

TALLER DE LICENCIATURA

**EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD
TRISTEZA DEL PALTO CAUSADA POR *Phytophthora cinnamomi* EN
PLANTAS DE PALTO cv. MEXÍCOLA CULTIVADAS EN MACETA, EN
RELACIÓN A DISTINTOS PERÍODOS DE INUNDACIÓN DEL SUELO.**

CYNTHIA JOCELYN ARENAS ZAMORANO

QUILLOTA CHILE

1998

ÍNDICE DE MATERIA

1. INTRODUCCIÓN

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- 2.1. Enfermedad tristeza del palto
 - 2.1.1. Generalidades
 - 2.1.2. Descripción del agente causal de la enfermedad
Phytophthora cinnamomi Rands.
 - 2.1.2.1. Clase Oomicetes
 - 2.1.2.2. FaMilla *Pythiaceae*
 - 2.1.2.3. Género *Phytophthora*
 - 2.1.2.4. *Phytophthora cinnamomi* Rands
 - 2.1.3. Ciclo de la enfermedad y epidemiología
 - 2.1.4. Condiciones predisponentes de la enfermedad
 - 2.1.4.1. Humedad del suelo
 - 2.1.4.2. Temperatura
 - 2.1.4.3. Aireación
 - 2.1.4.4. Interacciones en el suelo
- 2.2. Antecedentes de estudios realizados

3. MATERIAL Y MÉTODO

- 3.1. Ubicación del ensayo
- 3.2. Recursos: suelo y agua
- 3.3. Material vegetal y su tratamiento
- 3.4. Producción de inóculo e inoculación
- 3.5. Inundación
- 3.6. Riego
- 3.7. Fertilización
- 3.8. Diseño estadístico
- 3.9. Evaluación de los resultados

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- 4.1. Identificación de la especie *Phytophthora cinnammomi* Rands
- 4.2. Evaluación de los tratamientos
 - 4.2.1. Pudrición de raicillas
 - 4.2.2. Número de hojas
 - 4.2.3. Altura de la planta
 - 4.2.4. Diámetro del tallo de la planta
 - 4.2.5. Área foliar total

5. CONCLUSIONES

6. RESUMEN

7. LITERATURA CITADA

1. INTRODUCCIÓN

En la especie *Persea americana* Mill (palto), la pudrición de raicillas ocasionada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, corresponde a la enfermedad más importante y más ampliamente distribuida en esta especie frutal, tanto en Chile como en el mundo (ZENTMYER, MENGE y OHR, 1994),

En Chile es particularmente grave, debido a que gran parte de la zona cultivada con esta especie se encuentra en suelos pesados o arcillosos, los que al acumular una excesiva humedad se ven afectados por este patógeno.

La pudrición de raíces ocasionada por especies de *Phytophthora* en muchas variedades de plantas se agrava cuando el suelo se satura por períodos prolongados (WILCOX y MIRCETICH, 1979; ZENTMYER, 1980). WILCOX y MIRCETICH (1985) determinaron que la pudrición de raíces ocasionada por *Phytophthora cryptogea* en cerezo, aumenta progresivamente con períodos de inundación de 8, 12, 24 y 48 horas, en cambio, la ocasionada por *Phytophthora megasperma* es insignificante con períodos de 8 y 12 horas y se incrementa de moderada a alta con períodos de inundación de 24 y 48 horas, respectivamente. Esta condición de inundación del suelo se puede presentar por una mala práctica de riego, presencia de niveles freáticos altos, o bien por el uso de suelos de textura pesada, con drenaje deficiente.

Por otra parte, la tristeza del palto, se puede prevenir de varias maneras, tales como uso de portainjertos resistentes, impedir excesivo laboreo mecánico en el suelo, elegir un suelo bien nivelado y bien drenado para la plantación y regar

eficientemente, evitando una excesiva humedad. Sin embargo, lo más importante es elegir un suelo bien nivelado y con buen drenaje donde no se generen excesos de humedad, combinado con un riego eficiente en cuanto a frecuencia y tiempo de riego. Son estos manejos los que disminuyen, en gran parte, la posibilidad de un ataque de *Phytophthora*.

El presente trabajo estudia el efecto de distintos niveles de inundación con respecto a la incidencia y severidad de la enfermedad ocasionada por *Phytophthora cinnamomi*, lo que resulta ser un antecedente importante para generar información de cómo manejar adecuadamente el riego del palto disminuyendo el riesgo de la enfermedad, ya que en suelos infestados se desarrolla y disemina sólo si existe agua libre por determinado período y temperaturas favorables. Esta información puede ser utilizada dentro de una estrategia de control integrado de la enfermedad.

Por consiguiente, teniendo como antecedentes resultados de experimentos anteriores y debido a las características de los hongos de la familia *Pythiaceae*, debería existir un aumento proporcional de la liberación de zoosporas y de la severidad de la enfermedad al incrementar la duración de los períodos de inundación.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del período de inundación en el suelo sobre la incidencia y severidad de la tristeza del palto causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, en plantas de palto cultivadas en maceta bajo invernadero.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enfermedad tristeza del palto: 2.1.1. Generalidades

La tristeza del palto es la enfermedad más importante y más ampliamente distribuida a nivel mundial, en esta especie frutal. El hongo causal, *Phytophthora cinnamomi* Rands, fue aislado por primera vez desde árboles de canela (*Cinnamomum burmannii* Blume) en Sumatra en 1922 y desde ese tiempo ha sido reportado desde alrededor de 60 países y en casi 900 especies de plantas. Posee un rango amplio de hospederos, tales como: pina, castaño, varias especies de pino, sicómoro, duraznero, peral, nuez de Macadamia, muchas especies ornamentales y gran cantidad de plantas australianas y sudafricanas (ZENTMYER, 1980).

