena parte del año. Esta información concuerda con la condición patológica de los suelos de Luricocha y Huanta (Barrantes, 2019). Oviedo (2018) determinó que los oomicetos están presentes en casi todos los suelos donde se cultiva palto en la costa peruana.

Al haberse escogido árboles con sintomatología de decaimiento y clorosis del follaje, por distrito, se comprobó que fueron síntomas asociados a la presencia de oomicetos causando daños en las raíces y que en Huanta ocurre lo mismo que en otras áreas cultivadas con palto en distintas zonas del país (Huarhua *et al.*, 2018). La profundidad del muestreo (15 - 20 cm) correspondió a la zona donde se encuentran la mayoría de raicillas absorbentes, y también al lugar donde se alojan los oomicetos y se observan síntomas de necrosis, situación similar a las investigaciones realizadas en otras zonas de cultivo de paltos (Calle, 2017; Barrantes, 2019).

##### **3.1.2. Aislamiento**

El aislamiento de los oomicetos patógenos no fue posible en medios comunes como el APD y AHM, puesto que microorganismos presentes en la superficie de las raicillas diferentes a oomicetos tienen mayor velocidad de crecimiento. Se logró obtener los

aislamientos en el medio de cultivo V8, donde la incorporación de antibióticos pimaricina, ampicilina, rifampicina y fungicida benomil fueron determinantes para aislar exclusivamente oomicetos e inhibiendo el crecimiento de otros agentes contaminantes (Cacciola *et al.*, 2004).

Los patógenos aislados en medio V8-PARB no mostraron formas definidas de colonias, por ello fue necesario realizar repiques en medio AHM donde los aislamientos presentaron distintas formas de colonias. De esta manera se determinó al AHM como un medio de cultivo apropiado para realizar caracterizaciones macroscópicas. De los repiques realizados en medio AHM se logró obtener 27 aislamientos de oomicetos, que se clasificaron según la forma de colonia y hábito de crecimiento; de este grupo se seleccionaron tres aislamientos representativos.

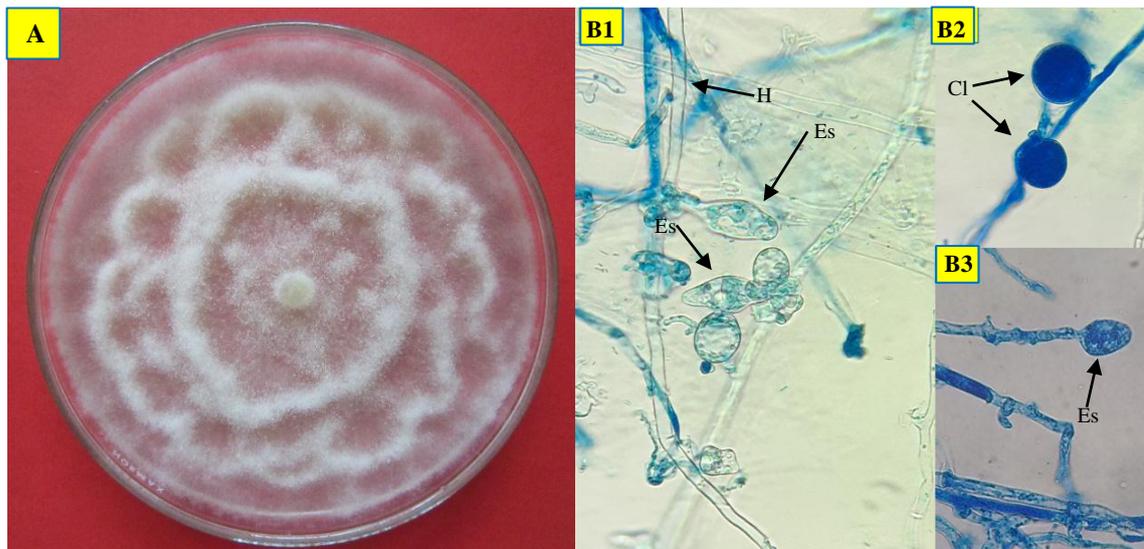
### **3.1.3. Identificación de aislamientos**

Sobre la base de los 27 aislamientos obtenidos de las cinco comunidades de Huanta y Luricocha, se seleccionaron e identificaron dos cultivos de *Phytophthora* sp. (A01, A02) encontrados en las comunidades de Pichiurará y Pachapunya respectivamente y uno de *Phytophthium* sp., correspondiente a la comunidad de Pachapunya, por sus características más representativas de ambos géneros (Redekar *et al.*, 2019).

Para identificar los géneros involucrados en los aislamientos seleccionados fue necesario contar con la presencia de estructuras vegetativas y reproductivas, lográndose observar estas estructuras 24 horas después de ser inducidos a la esporulación en solución salina conforme lo sugieren Islam *et al.*, (2004), Balci y Bienapfl (2013).

#### **a. *Phytophthora* sp. A01**

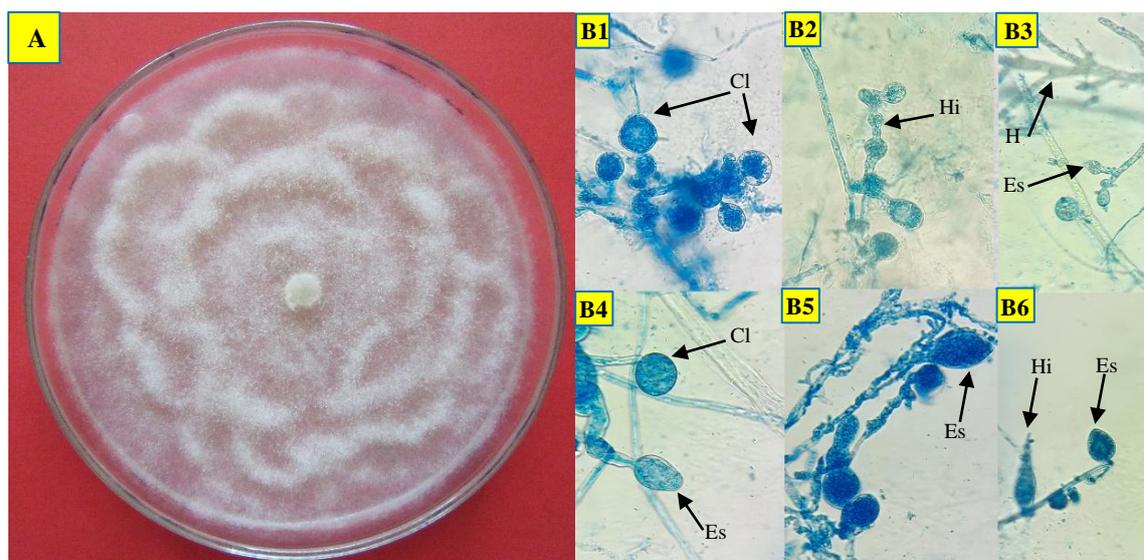
La forma de colonia de este aislamiento es arrosetada y de color blanco en medio de cultivo AHM. Microscópicamente su micelio es hialino sin septos, con hifas que soportan muchos hinchamientos globosos y de formas irregulares. Se observó una producción de clamidosporas globosas, agrupadas en racimos y solitarias, dispuestas en formas terminal e intercalar. Los esporangios presentan forma ovoide a elipsoide, no papilado, dispuestos en forma terminal y solitarios (Figura 3.1); estas descripciones coinciden con las características descritas por Drenth y Sendall (2001), Palmateer *et al.*, (2006), Coria (2009), Crone *et al.*, (2013), Calle (2017) y Oviedo (2018) para *Phytophthora cinnamomi*.



**Figura 3.1.** Características macroscópicas (A) y microscópicas (B) de *Phytophthora* sp. A01. Esporangios (Es), Hifas (H), Clamidospora (Cl)

**b. *Phytophthora* sp. A02**

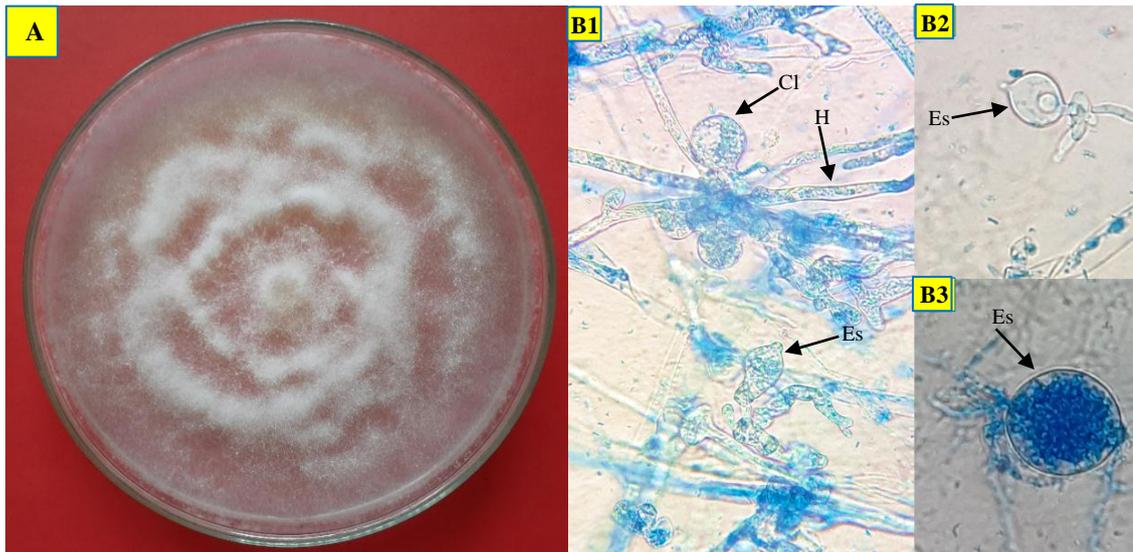
Este aislamiento presentó un patrón de crecimiento tipo roseta a camelia, algodonoso de color blanco en medio AHM (Figura 3.2); estructuralmente tiene micelio hialino, con hifas aseptadas y con muchos hinchamientos de formas irregulares. Exhibió abundante formación de clamidosporas terminales e intercalares con formas globosas, gran número de esporangios no papilados, ovalados a elipsoides de diferentes tamaños, características que coinciden por las descritas por Drenth y Sendall (2001), Palmateer *et al.*, (2006), Crone *et al.*, (2013), Calle (2017).



**Figura 3.2.** Características macroscópicas (A) y microscópicas (B) de *Phytophthora* sp. A02. Clamidospora (Cl), Hifa (H), Hinchamiento hifal (Hi), Esporangio (Es)

**c. *Phytopythium* sp.**

Este oomiceto mostró un patrón de crecimiento no definido en medio AHM, con micelio blanco, poco algodonoso aéreo. Microscópicamente, presentó micelio hialino aseptado, esporangios globosos con tubos de descarga, clamidosporas globosas dispuestas en forma terminal e intercalar (Figura 3.3). Este aislamiento se identificó como *Phytopythium* sp. (De Cock *et al.*, 2015; Oviedo, 2018; Redekar *et al.*, 2019).



**Figura 3.3.** Características macroscópicas (A) y microscópicas (B) de *Phytopythium* sp. Esporangio (Es), Clamidospora (Cl), Hifa (H)

**3.1.4. Prueba de patogenicidad**

El procedimiento se fundamentó en modificaciones efectuadas a las metodologías descritas por Hernández (2016) y Palmucci (2015), que permitió observar resultados comparativos, sobre todo síntomas en la parte aérea y necrosis en raíces de las plántulas de palto.

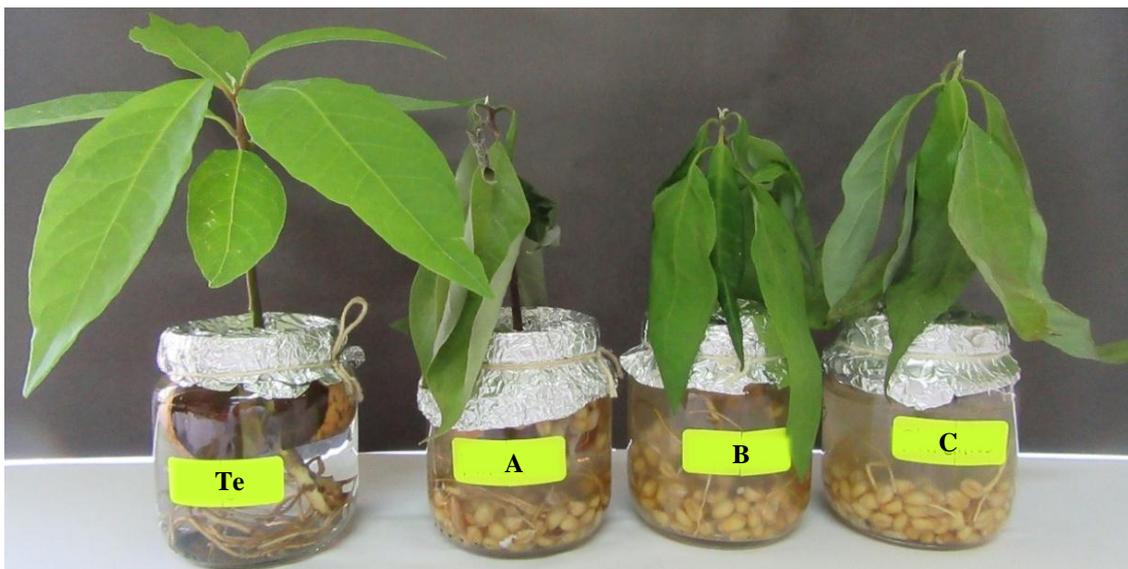
Conforme a lo establecido en la metodología de la investigación para la prueba de patogenicidad, después de 48 horas de haber realizado la inoculación con *Phytopythium* sp. (Figura 3.4.B), las plántulas de palto iniciaron a manifestar síntomas de marchitez foliar. Las plántulas inoculadas con *Phytophthora* sp. 01 (Figura 3.4.A) y *Phytophthora* sp.02 (Figura 3.4.C) también mostraron síntomas de decaimiento de las hojas adultas de las plántulas, que concluyó en marchitez total, a las 24 horas después de las plántulas con *Phytopythium* sp. En el sétimo día después de la inoculación, los tres patógenos

provocaron el síntoma característico de la tristeza y necrosis de raíces de las plántulas en las tres inoculaciones.

Al observar la sintomatología característica de la tristeza del palto, se efectuó el reaislamiento de los patógenos inoculados, confirmando que *Phytophthora* sp. A01, *Phytophthium* sp y *Phytophthora* sp. A02 son los causantes de la sintomatología en las plántulas evaluadas.

En cuanto a capacidad patogénica de los aislamientos, Oviedo (2018) logró sintomatologías semejantes al inocular *Phytophthora cinnamomi* y *Phytophthium vexans* en plantas de palto en vivero; Giorgi (1993) en ensayos de patogenicidad, determinó que cinco morfotipos de *Phytophthora cinnamomi* resultaron causantes de la tristeza del palto. Asimismo, la investigación realizada por Hernández (2016), con inoculación directa de agar licuado utilizando *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthium vexans* y *Pythium amazonianum* en medio líquido estéril, obtuvo resultados de patogenicidad similares a la presente investigación

Con los resultados de patogenicidad obtenidos, se tuvo la certeza de que los tres aislamientos seleccionados son patógenos notables y aseguró proseguir con la prueba de antagonismo con el hongo micorrízico arbuscular, *Glomus intraradices*.



**Figura 3.4.** Síntomas de marchitez causados por tres aislamientos de oomicetos patógenos a los siete días de la inoculación. Testigo (T), *Phytophthora* sp. A01 (A), *Phytophthium* sp. (B) y *Phytophthora* sp. A02 (C)

### **3.2. CAPACIDAD ANTAGÓNICA IN VITRO DE *Glomus intraradices* EN TRES AISLAMIENTOS DE OOMICETOS (*Phytophthora* y *Phytophthium*)**

Para fines operativos, la capacidad antagónica de *Glomus intraradices* se evaluó en dos condiciones de ambiente, a fin de conocer la respuesta y capacidad del hongo micorrízico ante los tres aislamientos. La primera en placas de Petri y la segunda en macetas con suelo.

La técnica de antagonismo *in vitro* empleando metabolitos de microorganismos, fue adaptada de estudios realizados con *Trichoderma* y *Clonostachys*, en diversos fitopatógenos (Bailey *et al.*, 2008; Márquez-Dávila *et al.*, 2010), con la finalidad de comprobar la acción microbiológica indirecta de *Glomus intraradices* a través de sus metabolitos aislados.

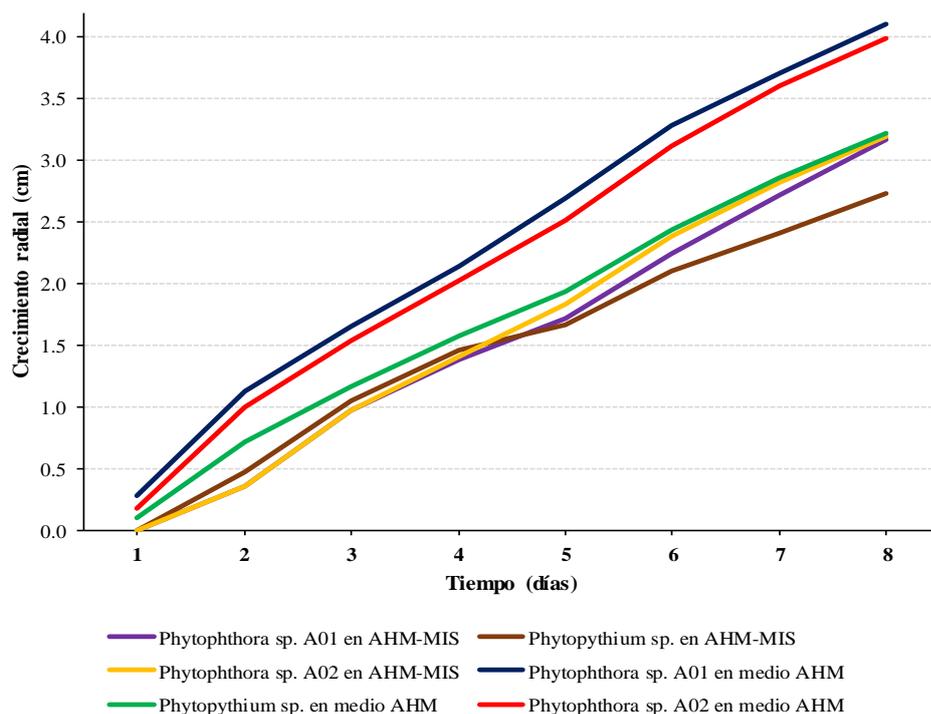
#### **3.2.1. Tendencia de crecimiento de tres oomicetos aislados, en medio de cultivo inhibitorio AHM con metabolitos de *Glomus intraradices***

La tendencia de crecimiento radial expresada por los oomicetos patógenos (*Phytophthora* sp. A01, *Phytophthium* sp, *Phytophthora* sp. A02) en medio AHM (agar harina de maíz) no inhibitorio (Figura 3.5) se manifestó de manera lineal con crecimiento rápido y ascendente desde el primer día de la evaluación. Los mismos patógenos en medio inhibitorio AHM-MIS (agar harina de maíz con metabolitos inhibitorios solubles) (Figura 3.5) tuvieron un crecimiento lento y ascendente a partir del segundo día de la evaluación, con la misma tendencia, logrando menores crecimientos radiales a los ocho días, resultados que se atribuyen a la acción inhibidora de los metabolitos de *Glomus intraradices*. Durante este periodo los tratamientos testigo (sin MIS) cubrieron con micelio gran parte de la superficie de las placas de Petri.

La efectividad del género *Glomus* como antagonista ha sido comprobada en diversas pruebas, solo como micorriza o en combinaciones con otros antagonistas (Mustafa *et al.*, 2017; Trinidad-Cruz *et al.*, 2017), en las cuales se evidencian ciertos grados de protección del hospedante susceptible ante patógenos comprobados (*Fusarium oxysporum*, *Blumeria graminis*, *Armillaria mellea*, *Phytophthora parasítica*, *Ganoderma boninense*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Melodogine* sp.) (Castillo *et al.*, 2019; Nogales, 2009; Codier *et al.*, 1998; Sundram *et al.*, 2014; Fiorilli *et al.*, 2011; Doley *et al.*, 2015; Cristóbal *et al.*, 2010).

Se considera que la poca o baja afectividad de inhibición del crecimiento radial de los oomicetos patógenos durante la prueba *in vitro* (15 a 22%), puede deberse a que la micorriza no tiene especificidad como antagonista, porque no ejerce una presión directa sobre estos patógenos, sino a través de sustancias que impiden la actividad fisiológica de los oomicetos. Por ello, la inclusión de los metabolitos ha demostrado inhibición del crecimiento sin la presencia estructural de la micorriza.

Las condiciones de trabajo *in vitro* permitieron determinar que el crecimiento de los oomicetos evaluados, con y sin inhibición tienen una tendencia lineal en todos los casos, puesto que los microorganismos no encontraron alguna interferencia, aparte de los metabolitos, que perturbe la continuidad del crecimiento (Figura 3.5). Esta situación de acción de los metabolitos sin perturbación externa, probablemente sea diferente cuando las interacciones entre hospedante y parásito ocurran en el suelo.



**Figura 3.5.** Tendencia de crecimiento radial de las colonias de oomicetos en medios no inhibitorio AHM y medio inhibitorio AHM-MIS

La comprobación matemática de las tendencias, reveló que el crecimiento de los patógenos con y sin tratamiento expresan ecuaciones lineales (Tabla 3.1) hasta que los testigos cubrieron las superficies del medio, lo cual comprueba la no interferencia para el crecimiento. Aun cuando los oomicetos crecieron con inhibición, las tendencias no

variaron para indicar que los metabolitos de *Glomus intraradices* participaron solo como inhibidores lineales de crecimiento.

El efecto inhibitorio de los metabolitos de *Glomus intraradices* en los patógenos fue persistente a lo largo del periodo de crecimiento, lo cual se demuestra con las tendencias lineales, registrándose que *Phytophythium* sp. fue el que más toleró a los metabolitos inhibidores.

El crecimiento de los oomicetos patógenos *in vitro* expresa una tendencia lineal; sin embargo, es probable que en condiciones naturales (suelo-raíz) la influencia de los metabolitos no tenga esa tendencia, por diversos factores ambientales y biológicos que se presentan en el suelo, más por el contrario deberán existir modificaciones importantes en las relaciones bioquímicas entre las raíces del palto y los metabolitos que regulan el comportamiento de los oomicetos ante tales sustancias.

**Tabla 3.1.** Ecuaciones de regresión simple entre el crecimiento radial (Y) y el tiempo de crecimiento (X)

Tratamiento	Ecuación (y = mx +b)
T1: <i>Glomus intraradices</i> (MIS*) + <i>Phytophthora</i> sp. A01	y = 0.4535x - 0.4667
T2: <i>Glomus intraradices</i> (MIS*) + <i>Phytophythium</i> sp.	y = 0.3830x - 0.2330
T3: <i>Glomus intraradices</i> (MIS*) + <i>Phytophthora</i> sp. A02	y = 0.4678x - 0.4789
T4: Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A01	y = 0.5374x - 0.0443
T5: Testigo <i>Phytophythium</i> sp.	y = 0.4381x - 0.2173
T6: Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A02	y = 0.5340x - 0.1563

MIS\*: Metabolitos inhibitorios solubles

La tabla 3.1 muestra que, en los tres aislamientos, la presencia de los metabolitos de *Glomus intraradices* en el medio de cultivo (T1, T2, T3) ejerció una presión inicial negativa de crecimiento en el radio de la colonia, que se confirma por los valores negativos de la constante 'b'. Se plantea que existe tal presión de los metabolitos porque en los aislamientos que crecieron en medio no inhibitorios (T4, T5, T6) se registraron valores de la constante 'b' negativos muy próximos a cero, es decir estos aislamientos crecieron normalmente sin la presión de los metabolitos. Por ello, la presión supresora de los metabolitos causó, además, que el crecimiento radial en los tres aislamientos sea lento.

A pesar de esta inhibición inicial, *Phytophthora* sp. A01 (T1) y *Phytophthora* sp. A02 (T3) crecieron mejor y más rápido que *Phytophythium* sp. (T2); sin embargo, *Phytophythium* sp. (T2) fue menos afectado inicialmente ( $b = - 0.2330$ ) pero creció en menor proporción en relación a los dos *Phytophthora* (T1, T3).

Estos resultados revelan que parece existir un efecto diferencial de los metabolitos de *Glomus intraradices* en el crecimiento radial de la colonia, de acuerdo a los géneros y aislamientos de oomicetos.

### 3.2.2. Media de crecimiento radial logrado

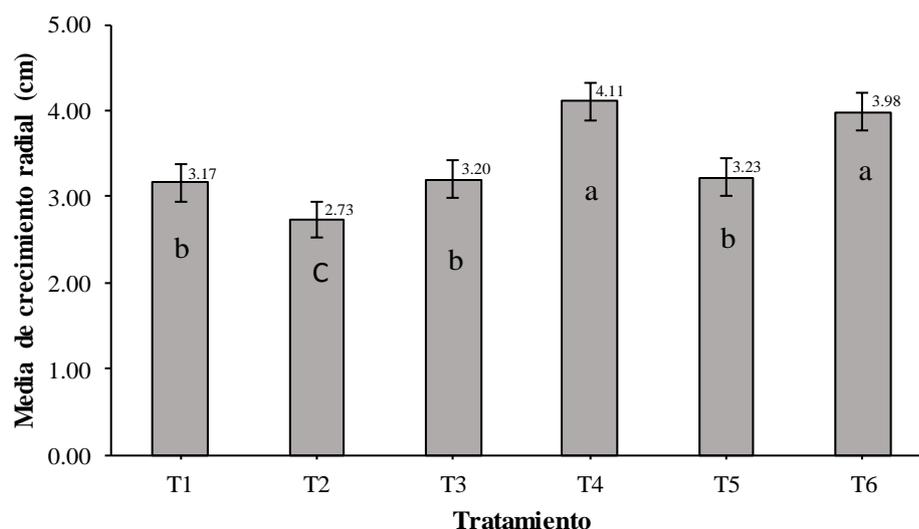
Luego del análisis de tendencia, al final del periodo de evaluación (ocho días), se registró crecimientos diferenciados entre el medio inhibitorio y los testigos, observándose influencias importantes de los metabolitos en las respuestas de crecimiento de los tres aislamientos (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Crecimiento radial logrado a los ocho días de evaluación *in vitro* por los tres oomicetos en medio no inhibitorio AHM y medio inhibitorio AHM-MIS

Tratamiento	Media de crecimiento (cm)
T1: <i>Glomus intraradices</i> (MIS*) + <i>Phytophthora</i> sp. A01	3.17
T2: <i>Glomus intraradices</i> (MIS*) + <i>Phytopyhtium</i> sp.	2.73
T3: <i>Glomus intraradices</i> (MIS*) + <i>Phytophthora</i> sp. A02	3.20
T4: Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A01	4.11
T5: Testigo <i>Phytopyhtium</i> sp.	3.23
T6: Testigo <i>Phytophthora</i> sp. A02	3.98

MIS\*: Metabolitos inhibitorios solubles

Con la finalidad de contrastar diferencias significativas entre las medias de crecimiento radial logrado por los oomicetos (Tabla 3.2), se realizó el análisis de varianza (Anexo 3) y la prueba de significación de Duncan (0.05), obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 3.8.