La primera publicación sobre la pudrición de raicillas ocasionada por *Phytophthora cinnamomi* viene de Puerto Rico en 1927, pero recién en 1942 fue aislado el hongo desde plantas de palto en California. La pudrición de raicillas ocasionada por *Phytophthora cinnamomi* ha sido encontrada en casi toda área donde se cultiva esta especie frutal (ZENTMYER, MENGE y OHR, 1994).

A nivel mundial provoca grandes problemas, por ejemplo, las pérdidas por concepto de esta enfermedad son graves en California donde se estima que afecta entre un 60-75 % de los huertos, causando pérdidas anuales en 1989 de aproximadamente 44 millones de dólares (COFFEY, 1991).

En Chile, la pudrición de raíces ocasionada por *Phytophthora cinnamomi* está descrita como la principal enfermedad del palto (MUJICA y VERGARA, 1980). Ésta aparece en focos del terreno asociados a mal drenaje y provoca, eventualmente, el colapso de árboles severamente afectados (LATORRE, 1992). La incidencia de la enfermedad es muy alta ya que el 100 % de los huertos se ven afectados en algún grado (BESOAIN, 1997)*. La enfermedad es particularmente grave en zonas cultivadas sobre suelos pesados, arcillosos o con drenaje deficiente, en los cuales la condición de excesiva humedad predispone al ataque del patógeno.

GEORGI (1993), haciendo muestreo de raíces, recuperó el hongo en el 100 % de las muestras tomadas de raicillas de palto, independiente del grado de afección, es decir, pudo recuperar el hongo desde paltos aparentemente sanos, medianamente enfermos y severamente enfermos.

En Chile, el cultivo del palto es muy importante debido a los altos precios que logra este fruto, tanto a nivel nacional como mundial. Si bien las exportaciones son bajas, con respecto a otras especies frutales (11.911 toneladas en la temporada 95/96, octavo lugar en fruta fresca), las divisas aportadas no dejan de ser importantes (US\$38,3 millones, lo que corresponde al 3.3 % de las divisas totales en fruta fresca). Actualmente, la mayor parte de la superficie se encuentra en la V región, sobretodo en la provincia de Quilota que aporta 4.384 ha de la 8.071 ha totales en la región, según el último catastro frutícola realizado por CORFO (CHILE) en 1996.

2.1.2. Descripción del agente causal de la enfermedad (*Phytophthora cinnamomi*)

El hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands causante de la tristeza del palto, pertenece a la clase Oomicetes, orden Peronosporales, familia Pythiaceae y género *Phytophthora*, cuyas características son descritas a continuación.

2.1.2.1. Clase Oomycetes

Esta clase es, en muchos aspectos, muy diferente de otros hongos pertenecientes a otras clases. Sus características, que lo distinguen de el resto de los hongos son las siguientes: a) la mayoría produce zoosporas biflageladas con un flagelo brillante dirigido hacia adelante y un flagelo ondulante, dirigido hacia atrás, b) sus paredes celulares se componen principalmente de glucanos, pero también contienen celulosa y los géneros *Pythium*, *Phytophthora* y *Saprolegniales* no poseen quitina, c) su reproducción sexual es oógama por contacto de gametangios, d) la meiosis es gametangial, con un núcleo inicial somático y, por lo tanto, diploide (ALEXOPOULOS y MIMS, 1979).

Los Oomicetes con la estructura simple son hongos acuáticos que pueden vivir libremente o parasitando algas, mohos de agua, animales pequeños y otras formas de vida acuática. Los más complejos de esta clase son parásitos terrestres de plantas que pasan su ciclo de vida completa en el hospedero y dependen del aire para la diseminación de sus esporas (ALEXOPOULOS y MIMS, 1979).

Poseen un micelio alargado que carece de septos y bien desarrollado, producen zoosporas en zoosporangios (esporas asexuales), y sus esporas latentes son las oosporas que se forman por la fusión de dos gametos morfológicamente distintos. Dado que producen zoosporas, todos ellos requieren o son favorecidos ya sea de gran cantidad de agua o de una película acuosa en el suelo o sobre la superficie de la planta (AGRIOS, 1985).

Las estructuras somáticas de los hongos de esta clase van desde un simple talo unicelular a un micelio filamentosos, muy ramificado y abundante, que crece en el sustrato o en el medio circundante. Tienen una fase sexual y una asexual. En las formas más complejas, que corresponden a especializados parásitos de plantas, existe la tendencia a producir varias generaciones asexuales durante la estación de crecimiento y sólo una generación sexual. La reproducción sexual en los Oomicetes es heterogametángica. En las formas simples el talo entero actúa como gametangio. La formación de oosporas es característica de todas las especies simples. Las oosporas se originan en el oogonio y maduran dentro de éste. En la parte central del oogonio se diferencian uno o más oosporas, que son uninucleadas al madurar. Cuando son multinucleadas se les llama oosporas compuestas (ALEXOPOULOS y MIMS, 1979).