**Figura 3.6.** Prueba de Duncan (0.05) para el crecimiento radial logrado por los oomicetos en medio AHM y medio AHM-MIS

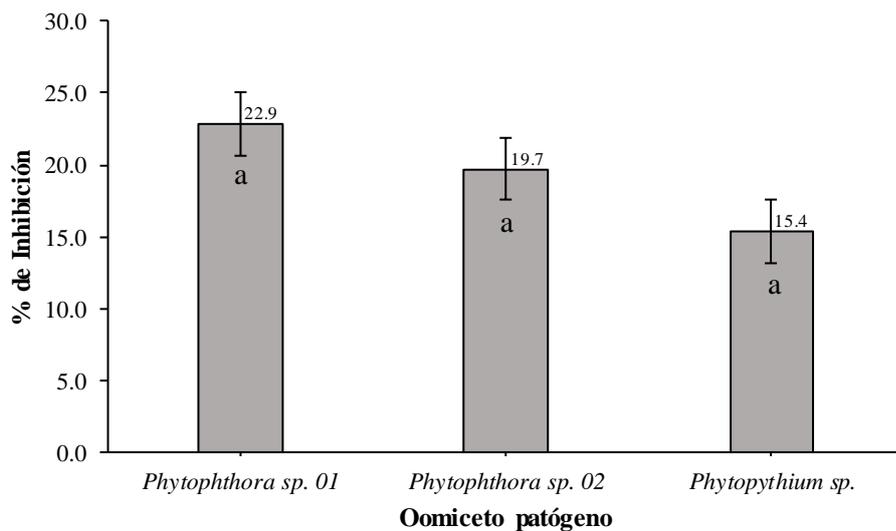
La comparación entre las medias de crecimiento radial logrado por los tres oomicetos patógenos; evidenció diferencias significativas entre el efecto de los metabolitos (T1, T2, T3) y la ausencia de ellos en los medios de cultivo (T4, T5, T6).

La figura 3.6 muestra que los testigos *Phytophthora* sp. A01 (T4), *Phytophthium* sp. (T5) y *Phytophthora* sp. A02 (T6) (medio no inhibitorio) presentaron mayor crecimiento radial logrado con 4.11 cm, 3.23 cm y 3.98 cm respectivamente, superiores significativamente (Figura 3.6) respecto a los tratamientos con medio inhibitorio (T1, T2, T3), en los que presentaron 3.17 cm, 2.73 cm y 3.20 cm de crecimiento radial.

El crecimiento radial logrado por los tres oomicetos patógenos en medio inhibitorio (T1, T2, T3), con valores inferiores en relación al medio no inhibitorio (T4, T5, T6), muestra una prueba del efecto negativo que pueden ejercer los metabolitos de *Glomus intraradices* en el crecimiento micelial.

### 3.2.3. Porcentaje de inhibición

Al comparar los promedios de crecimiento radial logrado por *Phytophthora* sp. A01, *Phytophthora* sp. A02 y *Phytophthium* sp. en medio inhibitorio AHM-MIS como en medio no inhibitorio AHM, permitió cuantificar en términos porcentuales la inhibición de crecimiento radial *in vitro* ejercido por los metabolitos de *Glomus intraradices* en los tres oomicetos patógenos.



**Figura 3.7.** Prueba de Duncan para el porcentaje de inhibición ejercida por los metabolitos inhibitorios solubles de *Glomus intraradices* en oomicetos patógenos (*Phytopythium sp.*, *Phytophthora sp.* A01 y A02)

En la figura 3.7 se representa las influencias porcentuales calculadas, que a exigencias de la prueba de Duncan no son diferentes estadísticamente. Los valores de inhibición (22.9% en *Phytophthora sp.* A01, 19.7% en *Phytophthora sp.* A02 y 15.4% en *Phytopythium sp.*) ejercidos por los metabolitos de *Glomus intraradices*, revelan la influencia antagónica principalmente en ambos *Phytophthora* y en menor proporción en *Phytopythium sp.*

En la figura 3.8, se muestran las evidencias fotográficas del crecimiento de las colonias de los tres aislamientos en medio inhibitorio y no inhibitorio, situación que también debe expresarse en condiciones de suelo, puesto que los microorganismos antagónicos tienen como acción principal reducir las poblaciones de patógenos y el aumento de su masa estructural.

Sobre la base de las fotografías podemos indicar que la presencia de los metabolitos ocasionó algunos cambios en la estructura de la colonia; el aspecto de la colonia con metabolitos varió en relación a las colonias testigo. En medio no inhibitorio las colonias resultaron ligeramente más algodonosas que, en medio inhibitorio, como primer efecto significativo de los metabolitos.

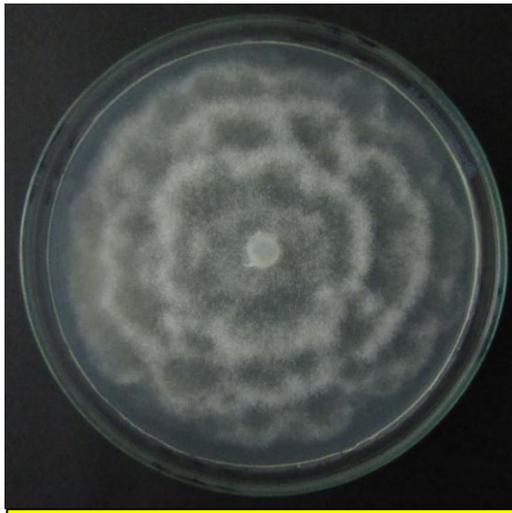
El segundo efecto se muestra en el tamaño de la colonia. En los tres aislamientos, las colonias de menor tamaño reflejan que los metabolitos influyen en la reproducción de los oomicetos, al mismo tiempo que éstos no alteran la forma estructural de la colonia que caracteriza a los géneros.

En razón a que las colonias crecen con y sin metabolitos, es probable que la influencia de estas sustancias solo sea temporal al haber sido liberados por el antagonista al medio de cultivo o natural y que su efecto puede ser persistente durante un periodo de tiempo, pero no son acumulativos, de modo que la reproducción asexual del parásito no se vería muy afectada, sino solamente en el aumento de la masa micelial.

Por ello, se plantea que la acción de los metabolitos tiene un efecto de perturbación brusca inicial en el parásito, que le provoca interferencia en su crecimiento micelial y que posteriormente podría ser capaz de reponerse al diluirse los metabolitos, excepto que *Glomus intraradices* continúe produciendo los metabolitos de manera constante en las raíces vivas e impida subsecuentes colonizaciones radiculares, lo cual podría resultar en una excelente forma de supresión de los patógenos.

Al respecto, la capacidad antagónica de *Glomus* ha sido demostrada en investigaciones relacionadas a la supresión de fitopatógenos. Orihuela (2017) determinó valores de 41.92% a 48.38% de inhibición de *Fusarium oxysporum* con tres especies de *Glomus*; Así mismo, otros autores demostraron la inhibición del crecimiento micelial de oomicetos patógenos utilizando diferentes microorganismos, Márquez-Dávila *et al.*, (2010) encontraron que metabolitos de *Clonostachys* sp. inhibió en 26.68% a *Phytophthora palmivora*, del mismo modo Bae *et al.*, (2010) revelaron que metabolitos de *Trichoderma* ejercieron inhibición significativa en especies de *Phytophthora*.

Referente a investigaciones de crecimiento dual entre oomicetos y antagonista, diversos autores como Mamani (2017), Liu *et al.*, (2019) y El-Sayed *et al.*, (2019) encontraron inhibición de 23% a más en especies de *Phytophthora* (*cinnamomi*, *sojae* y parasítica) con *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Aspergillus flavipes* respectivamente.



*Phytophthora* sp. A01 en medio AHM



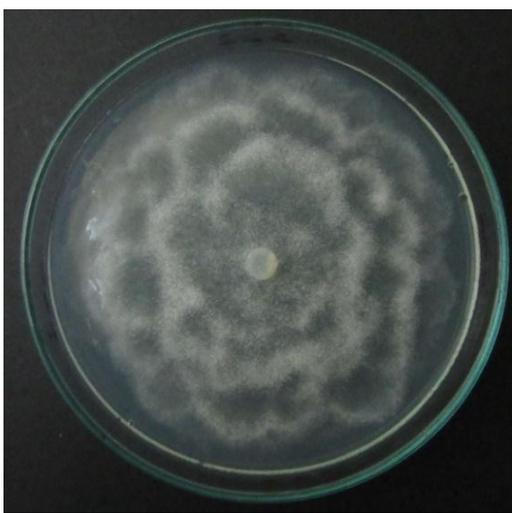
*Phytophthora* sp. A01 en medio AHM-MIS



*Phytophthium* sp. en medio AHM



*Phytophthium* sp. en medio AHM-MIS



*Phytophthora* sp. A02 en medio AHM



*Phytophthora* sp. A02 en medio AHM-MIS

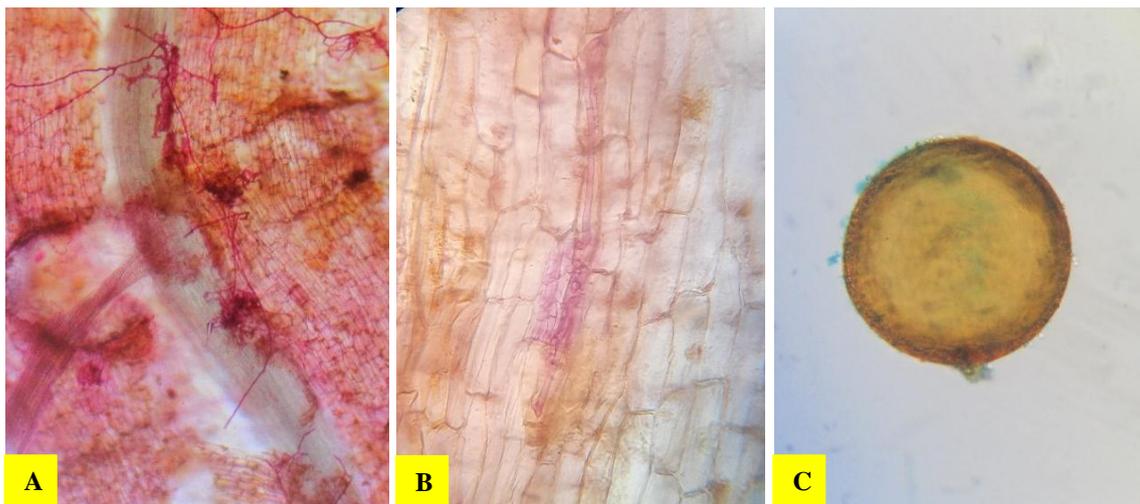
**Figura 3.8.** Evidencia gráfica de la acción inhibitoria de los metabolitos de *Glomus intraradices* en el crecimiento radial de tres aislamientos de oomicetos

### 3.3. ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Glomus intraradices* EN OOMICETOS (*Phytophthora* y *Phytophthium*) EN MACETAS

#### 3.3.1. Colonización de raíces por *Glomus intraradices*

A los 150 días de haber sido inoculado *Glomus intraradices* en raíces de las plántulas de palto, se observó la presencia de hifas ramificadas extra e intra radicular y arbuscúlos (Figura 3.9), como señal de una buena simbiosis. La micorrización por *Glomus intraradices* se calculó en términos de porcentaje de raíz colonizada, con un valor promedio de 71.01% de colonización.

La micorrización también fue observada por Huanca (2016), Hernández (2001), Aravena (2002) y Montañez (2009) en plántulas de palto inoculados con *Glomus intraradices*, en condiciones de invernadero y vivero, con establecimiento exitoso del hongo en las raíces del hospedante.