Las zoosporas son producidas en toda esta clase exceptuando las especies más especializadas, en las cuales el esporangio por sí sólo asume la función de una espóra y germina directamente por un tubo germinativo que da crecimiento al micelio. Estas zoosporas pueden ser piriformes o reniformes y cada una de ellas contiene un núcleo en forma de pera (ALEXOPOULOS y MIMS, 1979).

2.1.2.2. FaMilla *Pythiaceae*

La faMilla *Pythiaceae*, perteneciente al orden Peronosporales, incluye hongos acuáticos, anfibios y terrestres, donde los últimos causan serias enfermedades a las plantas cultivadas. El micelio es bien desarrollado y algunas especies producen haustorios. Los esporangios producen y liberan una gran cantidad de zoosporas hasta su madurez. En las especies más especializadas los esporangios son caducos y germinan por un tubo germinativo en lugar de producir zoosporas. El tipo de germinación, por zoosporas o tubo germinativo, depende de las condiciones ambientales, especialmente de la temperatura. Las oosporas pueden ser formadas partenogenéticamente o por fertilización. La sexualidad parece ser relativa en algunas especies (ALEXOPOULOS y MIMS, 1979).

2.1.2.3. Género *Phytophthora*

Las especies de *Phytophthora* producen varias enfermedades en muchos tipos distintos de plantas. La mayoría generan pudriciones de la raíz, ahogamiento de plántulas y pudriciones de tubérculos, cormos, tallos cortos y otros órganos, enfermedades muy semejantes a las ocasionadas por el género *Pythium* sp. Otras especies causan pudriciones de yema o de frutos y algunos tizones foliares. Algunas especies son específicas al hospedero, pero otras tienen un amplio rango de éstos y pueden producir síntomas similares o distintos en muchos tipos de plantas hospederas (AGRIOS, 1985).

Para diferenciar al género *Phytophthora* del género *Pythium* se usa el método de germinación del esporangio. *Phytophthora* generalmente al germinar no forma una

vesícula como ocurre en *Pythium* y si se formara, las zoosporas se diferencian dentro del esporangio y pasan a la vesícula como zoosporas maduras (ALEXOPOULOS y MIMS, 1979).

El comportamiento de las distintas especies de *Phytophthora* que producen las pudriciones de la raíz de las plantas casi siempre es bastante semejante. El hongo inverna en forma de oosporas, damidosporas o micelio en el suelo o en las raíces que ha infectado. En la primavera, las oosporas y las damidosporas germinan en forma de zoosporas, mientras que el micelio prosigue su desarrollo y/o produce zoosporangios que liberan zoosporas. Estas últimas nadan en el agua del suelo en torno a las raíces y las infectan al entrar en contacto con ellas, si las plantas son susceptibles. El hongo forma más micelio y zoosporas en climas húmedos y moderadamente fríos y disemina la enfermedad a otras plantas. En climas secos, cálidos o incluso demasiado fríos, el hongo sobrevive en forma de oosporas, damidosporas o micelio, que puede una vez más iniciar nuevas infecciones cuando el suelo se encuentra húmedo y la temperatura es favorable (AGRIOS, 1985).

2.1.2.4. *Phytophthora cinnamomi* Rands

La tristeza del palto es causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, hongo que pertenece a la clase Oomycetes, debido a que posee las estructuras características de éstos. Este hongo pertenece al grupo IV, dentro de las especies de *Phytophthora* (STAMPS *et al.*, 1990). Las características de sus principales estructuras son las siguientes :

Micelio : No presenta septos y su principal característica que sirve para diferenciarla de otras especies de *Phytophthora* la constituyen sus hifas con hinchazones, las que adquieren un aspecto botrioso a coraliforme y son formadas más profusamente que por la mayoría de las otras especies de *Phytophthora* (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

Esporangios: Posee esporangios no papilados de forma ovoide, piriforme o elipsoidal a elongado-elipsoidal con un ápice compacto, no sobresaliente. Se estrechan o redondean hacia la base, son no caducos y nacen en el extremo terminal (ERWIN y RIBEIRO, 1996). Miden en promedio 75 μm de largo y 40 μm de ancho, aunque esto último es variable (HO y ZENTMYER, 1977), Posee también zoosporas móviles con una marcada habilidad para sintetizar una pared celular enquistada en pocos minutos (BARTNICKI-GARCIA y WANG, 1983). Una completa diferenciación ocurre dentro del esporangio antes de que éstas sean liberadas a través de éste (GISI, 1983). Estas únicas unidades naturalmente infectivas proveen un potencial de enfermedad grande y explosivo (ZENTMYER, 1983).

Clamidosporas : Son estructuras de sobrevivencia que se forman abundantemente en cultivos y tejidos infectados. Poseen un diámetro promedio de 41 μm (RANOS, 1922, citado por ERWIN y RIBEIRO, 1996). Son globosas y de paredes delgadas (ZENTMYER, 1980). Pueden ser terminales o intercalares en el micelio y a menudo aparecen como racimos de uvas de 3-10 clamidosporas (ERWIN y RIBEIRO, 1996), Estas estructuras son eventualmente liberadas en el suelo donde persisten por períodos prolongados. Germinan a través de varios tubos germinativos (COFFEY, 1991).