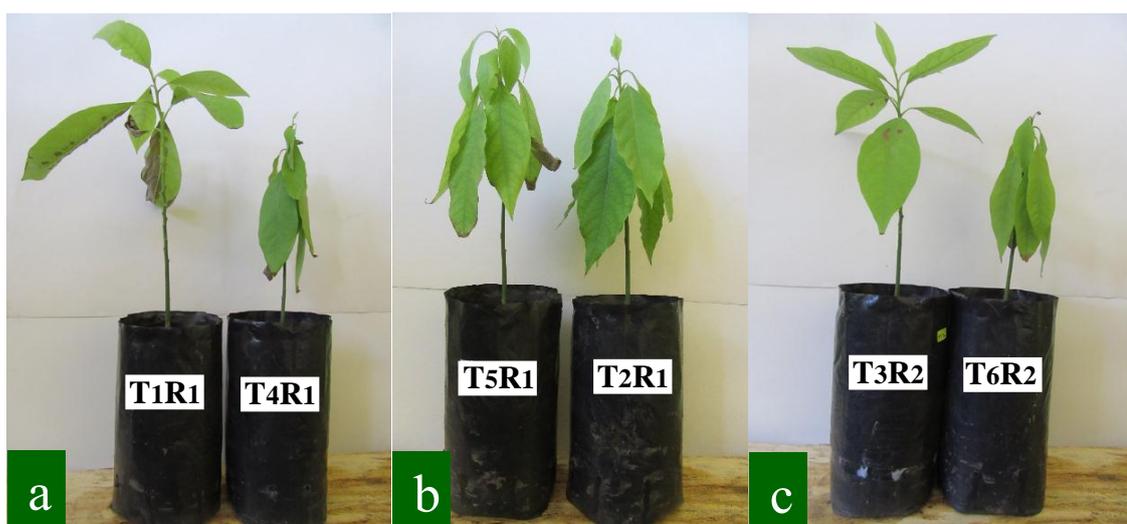


**Figura 3.9.** Estructuras formadas de *Glomus intraradices* en raíces y rizósfera de palto luego de la colonización. Hifas (A), arbuscúlo (B) y espora (C)

Se comprobó que *Glomus intraradices* tiene capacidad para ingresar, colonizar y establecerse en los tejidos radiculares del palto, además de que el palto lo acepta sin un rechazo inmediato. Por ello esta asociación constituye una posibilidad más para proponer una alternativa de regulación biológica de la población de los patógenos oomicetos en las raíces, como procedimiento técnico para la prevención y tratamiento de la tristeza del palto.

### 3.3.2. Sintomatología foliar y radicular desarrolladas por oomicetos en plántulas de palto variedad Topa Topa

La figura 3.10 muestra síntomas de decaimiento de todo el follaje en plántulas inoculadas con oomicetos (T4, T5, T6) a diferencia de las que mantenían una inoculación dual (oomiceto + *Glomus intraradices*) (T1, T2, T3) que mostraron las hojas firmes hasta el día de evaluación, a excepción de T2 que mostró también decaimiento foliar.



**Figura 3.10.** Síntomas de marchitez foliar generados por oomicetos en plántulas de palto. T1: *G. intraradices* + *Phytophthora* sp. A01, T4: Testigo *Phytophthora* sp. A01 (a); T2: *G. intraradices* + *Phytophthium* sp., T5: Testigo *Phytophthium* sp. (b); T3: *G. intraradices* + *Phytophthora* sp. A02, T6: Testigo *Phytophthora* sp. A02 (c)

La figura 3.10 muestra síntomas de decaimiento de todo el follaje en plántulas inoculadas con oomicetos (T4, T5, T6) a diferencia de las que mantenían una inoculación dual (oomiceto + *Glomus intraradices*) (T1, T2, T3) que mostraron las hojas firmes hasta el día de evaluación, a excepción de T2 que mostró también decaimiento foliar.

#### a. Incidencia patogénica radicular (I)

A partir de la metodología establecida para cuantificación de la incidencia de raíces enfermas, se observó que los tres oomicetos seleccionados afectaron a todas las plántulas experimentales en 100%, causando síntomas de necrosis en las raíces (Figura 3.11), que es la característica principal de la influencia patológica de estos tres

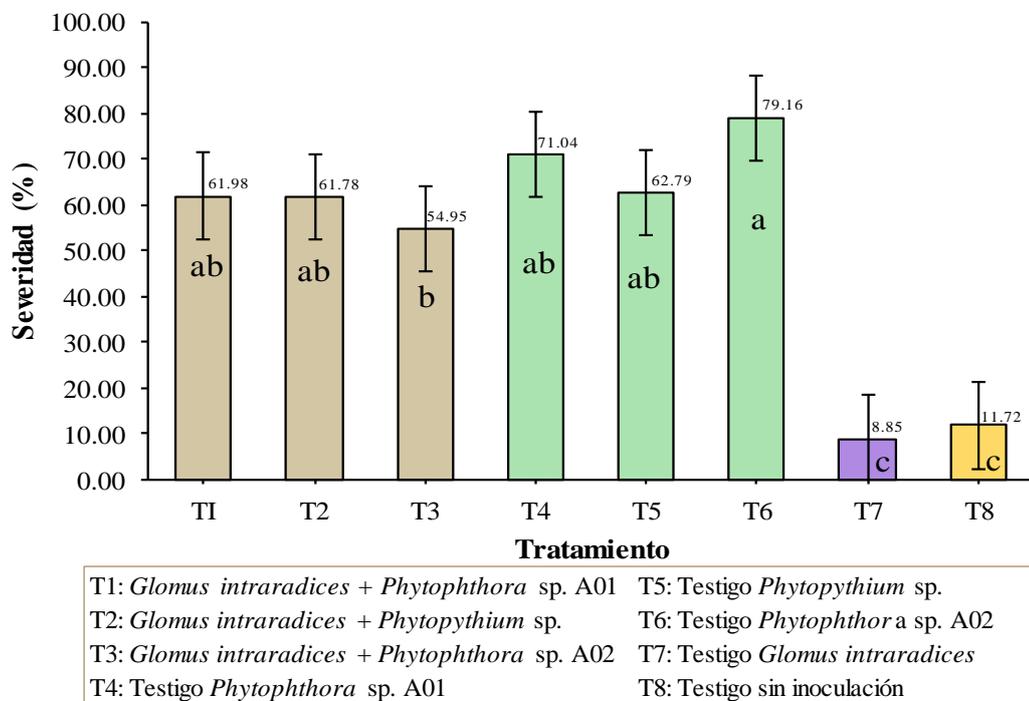
oomicetos (Hernández, 2016; Calle, 2017; Oviedo, 2018). En los tratamientos siete y ocho se observaron síntomas de necrosis en menor proporción y no característicos de los oomicetos, debido a que no presentaron descortezamiento en las raicillas con daños, por lo cual se infiere que los daños de necrosis fueron ocasionados por otras influencias como suelo o microorganismos distintos a los oomicetos evaluados.



**Figura 3.11.** Síntomas de necrosis en raíces de palto inoculados con tres oomicetos. *G. intraradices* + *Phytophthora* sp. A01 (T1), *G. intraradices* + *Phytophythium* sp (T2), *G. intraradices* + *Phytophthora* sp. A02 (T3), Testigo *Phytophthora* sp. A01 (T4), Testigo *Phytophythium* sp. (T5), Testigo *Phytophthora* sp. A02 (T6)

### b. Severidad patogénica radicular (S)

La evaluación de daños en raíces de las plántulas evaluadas se realizó cuando más del 50% de las plántulas presentaron marchitez, a los 84 días después de la inoculación. Se cuantificó el daño de raíces (necrosis) en términos de porcentaje de severidad, sobre la base de una ecuación propuesta en la investigación (contribución del autor). Con los valores de severidad se analizaron estadísticamente (Anexo 5), obteniéndose significación entre los promedios de severidad radicular de las plántulas inoculadas con *Glomus intraradices* más los oomicetos patógenos y las plántulas experimentales complementarias (T7 y T8). Luego se compararon estos promedios a través de la prueba significación de Duncan (Figura 3.12).



**Figura 3.12.** Prueba de Duncan para el porcentaje de raíces enfermas de plántulas de palto inoculadas con tres oomicetos patógenos

Según la prueba de Duncan (Figura 3.12), se determinó diferencias estadísticas significativas en la cantidad de daños en raíces. Las plántulas inoculadas solo con *Phytophthora* sp. A02 (T6) tuvieron severidad patogénica radicular con diferencia significativa en relación a las plántulas con *Glomus intraradices* + *Phytophthora* sp. A02 (T3). Las severidades radiculares ocasionadas en plántulas por *Phytophthora* sp. A01 (T4) y *Phytophthora* sp. (T5) no difieren estadísticamente en relación a las plántulas inoculadas en forma dual (oomiceto + *Glomus intraradices*) (T1, T2).

En las plántulas inoculadas dualmente (*Glomus intraradices* + oomicetos) (T1, T2, T3) no se determinó diferencias estadísticas de severidad de daños entre las combinaciones, pero se muestran evidencias que la presencia de *Glomus intraradices* en las raíces reduce significativamente los daños de los dos *Phytophthora* (T1, T3 vs T4, T6), excepto *Phytophthora* sp. (T2 vs T5), y que en ausencia de oomicetos las plántulas no se infectan y desarrollan buenas raíces, excepto por algún otro patógeno secundario que invade las raicillas (T7); algo semejante ocurrió en las plántulas que no se inocularon ningún microorganismo (T8).

De los resultados experimentales se extrae que *Glomus intraradices* confirió protección significativa a las plántulas de palto solo ante *Phytophthora* sp. A01 y *Phytophthora* sp. A02, con reducciones de 9.06% y 24.21% en la severidad, para ambos oomicetos, en relación a los testigos. Respecto a las infecciones de *Phytophthora* sp., *Glomus intraradices* no expresó efecto protector significativo en las raíces ante las infecciones por este oomiceto, al haberse disminuido escasamente los daños en una proporción de 1.01% (Tabla 3.3).

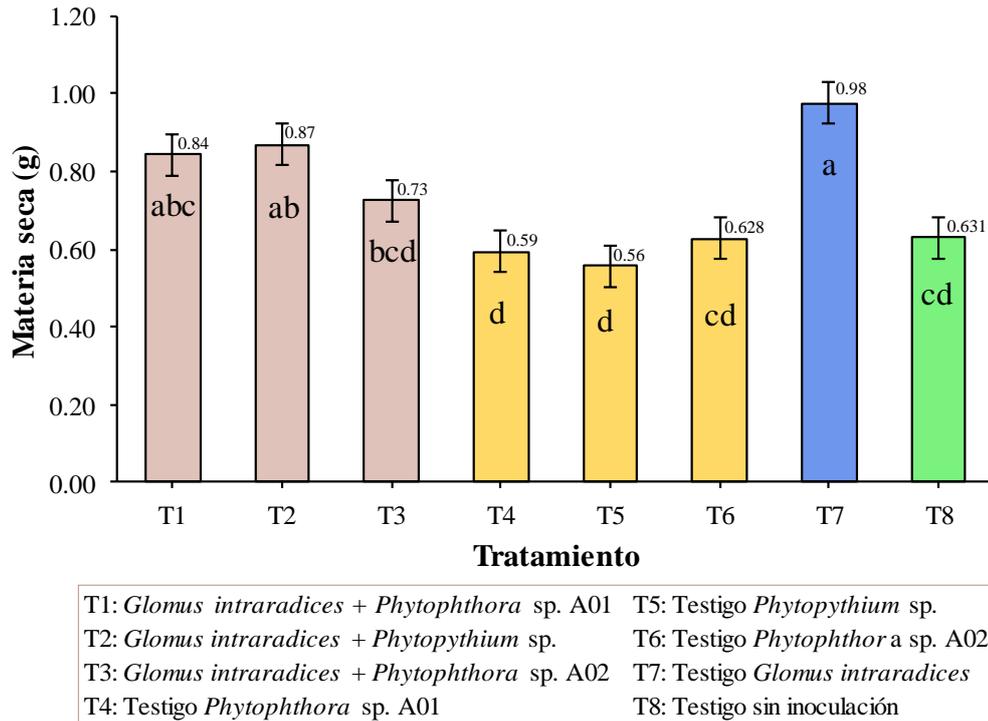
**Tabla 3.3.** Reducción porcentual de infección radicular por presencia de *Glomus intraradices* en plántulas inoculadas con tres oomicetos patógenos.

Patógeno inhibido	Protección ejercida por <i>Glomus intraradices</i>
<i>Phytophthora</i> sp. A01	9.06%
<i>Phytophthora</i> sp. A02	24.21%
<i>Phytophthora</i> sp.	1.01%

En investigaciones semejantes, los autores utilizaron especies diversas de micorrizas en otros patógenos radiculares (Trinidad-Cruz *et al.*, 2017; Mustafa *et al.*, 2017; Cordier *et al.*, 1998; Sundram *et al.*, 2014; Fiorilli *et al.*, 2011; Doley *et al.*, 2015; Cristóbal *et al.*, 2010) y determinaron que en todas las combinaciones patógeno-hospedante se produce disminución de daños y severidad, cuando están presentes las micorrizas en las raíces. Estos resultados contribuyen a consolidar nuestra información como hechos frecuentes en las relaciones antagónicas que se establecen entre los patógenos radiculares (*Fusarium oxysporum*, *Armillaria mellea*, *Sclerotium rolfsii*, *Ganoderma boninense*, *Phytophthora parasítica*) y sus hospedantes.