Órganos sexuales :Esta especie es heterotálica, las oosporas se forman cuando los tipos A1 y A2 se aparean (HAASIS y NELSON, 1963; GALINDO y ZENTMYER, 1964; ZENTMYER *et al.*, 1979). El tipo A2 es más ampliamente distribuido a nivel mundial que el tipo A1 (ZENTMYER, 1980). Las oosporas se pueden formar sin fertilización en cultivos del tipo A2 cuando es incubado en extractos de raíces (ZENTMYER, 1952; ZAKI *et al.*, 1983), en tejidos de raíces de palto enfermos (MIRCETICH y ZENTMYER, 1966) o en granos de avena (ROYLE y HICKMAN, 1964). La producción de oosporas puede ser estimulada por el hongo *Trichoderma viridae* (REEVES y JACKSON, 1972). Los anteridios son anfígenos y promedian un tamaño de 19*17 μm . Los oogonios son redondos y a menudo con una base estrechada, de pared lisa y hialina, cuyo diámetro promedia 40 μm (ROYLE y HICKMAN, 1964). Durante la fertilización un tubo desde el anteridio penetra el oogonio (HO y ZENTMYER, 1977). Las oosporas son redondas, hialinas a amarillas-cafesosas y su diámetro promedio depende del medio de cultivo, aunque va en un rango de 20-40 μm (RIBEIRO *et al.*, 1975).

Esta especie de *Phytophthora* tiene mayor capacidad para sobrevivir como saprofito que otras especies y puede permener seis años en suelos naturalmente infestados almacenados a 20°C y 20% de humedad. Bajo suelos cultivados con palto, el patógeno puede ser recuperado al cabo de un periodo de diez años. El patógeno puede sobrevivir en suelos húmedos por muchos años, ya sea en raíces alimenticias muertas (las que son muy persistentes en el suelo), como micelio inactivo, clamidosporas u oosporas. Las oosporas se forman en presencia de raíces de palto pero no se encuentran en tejidos naturalmente infectados (ZENTMYER y MIRCETICH, 1966). El agua libre no es esencial para la producción de clamidosporas y oosporas de *P. cinnamomi*, aunque estas esporas pueden ser producidas en medio líquido (MIRCETICH y ZENTMYER, 1967 ; RIBEIRO, ZENTMYER y ERWIN, 1976)

2.1.3, Ciclo de la enfermedad y epidemiología

Una plantación de paltos puede ser afectada por la pudrición de raíces si el suelo contiene el hongo *Phytophthora cinnamomi*, asociado con periodos de exceso de humedad del suelo. El patógeno comúnmente llega a ser activo como resultado de pobre drenaje del suelo, sobrerriego o lluvia excesiva (ZENTMYER, MENGE y OHR, 1994).

El patógeno puede ser diseminado de varias maneras, incluyendo movimiento del suelo en vivero, por el agua, la que puede llevar zoosporas y otros propágulos e infectar trozos de raíces, y muy ocasionalmente por semillas provenientes de frutos infectados (ZENTMYER, MENGE y OHR, 1994). SHEA (1975), comentó que la mayor propagación de *Phytophthora dnnamomi* ocurre por la actividad del hombre, por ejemplo, por el acceso vehicular que lleva la enfermedad a zonas no infestadas. Otras vías de diseminación consiste en el transporte de cualquier tipo de material vegetal, equipos de cultivo, zapatos, botas o animales que lleven suelo y la comercialización de plantas enfermas (ZENTMYER, 1980).

La humedad del suelo es un factor clave en el ciclo de la enfermedad. El alto contenido de humedad del suelo provee la condición de agua libre favoreciendo la liberación de zoosporas desde los esporangios. El agua libre facilita el movimiento de las zoosporas móviles hacia la superficie de las raicillas absorbentes. La liberación de exudados radiculares crea un gradiente quimiotáxico capaz de atraer un gran número de zoosporas (COFFEY, 1991). La atracción primaria es aparentemente por aminoácidos exudados de las raíces de esa área. Siguiendo a la atracción y enquistamiento de las zoosporas sobre raíces de palto susceptibles, la invasión toma lugar rápidamente a través de penetración Ínter e intracelular. La

lesión aparece en 24 horas y el micelio es encontrado a lo largo de las raicillas dentro de 72 horas (ZENTMYER, MENGE y OHR, 1994). Así, rápidamente viene la infección y muerte de raicillas, y esporangios y clamidosporas pueden ser formados en pocos días en el hospedero, perpetuándose el ciclo de la enfermedad (COFFEY, 1991).

La pudrición de raíces puede atacar árboles de todas las edades incluyendo árboles jóvenes de vivero sobre portainjertos tolerantes. Es más grave en suelos pesados y livianos con drenaje impedido por un subsuelo de arcilla o roca. Tanto la excesiva humedad del suelo como las condiciones de estrés por sequía pueden acelerar los síntomas de la enfermedad. Los síntomas más evidentes en palto son el decaimiento o muerte del follaje. Las hojas son pequeñas, pálidas o amarillentas y a menudo parecen marchitas. Ocurre una progresiva defoliación en árboles, manifestando una apariencia rala. Una carencia de nuevos crecimientos es típica de árboles en etapas avanzadas de la enfermedad. Luego de aparecer los síntomas, los árboles pueden tener cosechas elevadas de fruta de pequeño tamaño. Ocasionalmente pueden morir ramas enteras. El aspecto de las raíces también se diferencia de raíces sanas. Al principio de la enfermedad, muchas raicillas alimenticias se ennegrecen y se vuelven quebradizas. Otras tienen lesiones pardeadas desde las cuales el hongo *P. dnamomi* puede ser aislado (COFFEY, 1991).

2.1.4. Condiciones predisponentes de la enfermedad

2.1.4.1. Humedad del suelo

La humedad del suelo es el factor ambiental primario que influye en el desarrollo de la pudrición de raíces causada por *Phytophthora tinnamomi*, en cuanto a crecimiento, esporulación y proceso de infección resultante. La relación entre exceso de humedad del suelo ($*P_m=0$) y el desarrollo de la enfermedad ha sido reconocida hace muchos años. La alta humedad del suelo aumenta la infección principalmente debido al incremento de la formación de esporangios y las condiciones apropiadas para la liberación de zoosporas, movilidad y movimiento al sitio de infección. El estrés por exceso o falta de humedad y exceso de sales también puede incrementar la susceptibilidad de algunos hospederos a la infección (ZENTMYER, MENGE y OHR, 1994). KUAN y ERWIN (1980) estudiaron el efecto de predisposición de la saturación de agua del suelo sobre la pudrición de raíces ocasionada por *Phytophthora* en alfalfa, y concluyeron que ésta se debe al incremento del daño a las raíces y consecuente exudación de nutrientes, lo que incrementa la atracción quimiotáctica de zoosporas a la zona de las raíces. Por otra parte, el incremento de la exudación de raíces siguiente a un estrés hídrico puede mejorar el establecimiento inicial de patógenos del suelo en raíces (KATZNELSON, ROUATT y PAYNE, 1955).

P. cinnamomi sólo forma esporangios en cultivos líquidos, tal como en extractos de suelo (MEHRLICH, 1935), en solución salina (CHEN y ZENTMYER, 1970) y en raíces enfermas en agua. Según WATERHOUSE (1963), citado por ZENTMYER (1980), *P. cinnamomi* "raramente o nunca" forma esporangios en medio sólido.

Debido a que es un patógeno de raíces, comúnmente encuentra agua en el suelo como una parte significativa de su ambiente.

Dentro del género *Phytophthora*, las distintas especies responden de diferente manera a las condiciones ambientales y particularmente a los cambios de potencial métrico y temperatura. El potencial métrico (Ψ_m) es un componente del potencial hídrico (Ψ_h), cuyo valor es el más afectado al variar el contenido de humedad del suelo y representa una reducción del potencial hídrico debido a las fuerzas de absorción y capilaridad de las partículas del suelo. Debido a que la formación de esporangios puede darse aéreamente, los valores de potencial métrico en el suelo óptimos para esta actividad representan un compromiso entre sus requerimientos de agua y aireación (DUNIWAY, 1975; GISL, ZENTMYER y KLURE, 1980). Sin embargo, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. megasperma* y *P. cactorum*, son capaces de formar esporangios en un rango de potencial métrico más amplio del que predomina en la agricultura (DUNIWAY, 1983). Existe una correlación entre el número de esporangios producidos por *Phytophthora cinnamomi* y el potencial métrico del suelo. NESBITT, MALAJCZUK y GLEEN (1979) encontraron muy pocos esporangios producidos en masas de hifas de *P. cinnamomi* incubadas por seis días en suelos con un nivel de humedad correspondiente al doble de capacidad de campo, mientras que los esporangios fueron abundantes en suelo a capacidad de campo. Ellos sugieren que la pobre especulación en el suelo inundado puede deberse a la baja concentración de oxígeno.

DUNIWAY (1975), en un estudio sobre germinación indirecta de esporangios (liberación de zoosporas) de *P. dreschleri*, concluyó que el suelo saturado no es absolutamente necesario pero facilita la liberación de zoosporas. La textura del suelo y el contenido de agua, al igual que el Ψ_m , pueden afectar la germinación indirecta de esporangios.

Por otra parte, la humedad del suelo es un factor crítico en relación a la infección por *Phytophthora*. Un incremento marcado de las unidades de propágulos puede ocurrir en un corto tiempo cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables. Un gran número de investigaciones han demostrado que las zoosporas son atraídas por las raíces, nadan hacia ellas y se enquistan sobre las mismas, produciéndose la infección en agua, en solución de nutrientes o en el suelo (ZENTMYER, 1980).

En suelos de textura fina, la duración de la saturación para infección de zoosporas de *P. cryptogea* depende de la distancia al hospedero, resistencia del hospedero, movilidad de las zoosporas y temperatura del suelo, entre otros factores (DUNIWAY, 1976). Si son requeridos largos períodos de saturación, esta información puede ayudar a prevenir la enfermedad diseñando prácticas de riego y drenaje que reduzcan la dispersión efectiva de zoosporas (DUNIWAY, 1983).

2.1.4.2. Temperatura

La especie *Phytophthora cinnamomi* tiene un rango angosto de temperatura en el cual puede formar esporangios, lo que limita su actividad patogénica a ciertas estaciones del año (ZENTMYER, 1980). Se ha notado que la liberación de zoosporas del esporangios se favorece con temperaturas de 20-25°C (GISI, ZENTMYER y KLURE, 1980).