### 3.3.3. Materia seca radicular

En el experimento se determinó y se comprueba que la micorrización con *Glomus intraradices* incrementa la masa radicular en las plántulas (Montañez, 2009; Huanca, 2016) de manera significativa. Esta respuesta fue modificada por las infecciones de los tres oomicetos también de manera significativa, lo cual se observa cuando los patógenos se encuentran solos afectando las raíces (T4, T5, T6) (Figura 3.13)



**Figura 3.13.** Prueba de Duncan para la materia seca radicular de plántulas de palto inoculados con tres oomicetos patógenos

En la figura 3.13 se determinó que la actividad de *Glomus intraradices* en las raíces favorece la formación de materia seca de manera altamente significativa, en relación a las plántulas sin micorriza (T7 vs T4, T5, T6, T8). La materia seca radicular en las plántulas inoculadas con *Glomus intraradices* + oomiceto (T1, T2) difieren estadísticamente en comparación a las plántulas con *Phytophthora* sp. A01 y *Phytophthora* sp. (T4, T5); mientras, que las plántulas inoculadas con *Glomus intraradices* más *Phytophthora* sp. A02 (T3) no difieren estadísticamente respecto a las plántulas solo con *Phytophthora* sp. A02 (T6).

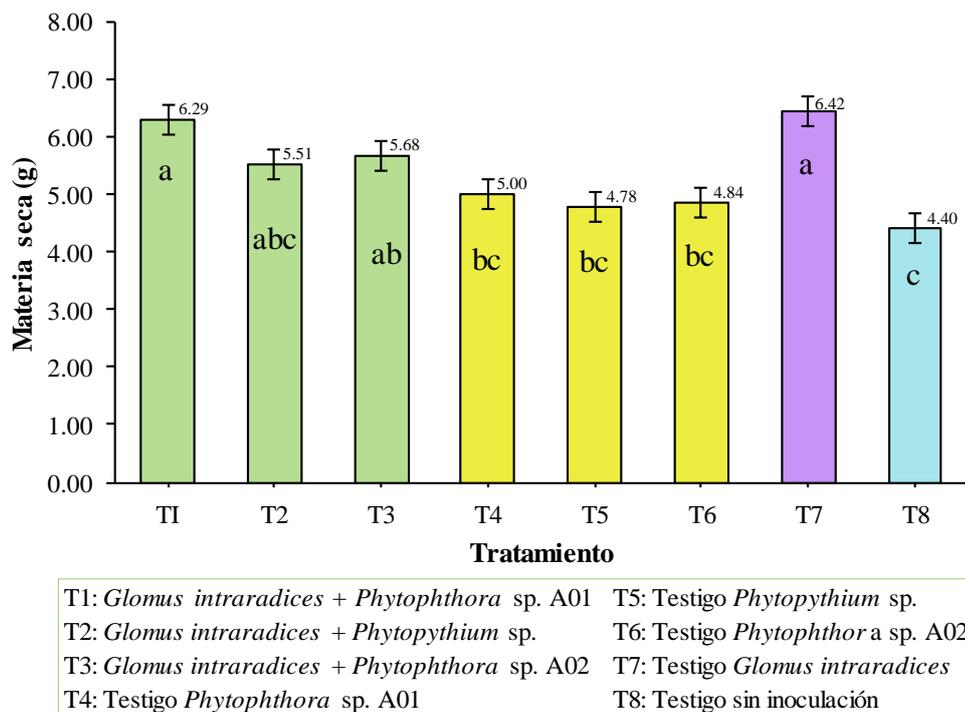
En las plántulas sin micorrizas (T4, T5, T6) ni oomicetos (T8), el crecimiento radicular se expresó de manera semejante a lo que ocurre en condiciones naturales, observándose

que la cantidad de su materia seca es similar a las plántulas infectadas por oomicetos (Figura 3.13).

Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Huanca (2016) que encontró mayor valor de materia seca de raíces en paltos inoculados con *Glomus intraradices* ante testigos sin inoculación y por Mamani (2017) que obtuvo menor peso seco de raíces en plántulas de palto inoculados con *Phytophthora cinnamomi* frente a paltos inoculados con *Pseudomonas* sp.

### 3.3.4. Materia seca de la parte aérea

La materia seca foliar en los tratamientos evaluados muestra valores similares a los que se encontraron en las raíces.



**Figura 3.14.** Prueba de Duncan para la materia seca aérea de plántulas de palto inoculados con tres oomicetos patógenos

La prueba de Duncan (Figura 3.14) indica que existe diferencias estadísticas significativas entre los promedios de materia seca foliar por tratamientos y testigos. Las cantidades de materia seca aérea en las plántulas con *Glomus intraradices* más *Phytophthora* sp. A01 (T1) difieren significativamente respecto a las plántulas con *Phytophthora* sp. A01 (T4). En las plántulas inoculadas en forma dual (T2, T3) se

encontró que no difieren estadísticamente en relación a las plántulas con *Phytophthora* sp. y *Phytophthora* sp. A02 y (T5, T6).

Las plántulas inoculadas con *Glomus intraradices* (solas o en combinación con un oomiceto patógeno) (T1, T2, T3, T7) muestran mayores pesos de materia seca en relación a las plántulas inoculadas solo con patógenos (T4, T5, T6), debido seguramente a la influencia positiva que tiene *Glomus intraradices* de conferir mayor extensión de raíces y por lo tanto mayor absorción de nutrientes, el cual se refleja en un incremento de la masa aérea (Kamel *et al.*, 2016).

Los tratamientos T1, T2 y T3 (oomiceto + *Glomus intraradices*), así como se indica que tienen mayores valores en peso seco de masa aérea, presentan valores ligeramente inferiores al testigo con *Glomus intraradices* (T7), probablemente a la influencia negativa que tuvieron los oomicetos patógenos al dañar las raíces de absorción de nutrientes.

El testigo sin inoculación (T8) muestra el menor valor de peso seco, pero que no difiere estadísticamente de los testigos con patógenos (T4, T5, T6). Las pequeñas diferencias que existe entre ellos posiblemente se deban a que, cuando el patógeno realiza su trabajo de establecimiento en el hospedante, la planta a manera de respuesta al ingreso del oomiceto genera nuevas raíces para compensar a las ya dañadas (Andrade-Hoyos *et al.*, 2015).

Estas determinaciones de materia seca fueron evaluadas por Villavicencio (2018) y Mamani (2017), quienes diferenciaron entre plántulas de palto inoculados con *Phytophthora cinnamomi* y plántulas inoculadas con *Pseudomonas* sp., encontrando los menores valores de peso seco aéreo en plántulas inoculadas con el oomiceto.

### **3.4. RELACIONES PATOLÓGICAS ENTRE LA PRUEBA IN VITRO Y EN MACETAS**

Cuando se probaron los metabolitos *in vitro*, se evidenció la influencia antagónica de los metabolitos en el crecimiento de las colonias, principalmente en los *Phytophthora* y en menor proporción en *Phytophthora* sp, es decir los metabolitos influyeron con algo de selectividad. Al no existir acción de los patógenos en tejidos radiculares, la prueba

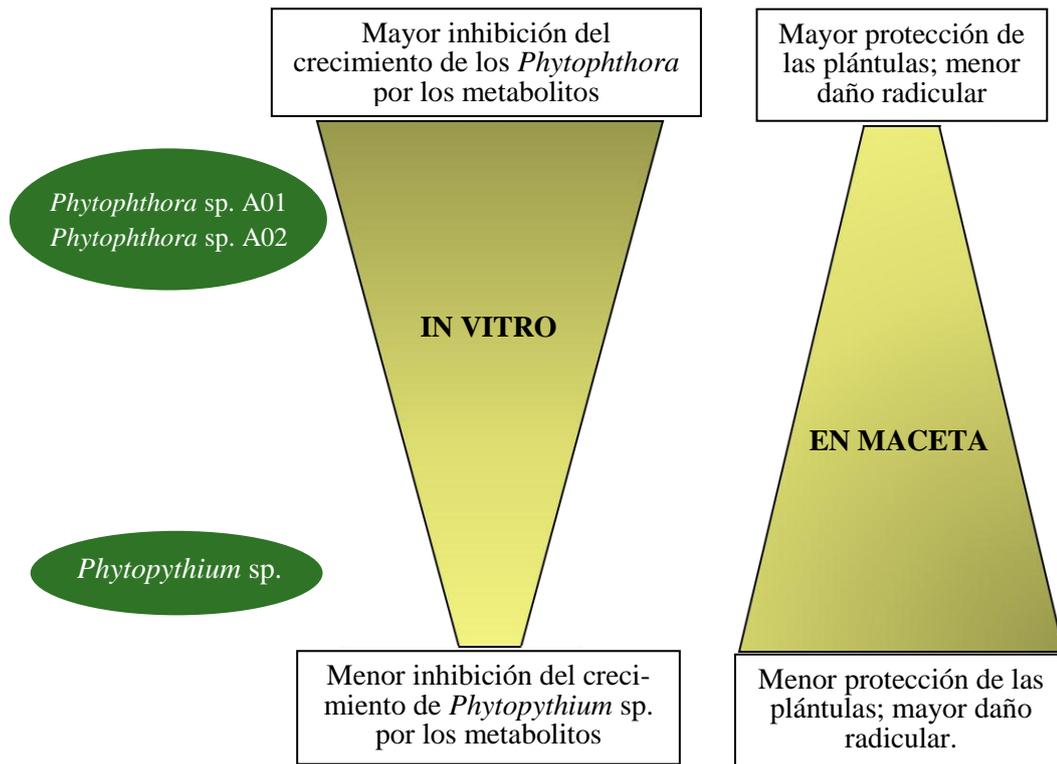
fue la antesala a la actividad que realizarían los patógenos en macetas sobre los tejidos de las raicillas, en presencia física de *Glomus intraradices* y sus metabolitos.

En la prueba en macetas, las raíces representaron los medios de cultivo donde se depositarían los metabolitos, además de que ahora está presente el generador de tales sustancias. Esta vez no se observaría el efecto sobre el crecimiento de los oomicetos, sino su capacidad de causar infecciones y daños en presencia de los metabolitos.

Al parecer, en las macetas, la influencia de los metabolitos fue semejante a lo que ocurrió *in vitro* (Figura 3.15), es decir los metabolitos también actuaron sobre el crecimiento de los oomicetos y éstos realizaron menor actividad patogénica en los tejidos. De este modo, la presencia de *Glomus intraradices*, a pesar de que parecería pasiva, su actividad reproductiva permitió que se siguiera produciendo metabolitos como vía de antagonismo en los oomicetos. Por ello, en los resultados de severidad de daño se observó la misma tendencia de influencia de los metabolitos. Al haber sido más afectado los *Phytophthora* por los metabolitos *in vitro*, los cultivos de maceta tuvieron mayor protección ante las infecciones. Algo semejante ocurrió con *Phytophthium* sp., el cual es menos afectado *in vitro* por los metabolitos; por ello, en cultivos de maceta los metabolitos ejercieron menor protección ante las infecciones en raíces.

Estas relaciones comprueban que los metabolitos tuvieron igual comportamiento antagonico sobre los oomicetos *in vitro* afectando el crecimiento y en cultivos de maceta protegiendo las raíces.

Diferentes autores como Jaizme-Vega y Rodríguez-Romero (2006), Fiorilli *et al.*, (2011), Mustafa *et al.*, (2016) indican que los hongos micorrízicos no afectan directamente a los patógenos radiculares, es decir no confiere protección directa al hospedante, no es un antagonista depredador; sino brinda protección indirecta a través de una resistencia inducida por la simbiosis realizada con las raíces, generando un incremento de lignificación de la endodermis induciendo a la producción de sustancias fenólicas.



**Figura 3.15.** Esquema de las relaciones patológicas entre las pruebas de antagonismo *in vitro* y en macetas

## CONCLUSIONES

1. Se aislaron 27 oomicetos de raicillas con necrosis y se seleccionaron e identificaron dos tipos de *Phytophthora* sp. (A01, A02) y un *Phytophthium* sp., en Luricocha, con capacidad patogénica para las pruebas de antagonismo.
2. Los metabolitos de *Glomus intraradices* inhibieron el crecimiento radial in vitro de *Phytophthora* sp. A01 (22.9%), *Phytophthora* sp. A02 (19.7%) y *Phytophthium* sp. (15.4%) sin diferencias estadísticas significativas entre ellos.
3. Se determinó 100% de incidencia de pudriciones radiculares por los tres oomicetos patógenos.
4. Las plántulas inoculadas en macetas con *Phytophthora* sp. A01, *Phytophthora* sp. A02 causaron severidad de daño radicular de 71.04% y 79.16%, respectivamente. *Phytophthium* sp. ocasionó 62.8% de severidad.
5. *Glomus intraradices* redujo significativamente los daños radiculares por *Phytophthora* sp. A01 en 9.06% y *Phytophthora* sp. A02 en 24.21%; en *Phytophthium* sp. solo redujo en 1.01%.
6. *Glomus intraradices* evitó la reducción de materia seca radicular y aérea en las plántulas inoculadas con los oomicetos.
7. *Glomus intraradices* tuvo un efecto antagónico significativo en ambos *Phytophthora* sp. (A01, A02) y no significativo en *Phytophthium* sp., en las pruebas in vitro y en macetas.