La infección por *P. cinnamomi* es óptima a temperaturas de suelo de 21-30°C, mientras que hay poca o nula infección a 33°C o a 9-12°C. Estas temperaturas coinciden con las de la curva de crecimiento del hongo. La respuesta de crecimiento

de plántulas de palto a temperaturas de suelo es casi similar a aquellas del desarrollo de la enfermedad y crecimiento del hongo, con la excepción de que los paltos crecen bien a 33°C (ZENTMYER, MENGE y OHR, 1994).

El micelio de *P. cinnamomi* en agar "cornmeal" y clamidosporas en suelo naturalmente infestado son inactivadas a temperaturas bajo 0°C. La velocidad de inactivación está directamente relacionada al número de grados bajo cero. La inactivación del micelio ocurre en 2, 6 o 16 días a -6.7, -3.8 y -1.4 °C, respectivamente (BENSON, 1982).

El patógeno también puede sobrevivir en el suelo como oosporas, estructuras que son el resultado de la unión sexual del anteridio con el oogonio, cuyas temperaturas de formación son más bajas que las de crecimiento o formación de otros tipos de esporas y oscilan entre 15-21°C en cruzamientos y 18-24°C en extractos de raíces. Los gametangios son formados entre 9-33°C pero las oosporas sólo entre 15-30°C. La temperatura no afecta el tamaño de las esporas sexuales pero sí afecta la velocidad de desarrollo y el número de oosporas producidas (ZENTMYER, 1980).

2.1.4.3. Aireación

La aireación, en conjunto con la humedad, es un factor importante en la formación de esporangios (ZENTMYER, 1980). MITCHELL y ZENTMYER (1971) reportaron que la producción de esporangios por varias especies de *Phytophthora* es inhibida por bajas concentraciones de oxígeno (O₂) y también por altas concentraciones de anhídrido carbónico (CO₂). Sin embargo, *Phytophthora cinnamomi* no es favorecida por ninguno de los tratamientos, debido a que necesita un medio líquido para la

formación de esporangios. DUNIWAY (1975) acentuó la influencia de la aireación en la formación de esporangios por *P. dreschleri*. Los esporangios fueron formados sobre la superficie del suelo saturado, pero no a profundidades de 5 mm en suelos saturados o cerca de la saturación ($\Psi_m = -0,01$ bar).

Sin embargo, el rango de tolerancia de *P. cinnamomi* a niveles de O_2 y CO_2 , es amplio y algunos datos indican que es un hongo menos aeróbico que los demás patógenos comunes del suelo como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium roffsii* y *Phytophthora cactomm* (DURBIN, 1959).

Por otra parte, MITCHELL y ZENTMYER (1971) encontraron que la producción de oosporas de *P. cinnamomi* y algunas otras especies de *Phytophthora* se incrementaba cuando el O_2 era disminuido a 1 y 5%, pero disminuía con aumentos del CO_2 , cuando el nivel de O_2 era 1, 5 o 20%.

CURTÍS y ZENTMYER (1949) informaron que *P. cinnamomi* invade raíces de palto más activa y efectivamente en solución de nutrientes cuando éstas son burbujeadas con aire que cuando es usada una mezcla nitrógeno/aire para proveer bajas concentraciones de oxígeno. Reduciendo el contenido de O_2 de la solución aireada se reduce la rapidez del desarrollo de la enfermedad. El ataque más rápido del hongo ocurre a altos niveles de O_2 (6,8-7,2 ppm o 15-16% O_2). A este nivel la pudrición de raíces ocurre en dos días. Una larga exposición a concentraciones muy bajas de O_2 (0,05-0,5 ppm) resulta en muerte de las plántulas, lo que indica la inutilización de estas concentraciones como control de *P. cinnamomi* en paltos afectados.

Al existir una baja proporción de oxígeno en el suelo se produce un fenómeno llamado asfixia radicular. Este determina una respiración anaerobia intramolecular en tejidos radicales, que promueve la formación de productos como anhídrido carbónico, aldehído acético, alcohol etílico, ácido láctico y otros, que resultan tóxicos para las propias raíces. La baja proporción de oxígeno en el suelo puede deberse a un exceso de agua, elevado porcentaje de arcilla o de elementos muy finos, plantaciones a demasiada profundidad, compactación del terreno, entre otros (DURAN, 1976).

El efecto independiente de la aireación sobre el desarrollo de la pudrición de raíces es difícil o imposible de determinar, ya que siempre envuelve una interacción entre aireación y humedad del suelo, y también puede influir la temperatura. Por esta razón, se analizará la interacción de estos factores en el siguiente punto.

2.1.4.4. Interacciones en el suelo

HEPTING (1964), citado por ZENTMYER (1980), resumió varias condiciones ambientales que pueden influir el desarrollo de la tristeza del palto. Su resumen indicó las interacciones de varios factores, incluyendo observaciones de que la infección era leve a temperaturas menores a 15°C o superiores de 34°C, la humedad libre del suelo era necesaria para largos períodos de infección, el daño era raro en suelos livianos y común en suelos húmedos pesados, la supervivencia era pobre en suelos secos por largos períodos y el rango de pH para crecimiento del hongo y para infección era de 4-8.

SHEA (1975), estudiando la interacción de la humedad del suelo y la temperatura en relación a la pudrición de raíces en *Eucalyptus marginata* del Oeste de Australia, encontró que los niveles de humedad equivalentes a capacidad de campo y temperaturas de suelo de 15°C eran los límites críticos bajo los cuales la infección por *P. cinnamomi* no toma lugar.