## **RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudios bioquímicos sobre los componentes de los metabolitos inhibitorios solubles de *Glomus intraradices*.
2. Evaluar el efecto antagónico de *Glomus intraradices* en combinación con otros microorganismos benéficos en el cultivo de palto.
3. Realizar estudios de antagonismo con hongos micorrízicos nativos de Ayacucho en fitopatógenos radiculares del palto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almaraz-Sánchez, A., Alvarado-Rosales, D., Leyva-Mir, G., Equihua-Martínez, A., Aranda-Ocampo, S. y Hernández-Morales, J. (2016). Pruebas de patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* Rands. en *Pseudotsuga mensiezii*. Revista Mexicana de Fitopatología, 34(2), 142–2157. doi: 10.18781/r.mex.fit.1509-2.
- Amórtegui, I., Capera, E. y Godoy, J.V. (2001). El cultivo del aguacate. Módulo educativo para el desarrollo tecnológico de la comunidad rural. 49p. Recuperado de <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4911/1/EI%20cultivo%20del%20aguacate.pdf>.
- Andrade-Hoyos, P., De León, C., Molina, E., Barquera, E., De la Cruz, M., Alvarado, D. y López, A. (2015). Totipotencialidad en plántulas de aguacate en la resistencia a *Phytophthora cinnamomi*. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 6(2), 361-373. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342015000200011](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015000200011).
- Andrade-Hoyos, P., Molina-Gayosso, E., Isidro-Cortes, J., Hernández, E., Cortés-González, Y.A. y Rivera-Sosa, L. (2017). Control biológico in vitro de *Phytophthora cinnamomi* con *Trichoderma* spp. Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate. México. 7p. Recuperado de [http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias\\_VCLA/2017/Memorias\\_VCLA\\_2017\\_PG\\_147.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_147.pdf).
- Aravena, C.M. (2002). Efecto de la micorrización en plantas de vivero de palto y cítricos bajo diferentes dosis de fertilización. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 102p. Recuperado de [http://www.avocadosource.com/papers/Chile\\_Papers\\_A-Z/G-H-I/HernandezClaudio2001.pdf](http://www.avocadosource.com/papers/Chile_Papers_A-Z/G-H-I/HernandezClaudio2001.pdf).
- Ataucusi, S. (2015). Manejo técnico del cultivo del palto. Programa. PRA Buenaventura. 41p. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/327943636/Manual-Palta-F-pdf>.
- Bae, S.J., Mohanta, T. K., Chung, J. Y., Ryu, M., Park, G., Shim, S., ... Bae, H. (2016). *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. Biological control, 92, 128–138. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.10.005.

- Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Crozier, J., Thomas, S.E., Samuels, G. J., ... Holmes, K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological control*, 46(1), 24–35. doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.01.003.
- Bala, K., Robideau, G.P., Lévesque, C.A., De Cock, A.W.A.M., Abad, Z.G., Lodhi, A.M., ... Coffey, M.D. (2010). *Phytopythium* Abad, De Cock, Bala, Robideau, Lodhi and Lévesque, gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad and Lévesque, sp. nov. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi*. 24, 136–137. doi:10.3767/003158510x512748.
- Balci, Y. y Bienapfl, J.C. (2013). *Phytophthora* in US forests. In: *Phytophthora: a Global Perspective*. Wallingford, UK: CABI, 135-145. Recuperado de <https://www.cabi.org/bookshop/book/9781780640938/>.
- Barrantes, F.N. (2019). La tristeza del palto (*Persea americana* Mill.) en Ayacucho. Monografía de investigación inter regional y sistematización de información. Grupo técnico Regional de Sanidad del Palto – GTRSP. Huamanga, Ayacucho. 65p.
- Beckerman, J. (2011). Disease management strategies for horticultural crops: *Pythium* Root rot of herbaceous plants. BP-181-W. 4p. Recuperado de <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/BP/BP-181-W.pdf>.
- Bernal, J., Díaz, C., Osorio, C., Tamayo, A., Osorio, W., Córdoba, O., ... Caicedo, A. M. (2013). Actualización tecnológica y buenas prácticas agrícolas (BPA) en el cultivo de aguacate. 208p. Recuperado de [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12616/68164\\_64855.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12616/68164_64855.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Bernal, J.A. y Díaz, C.A. (2008). Tecnología para el cultivo del aguacate. Generalidades del palto. Corporación colombiana de investigación agropecuaria. CORPOICA, (5), 242p. Recuperado de [file:///C:/Users/HP/Downloads/43103\\_50479%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/43103_50479%20(2).pdf).
- Cacciola, S.O., Duncan, J.M. y Magnano, G. (2004). Diagnostic protocols for regulated pests. *Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés PM 7/26 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34, 155–157. doi:10.1111/j.1365-2338.2004.00720.x.

- Cadenas, C. (2007). Anales científicos. Universidad Nacional Agraria La Molina. 68(1), 11–17 Recuperado de <https://es.scribd.com/document/246254425/Universidad-Agraria-de-La-Molina>
- Calle, C. (2017). Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* obtenidos de huertos de aguacate del departamento de Antioquia, Colombia. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 94p. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/57762/>.
- Carreón, Y., Gómez, N. y Martínez, M. (2008). Las micorrizas arbusculares en la protección vegetal. *Biológicas*, (10), 60–70. Recuperado de <https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=39>.
- Castillo, A., Puig, C. y Cumagun, C. (2019). Non-Synergistic effect of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* spp. in reducing infection of *Fusarium* wilt in banana. *Pathogens*, 8(2), 43. doi:10.3390/pathogens8020043.
- Chandrashekara, K.N., Manivannan, S., Chandrashekara, C., Chakravarthi, M. (2012). Biological control of plant diseases. Ecofriendly innovative approaches in plant disease management, 10, 147–166. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/233119112\\_Biological\\_Control\\_of\\_Plant\\_Diseases](https://www.researchgate.net/publication/233119112_Biological_Control_of_Plant_Diseases).
- Chávez, N. (2015). Análisis de sistemas de convección en el tratamiento térmico de suelos o sustratos agrícolas para su desinfección en continuo. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, España. 182p. doi:10.4995/thesis/10251/61472.
- Conde, P.R. (2018). Estratificación en frío, corte de semillas y microorganismos eficientes en la propagación sexual de palto (*Persea americana* Mill.). Ayacucho. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho. 118p.
- Cordier, C., Pozo, M.J., Barea, J.M., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. (1998). Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(10), 1017–1028. doi:10.1094/mpmi.1998.11.10.1017.

- Coria, V.M. (2009). Tecnología para la producción de aguacate en México. Recuperado de <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/2999>.
- Cotes, A.M. 2019. Control biológico mediante el uso de bioplaguicidas microbianos. Serie Fitosanidad (116). México. 3p. Recuperado de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/control-biologico-mediante-el-uso-de-bioplaguicidas-microbianos>.
- Cram, M., Frank, M. y Mallams, K. (2012). Forest nursery pests. Agriculture Handbook (680), 212p. Recuperado de <https://rngr.net/publications/forest-nursery-pests>.
- Cristóbal, J., Herrera, E., Reyes, V., Ruiz, E., Suárez, T., María, J. y Celis, T. (2010). *Glomus intraradices* para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en condiciones protegidas. Fitosanidad, 14(1), 25–29. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/fit/v14n1/fit04110.pdf>.
- Crone, M., McComb, J.A., O'Brien, P.A. y Hardy, G.E.S.J. (2013). Survival of *Phytophthora cinnamomi* as oospores, stromata, and thick-walled chlamydospores in roots of symptomatic and asymptomatic annual and herbaceous perennial plant species. Fungal biology, 117(2), 112–123. doi: 10.1016/j.funbio.2012.12.004.
- De Cock, A.W.A.M., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala, K., Robideau, G.P., Abad, Z.G., ... Lévesque, C.A. (2015). *Phytophthium*: Molecular Phylogeny and Systematics. Persoonia - Molecular phylogeny and evolution of fungi, 34(1), 25–39. doi:10.3767/003158515x685382.
- Doley, K., Dudhane, M. y Borde, M. (2015). *Glomus fasciculatum* en las respuestas de defensa para detener la putrefacción de *Arachis hypogaea* L. Agrociencia, 49(6), 669–678. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v49n6/v49n6a6.pdf>.
- Drenth, A. y Sendall, B. (2001). Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane, Australia, 1, 1–41. Recuperado de <https://docplayer.net/17681728-Practical-guide-to-detection-and-identification-of-phytophthora.html>.
- El-Sayed, A. y Shad Ali, G. (2019). *Aspergillus flavipes* is a novel efficient biocontrol agent of *Phytophthora parasitica*. Biological control, 104072. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104072.
- Fiorilli, V., Catoni, M., Francia, D., Cardinale, F. y Lanfranco, L. (2011). The arbuscular mycorrhizal symbiosis reduces disease severity in tomato plants

- infected by *Botrytis cinerea*. Journal of plant pathology, 91(1), 237–242.  
Recuperado de  
<http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/299/165>.
- Fracchia, S. (2002). Hongos saprófitos del suelo como microorganismos auxiliares de micorrización. (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Argentina. 181p.  
Recuperado de  
[https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3430\\_fracchia.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3430_fracchia.pdf)
- Friberg, S. (2001). Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in traditional agriculture on the Niger inland delta, Mali, West Africa. CBM:s Skriftserie, 3, 53–80. Recuperado de  
<https://www.slu.se/globalassets/ew/org/centrb/cbm/dokument/publikationer-cbm/masteruppsatser/sarafribergthesis.pdf>.
- García-Seco, D. (2017). Micorrizas, los biofertilizantes del futuro que vienen del pasado. Serie nutrición vegetal Núm. 90. México. 5p. Recuperado de  
<https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/micorrizas-biofertilizantes-del-futuro-que-vienen-del-pasado>.
- Gardiazábal, F. (1990). Requerimientos de clima, suelo y agua para la implantación de paltos. Bl-B4. In: Curso internacional producción, postcosecha y comercialización de paltos. Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 4p.  
Recuperado de  
[http://www.avocadosource.com/Journals/CIVDMCHILE\\_1990/CIVDMCHILE\\_1990\\_PG\\_03.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/CIVDMCHILE_1990/CIVDMCHILE_1990_PG_03.pdf).
- Gerdemann, J.W. (1968). Vesicular-Arbuscular mycorrhiza and plant growth. Annual Review of Phytopathology, 6(1), 397–418.  
doi:10.1146/annurev.py.06.090168.002145.
- Gerdemann, J.W. y Nicolson, T.H. (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society, 46(2), 235–244. doi:10.1016/s0007-1536(63)80079-0.
- Giorgi, K.I. (1993). Metodología para la evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad tristeza del palto, aislamiento, identificación y patogenicidad de cepas de *Phytophthora* asociadas. (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 99p. Recuperado de  
[http://www.avocadosource.com/papers/Chile\\_Papers\\_A-Z/G-H-I/GeorgiKaren1993.pdf](http://www.avocadosource.com/papers/Chile_Papers_A-Z/G-H-I/GeorgiKaren1993.pdf).

- Handelsman, J. y Stabb, E.V. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The plant cell online*, 8, 1855-1869. doi:10.1105/tpc.8.10.1855.
- Hardham, A. R. (2005). *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular plant pathology*, 6(6), 589-604. doi:10.1111/j.1364-3703.2005.00308.x.
- Hardham, A. R. y Blackman, L. M. (2018). *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular plant pathology*, 19(2), 260–285. doi:10.1111/mpp.12568.
- Hernández, A. (2016). Identificación morfológica y molecular de los fitopatógenos asociados al aguacatero en Michoacán, México. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México. 64p. Recuperado de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/43250>.
- Hernández, A., Chávez, E., Delgado, J.C., Beltrán, M., Tapia, L.M. y Ochoa, Y.M. (2019). First report of *Phytophthora vexans* causing the Avocado sadness in Michoacan, México. *Phyton, International journal of experimental Botany*, 88(1), 11–13. doi: 10.32604/phyton.2019.04608.
- Hernández, C.A. (2001). Efecto del hongo micorriza (*Glomus intraradices* Schenk y Smith) en el crecimiento del portainjerto mexícol ( *Persea americana* Mill) cultivado bajo cinco tratamientos de fertilización. (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 95p. Recuperado de [http://www.avocadosource.com/papers/Chile\\_Papers\\_A-Z/G-H-I/HernandezClaudio2001.pdf](http://www.avocadosource.com/papers/Chile_Papers_A-Z/G-H-I/HernandezClaudio2001.pdf).
- Ho, H.H. y Zentmyer, G.A. (1977). Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia. Mycological Society of America*, 69(4), 701–713. doi:10.2307/3758860
- Ho, H.H. (2018). The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. *J Bacteriol Mycol*, 6(1), 40–45. doi: 10.15406/jbmoa.2018.06.00174.
- Huanca, R.I. (2016). Efecto de la micorrización con *Glomus intraradices* Schenk y Smith en el crecimiento de *Persea americana* Mill variedades Ettinger y Zutano en condiciones de invernadero. (Tesis pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Libertad, Perú. 81p. Recuperado de <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/8781>.
- Huarhua, M., Flores, J., Acuña, R. y Apaza, W. (2018). Identificación morfológica y molecular de *Phytophthora cinnamomi* Rands como agente causal de la pudrición de corona y raíces en arándanos (*Vaccinium corymborum*) en Perú. *Peruvian Journal of Agronomy*, 2(2), 14–21. doi:10.21704/pja.v2i2.1202.

- INTAGRI. (2015). Control de la pudrición de raíz en aguacate. Serie Fitosanidad. 3p. Recuperado de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/control-de-la-pudricion-de-raiz-en-aguacate>.
- INTAGRI. (2016a). Beneficios de las micorrizas sobre el estrés en plantas. Serie nutrición vegetal, 3p. Recuperado de <https://www.intagri.com/articulos/suelos/beneficios-de-las-micorrizas-sobre-el-estres-en-plantas>.
- INTAGRI. (2016b). Mecanismos de acción de los microorganismos para el control de enfermedades en el suelo. Serie Fitosanidad, (65), 3p. Recuperado de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/mecanismos-de-accion-de-microorganismos-para-el-control-de-enfermedades-en-el-suelo>.
- Islam, M. T., Takayama, T. y Tahara, S. (2004). Bioassay methods to detect and identify allelochemicals in plants using zoospores of phytopathogens the Peronosporomycetes. Research methods in plant sciences: Allelopathy. Plant Pathogens, 3, 67–96. Recuperado de <http://btlbsmrau.org/wp-content/uploads/2014/01/AllelopathyBook2004.pdf>.
- Jaizme-Vega, M. C. y Rodríguez-Romero, A. S. (2006). Uso potencial de hongos micorrícicos en sanidad vegetal. Vida rural, (229), 28–30. Recuperado de [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_Vrural/Vrural\\_2006\\_229\\_28\\_30.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Vrural/Vrural_2006_229_28_30.pdf).
- Jeffers, S. N. (2006). Identifying Species of *Phytophthora*. 8p. Recuperado de [https://fhm.fs.fed.us/sp/sod/misc/culturing\\_species\\_phytophthora.pdf](https://fhm.fs.fed.us/sp/sod/misc/culturing_species_phytophthora.pdf).
- Kamel, L., Keller-Pearson, M., Roux, C. y Ané, J.M. (2016). Biology and evolution of arbuscular mycorrhizal symbiosis in the light of genomics. New Phytologist, 213(2), 531–536. doi:10.1111/nph.14263.
- Latorre, B., De Andraca, F. y Besoain, X. (1998). Tristeza del palto. Aconex (Chile), (59), 18–23. Recuperado de [http://www.avocadosource.com/papers/Chile\\_Papers\\_A-Z/J-K-L/LatorreBernardo1998.pdf](http://www.avocadosource.com/papers/Chile_Papers_A-Z/J-K-L/LatorreBernardo1998.pdf).
- Liu, D., Li, K., Hu, J., Wang, W., Liu, X., y Gao, Z. (2019). Biocontrol and action mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* in Soybean *Phytophthora* Blight. International Journal of Molecular Sciences, 20(12), 2908. doi:10.3390/ijms20122908.

- MacDonald, J., Ali-Shtayed, M., Kabashima, J. y Stites, J. (1994). Occurrence of *Phytophthora* species in recirculated nursery irrigation effluents. *Plant Disease*, (78),607–611. doi: 10.1094 / pd-78-0607.
- Mamani, J. (2017). *Pseudomonas* de rizósfera de palto (*Persea americana* Mill.) con actividad biocontroladora de *Phytophthora cinnamomi* Rands, aisladas en costa central del Perú. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. 90p. Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2762>.
- Marais, L.J., Menge, J.A., Bender. G.S. y Faber, B. (2002). *Phytophthora* root rot. *Plant Pathologist*, 4p. Recuperado de [http://www.avocadosource.com/journals/avoresearch/avoresearch\\_02\\_01\\_2002\\_marais\\_root%20rot.pdf](http://www.avocadosource.com/journals/avoresearch/avoresearch_02_01_2002_marais_root%20rot.pdf).
- Márquez-Dávila, K., Bailey, B., Arévalo, E., Olivera, D., Stream, M. y Samuels, G.J. (2010). Antibiosis de *Clomostachys* spp. endófito contra los principales patógenos del cacao. Memorias del XXI Congreso Peruano de Fitopatología. Tarapoto, Perú.
- Mejía, E. (2011). Aguacate (*Persea americana* Miller). Colombia. 48p. Recuperado de <https://es.calameo.com/read/0060356787ca8447cf5ec>.
- Mejía, K. D. (2018). Control de *Phytophthora cinnamoni* en el cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi con diferentes aislamientos de *Trichoderma*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú. 98p. Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3669>.
- MINAGRI. (2019). Situación del mercado internacional de la palta. Su análisis desde una perspectiva de las exportaciones peruanas. 41p. Recuperado de <https://www.coursehero.com/file/42405938/situacion-mercado-intern-palta-110219-1pdf/>
- Montañez, B.I. (2009). Efecto de la micorrización en plantas de aguacate (*Persea americana*) durante la fase de vivero en suelos provenientes de los Llanos Orientales. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 137p. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/2619/1/790646.2010.pdf>.
- Moreno-Velandia, C. A., Cotes, A. M., Beltrán-Acosta, C., Bettiol, W., y Elad, Y. (2018). Control biológico de fitopatógenos del suelo. (ALICE). 148–204 Recuperado de <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1104045>.

- Mustafa, G., Khong, N. G., Tisserant, B., Randoux, B., Fontaine, J., Magnin-Robert, M., ... Sahraoui, A.L.H. (2017). Defence mechanisms associated with mycorrhiza-induced resistance in wheat against powdery mildew. *Functional Plant Biology*, 44(4), 443–454. doi:10.1071/fp16206.
- Nogales, A.M. (2009). Estudio de la interacción entre el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices* Schenck y Smith y el hongo patógeno *Armillaria mellea* (Vahl: fr) P.Kuhn en vid. (Tesis doctoral). Universidad de Barcelona, España. 222p. Recuperado de [https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/953/AMNG\\_TESIS.pdf?](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/953/AMNG_TESIS.pdf?)
- Ntushelo, K., Ledwaba, L.K., Rauwane, M.E., Adebo, O.A. y Njobeh, P.B. (2019). The mode of action of *Bacillus* species against *Fusarium graminearum*, Tools for Investigation, and Future Prospects. *Toxins*, 11(10), 606. doi:10.3390/toxins11100606.
- Orihuela, M. D. (2017). Morfotipos de hongos endomicorrizógenos asociado al maíz amiláceo (*Zea mays* L. amiláceo), y su capacidad antagónica para el control de *Fusarium oxysporum*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho. 210p.
- Oviedo, J.J. (2018). Identificación biomolecular de peronosporales radiculares en palto, mango, chirimoya y mandarina en la costa peruana. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. 252p. Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3085>.
- Pal, K. K. y McSpadden, B. (2006). Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*, 2, 1–25. doi: 10.1094/phi-a-2006-1117-02.
- Palmateer, A.J., Ploetz, R.C. y Harmon, P.F. (2006). Plant disease management guide: Avocado (*Persea americana*) University of Florida, 1–10. Recuperado de <https://ufdcimages.uflib.ufl.edu/UF/00/05/38/71/00029/PG13400.pdf>.
- Palmucci, H.E. (2015). Caracterización de especies fitopatógenas de *Pythium* y *Phytophthora* (Peronosporomycetes) en cultivos ornamentales del Cinturón Verde La Plata-Buenos Aires y otras áreas y cultivos de interés. (Tesis de doctoral). Universidad Nacional de la Plata, Argentina. 448p. Recuperado de <https://core.ac.uk/download/pdf/145236905.pdf>.
- Ramírez, J. G., Catañeda, D. A. y Morales, J. G. (2014). Alternativas microbiológicas para el manejo de *Phytophthora cinnamomi* Rands., en *Persea americana* Mill. bajo condiciones de casa-malla. *Cultivos Tropicales* 35(4) 197. Recuperado de:

- <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193232493003.pdf>.
- Redecker, D. y Raab, P. (2006). Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia*, 98(6), 885–895. doi:10.3852/mycologia.98.6.885.
- Redekar, N.R., Eberhart, J.L. y Parke, J.L. (2019). Diversity of *Phytophthora*, *Pythium* and *Phytopythium* species in recycled irrigation water in a container nursery. *Phytobiomes Journal*, 3(1), 31–45. doi:10.1094/PBIOMES-10-18-0043-R.
- Rodríguez, C., Siverio, F. y Rodríguez, A. (2015). Control en viveros de *Phytophthora cinnamomi* causante de la podredumbre de raíz en aguacate. 14p. doi:10.13140/rg.2.1.1267.4322.
- Rubio, V. y Fereses, A. (2005). Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. 16p. Recuperado de <https://core.ac.uk/download/pdf/36025273.pdf>.
- Sarmiento, D. (2018). El cultivo del aguacate en el Sur Peninsular. Instituto Canario de investigaciones Agrarias. 185p. Recuperado de <https://www.icia.es/icia/download/Aguacate/15.pdf>.
- Schübler, A., Schwarzott, D. y Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105(12), 1413–1421. doi:10.1017/s0953756201005196.
- Schübler, A. y Walker, C. (2010). The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University, 58p. Recuperado de [http://www.amf-phylogeny.com/Schuessler&Walker2010\\_Glomeromycota.pdf](http://www.amf-phylogeny.com/Schuessler&Walker2010_Glomeromycota.pdf).
- Scora, R.W. y Bergh, B. (1990). The origins and taxonomy of avocado (*Persea americana* Mill). Lauraceae. *Acta Horticulturae*, (275), 387–394. doi:10.17660/actahortic.1990.275.47.
- Sekar, S., Mahadevan, S., Kumar, S. S. D., y Mandal, A. B. (2011). Thermokinetic responses of the metabolic activity of *Staphylococcus lentus* cultivated in a glucose limited mineral salt medium. *Journal of thermal analysis and Calorimetry*, 104(1), 149–155. doi: 10.1007/s10973-010-1121-1.
- Sieverding, E. (1983). Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. 121p. Recuperado de [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat\\_digital/CIAT/books/historical/198.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/CIAT/books/historical/198.pdf).

- Singh, H.B. (2014). Management of plant pathogens with microorganisms. Proceedings of the Indian National Science Academy, 80(2), 443–454. doi:10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55120.
- Sundram, S., Meon, S., Seman, I.A. y Othman, R. (2014). Application of arbuscular mycorrhizal fungi with *Pseudomonas aeruginosa* UPMP3 reduces the development of *Ganoderma* basal stem rot disease in oil palm seedlings. Mycorrhiza, 25(5), 387–397. doi:10.1007/s00572-014-0620-5.
- Tian, L., Shi, S., Ma, L., Zhou, X., Luo, S., Zhang, J., ... Tian, C. (2017). The effect of *Glomus intraradices* on the physiological properties of *Panax ginseng* and on rhizospheric microbial diversity. Journal of Ginseng Research, 1–9. doi: 10.1016/j.jgr.2017.08.005.
- Torres, A. (2017). Manual del cultivo del palto. Instituto de Desarrollo Agropecuario - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. INIA, Chile.118p. Recuperado de <http://www.inia.cl/wp-content/uploads/ManualesdeProduccion/13%20Manual%20Palto.pdf>.
- Trinidad-Cruz, J.R., Quiñones-Aguilar, E.E., Rincón-Enríquez, G., López-Pérez, L. y Hernández-Cuevas, L.V. (2017). Micorrización de *Agave cupreata*: Biocontrol de *Fusarium oxysporum* y promoción del crecimiento vegetal. Revista Mexicana de Fitopatología, 35(2), 151–169. doi: 10.18781/r.mex.fit.1607-5.
- Van Der Plaats-Niterink, A.J. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. Baarn: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, (21). Recuperado de [http://www.wi.knaw.nl/publications/1021/content\\_files/content.htm](http://www.wi.knaw.nl/publications/1021/content_files/content.htm).
- Weste, G. (1975). Pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* towards *Nothofagus cunninghamii*. Australian Journal of Botany, 23(2), 277–283. doi:10.1071/bt9750277.
- Weste, G., Brown, K., Kennedy, J. y Walshe, T. (2002). *Phytophthora cinnamomi* infestation -A 24-year study of vegetation change in forests and woodlands of the Grampians, Western Victoria. Australian Journal of Botany, 50(2), 247-274. doi:10.1071/bt01073.
- Xavier, L.J. y Boyetchko, S.M. (2004). Arbuscular mycorrhizal fungi in plant disease control. Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications. Australian Journal of Botany, (23), 183–194. doi: 10.1201/9780203913369.ch16.

# ANEXOS

**Anexo 1.** Caldo mínimo en sales utilizado en la extracción de metabolitos inhibitorios solubles de *Glomus intraradices*

<b>Componente</b>	<b>Fórmula</b>	<b>(g/L)</b>
Fosfato dipotásico	$K_2HPO_4$	0.68
Sulfato de magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.10
Sulfato ferroso heptahidratado	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.03
Sulfato de amonio	$(NH_4)_2SO_4$	5.00
Cloruro de calcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.02
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	5.00
Dextrosa	$C_6H_{12}O_6$	5.00
Extracto de levadura		2.00

Fuente: (Sekar *et al.*, 2011), con modificaciones

**Preparación para 500ml de caldo:**

- a. Pesar los ingredientes en proporción a 0.5 L
  
- b. Verter los componentes pesados a un balón de vidrio conteniendo 500ml de agua destilada.
  
- c. Ajustar el pH entre 6.5 a 7.0
  
- d. Esterilizar el caldo en autoclave a 121°C durante 30 minutos.

**Anexo 2.** Jugo V8 clarificado utilizado en la preparación del medio selectivo para el aislamiento de oomicetos

Medio	Componente	Cantidad/L
V8 Clarificado	Jugo V8	100.0 ml
	CaCO <sub>3</sub>	1.0 g

Fuente: Jeffers, 2006

**Preparación:**

- a. En un tubo de ensayo agregar 1g de carbonato de calcio por cada 100 ml de jugo V8 y mezclar hasta que el componente químico se disuelva.
- b. Centrifugar la mezcla a 4000 rpm durante 20 minutos.
- c. Extraer con cuidado la suspensión y conservar en refrigeración a 4°C hasta su uso.