STOLZY *et al.* (1967) estudiaron relaciones entre *P. cinnamomi*, suelo saturado, y baja concentración de oxígeno, y concluyeron que la infección ocurre en paltos similar a lo que ocurre en cítricos. En presencia de niveles de baja concentración de oxígeno (O₂) y suelo saturado pero con aireación, se permite el desarrollo de zoosporas y la infección. Sin embargo, el palto difiere de los cítricos en que no regenera raíces tan pronto después del daño. Estos investigadores concluyeron que los tres factores ya mencionados contribuían al decaimiento de los árboles y aunque el hongo podía ser controlado, puede resultar una considerable pudrición de raíces bajo una larga exposición a suelos saturados y bajo nivel de oxígeno. La corrección de condiciones no favorables en ausencia del hongo resulta en nuevos crecimientos y recuperación del árbol. En presencia del hongo, la pudrición de raíces puede ocurrir sobre un amplio rango de niveles de O₂ si las condiciones de humedad favorecen al hongo. Finalmente, concluyeron que los niveles de humedad conducen a que la pudrición de raíces ocurra primariamente bajo condiciones de drenaje restringido del suelo, por esto, con palto, la selección de tipos de suelo bien drenados es muy importante.

2.2. Antecedentes de estudios realizados:

Algunos experimentos en invernadero sobre la infección de *P. tinnamomi* de plántulas de palto proveen datos en relación a la humedad del suelo y la enfermedad. WAGER (1942) encontró que si las plántulas de palto eran humedecidas normalmente, sin inundación, crecían bien en presencia de *P. cinnamomi*, por al menos seis meses. Si los maceteros eran sumergidos en agua por 24 horas o más , las raíces eran dañadas severamente y pronto se marchitaban y morían. Un período similar de sumergimiento no daña las plántulas en ausencia del hongo. ZENTMYER y KLOTZ (1947) confirmaron los resultados de WAGER en la relación entre *P. cinnamomi* y la enfermedad de decaimiento del parto. En pruebas de invernadero ellos encontraron que las plántulas de palto colapsaban después de dos días de inundación en presencia de *P. cinnamomi*, mientras que se requerían 8-10 días de inundación para dañar plántulas en suelo no infestado.

CASTRO (1990) estudió el efecto de tres niveles hídricos sobre el crecimiento radical y aéreo de plantas de papayo, chirimoyo, lúcumo y palto creciendo en contenedores. Se ensayaron durante ocho meses tres niveles de humedad: normal (cerca a capacidad de campo), volumen de suelo saturado en un 50% y volumen de suelo saturado en un 100%. Con este último volumen, en palto se consiguió un marchitamiento generalizado de las plantas entre los 35-45 días de comenzado el ensayo y la totalidad de las plantas fue eliminada a los 65 días debido a su muerte. El sistema radical de plantas sometidas a inundación en las cuatro especies señaladas fue extremadamente reducido en ramificaciones secundarias y terciarias. Con estos resultados se llegó a una clasificación de sensibilidad a la inundación, donde el palto tomó el segundo lugar como especie muy sensible, después del papayo que fue extremadamente sensible.

SHEA (1975), trabajando en la especie *Eucalyptus marginate*, basó sus experimentos y conclusiones en la premisa de que la "capacidad de campo" es el contenido de humedad del suelo más bajo para la infección. Él notó que las propiedades de retención de agua en el suelo son el principal factor en el síndrome de la enfermedad y presentó curvas características de humedad para varios tipos de suelo usados en esta especie. Un sedimento arcilloso tiene características de retención de humedad favorables para la actividad de *P. cinnamomi*, manteniendo altos niveles de humedad entre lluvias y teniendo un rango de tamaños de poros que quedan llenos con agua y pueden permitir movimiento de zoosporas. Grava arcillosa y suelos arenosos son mucho menos favorables para la actividad de *P. cinnamomi*.

TORGESON (1954) encontró que la pudrición de raíces de coníferas en vivero, causada por *P. cinnamomi* se propaga más rápidamente en suelos de textura media, aparentemente por las condiciones favorables de humedad. En estas pruebas, el desarrollo de la enfermedad fue mejorado por la alta humedad del suelo, con 86 y 83 % de raíces necróticas en plantas mantenidas a 90 y 65 % de saturación, respectivamente, comparado al 53% de raíces necróticas cuando la humedad fue mantenida a 40% de saturación.

STERNE, ZENTMYER y KAUFMANN (1977), trabajando con *P. cinnamomi* en una especie afín, *Persea indica*, establecieron la influencia del potencial mátrico y osmótico del suelo en relación a la enfermedad en raíces. De acuerdo a los potenciales evaluados determinaron que la severidad de la enfermedad era función del potencial mátrico y no del osmótico, en donde la enfermedad es máxima con potenciales mátricos cercanos a cero, es decir, saturación.