**Anexo 3.** Análisis de varianza del crecimiento radial logrado por tres oomicetos patógenos en medio AHM y medio AHM-MIS

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft(0.05)</b>	<b>Ft(0.01)</b>
Tratamiento	5	4.23	0.85	21.84	3.11	5.06
Error	12	0.47	0.04			
Total	17	4.70				
%CV =	5.79					

**Anexo 4.** Análisis de varianza del porcentaje de inhibición ejercido por los metabolitos de *Glomus intraradices* en tres oomicetos patógenos radiculares del palto

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft(0.05)</b>	<b>Ft(0.01)</b>
Tratamiento	2	84.62	42.31	1.69	5.14	10.92
Error	6	150.37	25.06			
Total	8	234.99				
%CV =	25.93					

**Anexo 5.** Análisis de varianza del porcentaje de raíz en enferma de plántulas de palto inoculados con tres oomicetos patógenos

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft(0.05)</b>	<b>Ft(0.01)</b>
Tratamiento	7	24515.55	3502.22	22.32	2.31	3.26
Error	32	5019.99	156.87			
Total	39	29535.53				
%CV =	24.30					

**Anexo 6.** Análisis de varianza del contenido de materia seca radicular de plántulas de palto inoculados con tres oomicetos patógenos

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft(0.05)</b>	<b>Ft(0.01)</b>
Tratamiento	7	0.81	0.12	4.40	2.31	3.26
Error	32	0.84	0.03			
Total	39	1.65				
%CV =	22.25					

**Anexo 7.** Análisis de varianza del contenido de materia seca de las biomásas aéreas de plántulas de palto inoculadas con tres oomicetos patógenos

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft(0.05)</b>	<b>Ft(0.01)</b>
Tratamiento	7	18.93	2.70	3.62	2.31	3.26
Error	32	23.91	0.75			
Total	39	42.84				
%CV =	16.11					

**Anexo 8.** Registro de datos obtenidos de las variables evaluadas en la prueba de antagonismo en maceta (Severidad patogénica radicular, Materia seca radicular, Materia seca aérea)

<b>SEVERIDAD</b>		<b>MATERIA SECA RADICULAR</b>		<b>MATERIA SECA AÉREA</b>	
<b>Tratamiento</b>	<b>Severidad (%)</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>MS (g)</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>MS (g)</b>
T1	54.80	T1	0.85	T1	5.61
T1	88.07	T1	0.62	T1	5.78
T1	47.91	T1	0.89	T1	7.73
T1	61.99	T1	0.74	T1	6.23
T1	57.12	T1	1.12	T1	6.11
T2	76.67	T2	0.95	T2	7.51
T2	50.24	T2	0.44	T2	3.74
T2	58.94	T2	1.12	T2	3.94
T2	67.34	T2	0.99	T2	7.45
T2	55.71	T2	0.85	T2	4.93
T3	56.94	T3	0.88	T3	5.93
T3	57.16	T3	0.66	T3	5.89
T3	74.39	T3	0.72	T3	5.09
T3	41.48	T3	0.59	T3	5.53
T3	44.81	T3	0.78	T3	5.95
T4	75.88	T4	0.46	T4	4.57
T4	70.00	T4	0.61	T4	5.48
T4	54.83	T4	0.63	T4	4.52
T4	95.53	T4	0.48	T4	4.50
T4	58.97	T4	0.79	T4	5.91
T5	44.08	T5	0.55	T5	5.58
T5	75.84	T5	0.50	T5	4.14
T5	74.30	T5	0.62	T5	4.25
T5	57.86	T5	0.68	T5	5.15
T5	61.87	T5	0.43	T5	4.78
T6	69.00	T6	0.89	T6	5.05
T6	95.42	T6	0.46	T6	4.79
T6	79.08	T6	0.45	T6	4.21
T6	56.31	T6	0.78	T6	4.80
T6	95.98	T6	0.56	T6	5.37
T7	9.35	T7	0.98	T7	5.91
T7	9.69	T7	0.99	T7	6.44
T7	9.55	T7	0.95	T7	6.46
T7	8.28	T7	0.97	T7	6.28
T7	7.39	T7	0.99	T7	7.03
T8	9.87	T8	0.68	T8	4.26
T8	14.95	T8	0.53	T8	5.10
T8	4.82	T8	0.90	T8	4.33
T8	13.94	T8	0.46	T8	3.25
T8	14.99	T8	0.59	T8	5.05

**Anexo 9.** Registro de evaluación de crecimiento radial de los tres oomicetos (cm)

DÍA 1	R1					R2					R3					Promedio
	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	
T1	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00	0.00
T2	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00	0.00
T3	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00	0.00
T4	0.1	0.2	0.3	0.1	0.18	0.5	0.3	0.1	0.1	0.25	0.5	0.3	0.4	0.5	0.43	0.28
T5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.10	0.1	0.1	0.1	0.1	0.10	0.1	0.1	0.1	0.1	0.10	0.10
T6	0.1	0.3	0.2	0.2	0.20	0.1	0.1	0.2	0.3	0.18	0.1	0.1	0.4	0.1	0.18	0.18

DÍA 2	R1					R2					R3					Promedio
	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	
T1	0.4	0.4	0.3	0.4	0.38	0.4	0.3	0.3	0.4	0.35	0.3	0.3	0.5	0.4	0.38	0.37
T2	0.5	0.3	0.4	0.4	0.40	0.5	0.6	0.5	0.5	0.53	0.5	0.5	0.5	0.5	0.50	0.48
T3	0.6	0.5	0.5	0.4	0.50	0.3	0.3	0.3	0.6	0.38	0.2	0.2	0.3	0.2	0.23	0.37
T4	1.2	1.1	0.9	1.2	1.10	1.1	1	0.9	1.1	1.03	1.4	1.1	1.2	1.3	1.25	1.13
T5	0.8	0.5	0.7	0.8	0.70	0.8	0.7	0.7	0.7	0.73	0.7	0.7	0.8	0.7	0.73	0.72
T6	1	1	0.9	1.1	1.00	1.1	1	1	1	1.03	0.9	1.2	0.9	0.9	0.98	1.00

DÍA 3	R1					R2					R3					Promedio
	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	
T1	1	1	1	1	1.00	1	1	0.9	1	0.98	0.9	1	0.9	1	0.95	0.98
T2	0.9	1.1	1	1	1.00	1.1	1	1	1.2	1.08	1.1	1	1.1	1.2	1.10	1.06
T3	1.2	1.1	1.1	1	1.10	0.8	1	1.2	0.9	0.98	0.8	0.8	0.8	1.1	0.88	0.98
T4	1.8	1.5	1.7	1.8	1.70	1.6	1.5	1.4	1.5	1.50	1.9	1.7	1.6	1.8	1.75	1.65
T5	1.2	0.8	1.1	1.3	1.10	1.3	1.3	1.2	1.3	1.28	1	1.1	1.2	1.2	1.13	1.17
T6	1.6	1.4	1.6	1.5	1.53	1.6	1.7	1.5	1.7	1.63	1.3	1.4	1.4	1.8	1.48	1.54

DÍA 4	R1					R2					R3					Promedio
	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	
T1	1.3	1.4	1.5	1.4	1.40	1.4	1.4	1.4	1.3	1.38	1.5	1.4	1.5	1.2	1.40	1.39
T2	1.3	1.5	1.3	1.5	1.40	1.5	1.4	1.3	1.6	1.45	1.5	1.6	1.7	1.4	1.55	1.47
T3	1.6	1.5	1.5	1.3	1.48	1.3	1.5	1.6	1.3	1.43	1.4	1.2	1.5	1.3	1.35	1.42
T4	2.1	2.4	1.9	2.5	2.23	1.9	2	2	1.9	1.95	2.3	2.3	2.1	2.3	2.25	2.14
T5	1.5	1.1	1.4	1.7	1.43	1.8	1.7	1.8	1.8	1.78	1.4	1.4	1.8	1.6	1.55	1.58
T6	2.2	2.2	2.2	2.2	2.20	2.1	1.9	2	2.1	2.03	1.8	1.7	1.7	2.2	1.85	2.03

DÍA 5	R1					R2					R3					Promedio
	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	
T1	2.1	1.5	1.7	1.8	1.78	1.6	1.7	1.5	1.7	1.63	1.9	1.8	1.7	1.7	1.78	1.73
T2	1.6	1.4	1.8	1.6	1.60	1.8	1.7	1.5	1.5	1.63	1.8	1.8	2	1.6	1.80	1.68
T3	1.8	2.1	1.8	1.7	1.85	1.7	2	2	2	1.93	1.5	1.8	1.8	1.8	1.73	1.83
T4	2.7	2.7	2.6	2.8	2.70	2.7	2.7	2.7	2.6	2.68	2.7	2.7	2.7	2.7	2.70	2.69
T5	1.6	2	2.3	1.4	1.83	2	2	1.9	2.1	2.00	1.9	1.8	2.2	2	1.98	1.93
T6	2.8	2.4	2.4	2.8	2.60	2.3	2.4	2.6	2.7	2.50	2.6	2.7	2.4	2.1	2.45	2.52

DÍA 6	R1					R2					R3					Promedio
	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	
T1	2.3	2.1	2.3	2.6	2.33	2.2	2.3	2.4	1.8	2.18	2	2.2	2.3	2.4	2.23	2.24
T2	2	1.8	2.3	1.6	1.93	1.9	2.3	2	2.5	2.18	2.3	1.9	2	2.6	2.20	2.10
T3	2.7	2.5	2.5	2.3	2.50	2.6	2.6	2.5	1.9	2.40	2.2	2.1	2.3	2.5	2.28	2.39
T4	3.2	3.6	2.9	3.6	3.33	3.1	3.3	3.1	3.4	3.23	3.3	3.4	3.2	3.3	3.30	3.28
T5	2.7	2.6	2.3	1.9	2.38	2.5	2.5	2.5	2.3	2.45	2.2	2.1	3	2.7	2.50	2.44
T6	3.2	3.3	3.1	3.1	3.18	3.2	3.2	3.1	3.3	3.20	3.2	3.4	2.7	2.6	2.98	3.12

DÍA 7	R1					R2					R3					Promedio
	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	
T1	3.2	2.7	2.7	2.9	2.88	2.6	2.6	2.7	2.3	2.55	2.8	3	2.4	2.8	2.75	2.73
T2	2	2.6	1.9	2.1	2.15	2.6	2.3	2.8	2.6	2.58	2.5	2.9	2.6	2.1	2.53	2.42
T3	2.8	2.8	2.9	3.2	2.93	2.9	3	2.1	3.3	2.83	3	2.8	2.5	2.5	2.70	2.82
T4	3.9	3.5	4	3.3	3.68	3.7	3.9	3.6	3.5	3.68	3.7	4	3.8	3.6	3.78	3.71
T5	2.9	2.8	2.6	2.5	2.70	2.9	2.9	3.1	3	2.98	3.1	2.8	2.4	3.4	2.93	2.87
T6	3.7	3.6	3.8	3.8	3.73	3.5	3.7	3.7	3.6	3.63	3.5	3	3.6	3.8	3.48	3.61

DÍA 8	R1					R2					R3					Promedio
	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	a	b	c	d	Prom	
T1	3.2	3.1	3.6	3.3	3.30	3	2.9	3	2.8	2.93	3.6	3.3	3.4	2.8	3.28	3.18
T2	2.2	2.2	2.9	2.2	2.38	2.7	3.3	2.9	3	2.98	2.3	3.2	2.9	3	2.85	2.72
T3	3.7	3.3	3.3	3.1	3.35	2.3	3.9	3.3	3.3	3.20	2.8	3.4	3.2	2.8	3.05	3.19
T4	4.2	3.7	4.3	3.9	4.03	4.2	4.3	4.2	4	4.18	4.1	4.1	4.2	4.1	4.13	4.11
T5	3.1	3.1	2.9	2.8	2.98	3.3	3.3	3.2	3.3	3.28	3.4	2.9	3.9	3.5	3.43	3.23
T6	4.1	4	4	4.2	4.08	3.9	4.1	3.9	4	3.98	4.2	3.8	3.7	3.9	3.90	3.98

**Anexo 10.** Aislamiento de esporas de *Glomus intraradices* para la extracción de sus metabolitos



**1** Biomasa



**2** Pesado de Rizósfera



**3** Agitación y decantado



**4** Tamizado



**5** Conteo de esporas

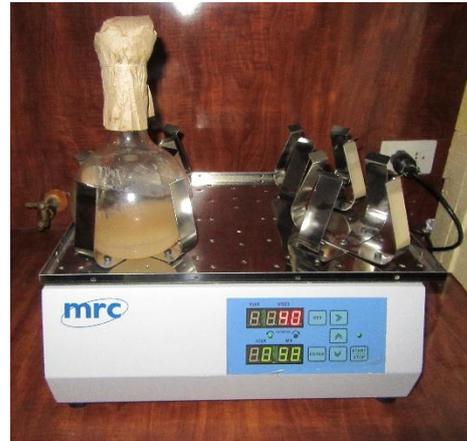


**6** Desinfección de esporas

**Anexo 11.** Proceso de extracción de los metabolitos de *Glomus intraradices*



**1** Esporas en MIN



**2** Agitado (110 rpm/1h)



**3** Filtrado



**4** Centrifugado (3000 rpm/15')



**5** Baño María (90°C/2h)



**6** Mesclado de MIS + AHM (1:1)