Estudios en cerezo realizados con otras especies de *Phytophthora*, *P. cryptogea* y *P. megasperma*, señalan un incremento de la incidencia y severidad de la enfermedad al inundar el suelo por periodos de 8, 12, 24 y 48 horas, cada dos semanas. Esto puede relacionarse con el incremento de periodos de disponibilidad de O₂ reducida, ya que en otro tratamiento realizado que consistía en dar seis horas de inundación seguido de 42 horas a 0.5% de O₂ en el suelo, se obtiene un rango de enfermedad comparable al que ocurre con 48 horas de inundación continua (WILCOX y MIRCETICH, 1985). Otro estudio en la misma especie, usando portainjerto Mahaleb indica que la saturación periódica y prolongada favorece la pudrición de cuello y raíces ocasionada por *Phytophthora cambivora* y *Phytophthora* sp. y que el manejo del agua en el suelo puede minimizar las pérdidas debido a estas enfermedades, dependiendo del portainjerto y la especie de hongo envuelta (WILCOX y MIRCETICH, 1979).

Un experimento realizado con cuatro portainjertos clónales de manzano creciendo en un medio infestado con *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cryptogea* o *P. megasperma*, causantes de la pudrición de raíces y cuello del manzano, al ser inundados por periodos de 0, 24, 48 y 72 horas cada siete días, por cuatro meses, desarrollaron una pudrición de cuello de 2,5, 6.3, 19 y 50%, respectivamente. Esto demuestra un aumento de la incidencia de la enfermedad al aumentar la duración del periodo de inundación (WILCOX, 1993). Por otra parte, BROWNE y MIRCETICH (1988) encontraron que la severidad de la enfermedad causada por *P. cryptogea* en manzanos cv. Delicious se incrementa progresivamente al aumentar la duración del periodo de inundación de 4 a 48 horas, desde poco severa (1% de pudrición de raíces), a severa (52% de pudrición de raíces). En cambio, la severidad de la enfermedad causada por *P. cactorum* y *P. cambivora* fue moderada (13-46%), y severa (80-89%), respectivamente, y no fue altamente correlacionada con la duración del periodo de inundación.

La saturación previa a la inoculación favorece la pudrición de raíces provocada por *Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis*, donde al saturar el suelo una semana antes, el índice de la enfermedad aumentó de 2,5 a 4,8 (escala de 1-5), con respecto a plantas no saturadas previamente. Los resultados indican que la saturación de agua del suelo predispone a las raíces de alfalfa a la pudrición por incremento del daño a las raíces y la exudación de nutrientes lo cual incrementa la atracción quimiotáctica de zoosporas a las raíces (KUAN y ERWIN, 1980).

En pimentón (*Capsicum annuum*), la mortalidad de plantas por *Phytophthora capsici* se incrementa a medida que aumentan los períodos de inundación de 24 horas a intervalos de 10 días y también al incrementar el potencial métrico del suelo de -125 mb a -25 mb (BOWER Y MITCHELL, 1989). Por otra parte, BERNHARDT y GROGAN (1982) indican que *P. parasítica* y *P. capsici* pueden producir esporangios en tejidos infectados cuando el suelo tiene contenidos de humedad que varían entre capacidad de campo y saturación y cuando éste es humedecido continuamente.

Un estudio realizado en Florida acerca del efecto de la inundación y la pudrición de raíces por *Phytophthora cinnamomi* sobre el intercambio neto de gases de palto dio como resultado que este parámetro y la acumulación de biomasa son altamente reducidos por la pudrición de raíces y la inundación, y el efecto combinado de estos factores es usualmente aditivo. El intercambio neto de gases disminuye a los tres días después del comienzo de la inundación (usualmente 2-3 días antes del marchitamiento de las plantas), dedina aún más rápidamente para plantas con pudrición de raíces, y es correlacionado negativamente con la severidad de la pudrición de raíces (PLOETZ y SCHAFFER, 1992).

Por otra parte, es sabido que existe una estrecha relación entre exceso de humedad del suelo y desarrollo de la pudrición de raíces por *P. cinnamomi* en palto pero es importante conocer que la frecuencia de riego hace que la severidad de la enfermedad sea mayor o menor, al permitir una mayor o menor acumulación de agua en el suelo. En un experimento con plantas de patto inoculadas con *P. cinnamomi*, de cinco años de edad, creciendo en suelos poco profundos y con un horizonte arcilloso denso a 10-24 pulgadas de profundidad, se utilizaron dos frecuencias de riego distintas pero usando la misma lámina. Las frecuencias fueron cada una y dos semanas. Se observó que en un año, el 100% de los árboles regados semanalmente mostraron síntomas de pudrición de raíces, mientras que sólo el 40% de los árboles regados cada dos semanas se afectaron (ZENTMYER y RICHARDS, 1952). En un estudio realizado en cítricos se demostró que al reducir los intervalos de tiempo entre riegos y, por lo tanto, mantener el suelo saturado por más tiempo, se incrementa el número de oportunidades posibles para producción de esporangios previo a la saturación, y liberación de zoosporas después de la saturación, lo cual puede incrementar el nivel de inoculo (LUTZ, MENGE y BENDER, 1988).

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Ubicación del ensayo:

La investigación se llevó a cabo en dos invernaderos pertenecientes a la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, ubicada en La Palma, Quillota, V región de Valparaíso. El primer invernadero posee control de temperatura y tiene una superficie de 40 m², el segundo es de construcción tradicional, de plástico y abarca una superficie de 72 m². El ensayo se realizó desde mayo a diciembre de 1997.

3.2. Recursos suelo y agua:

En este ensayo se cultivaron plantas en maceta por lo que se usó un sustrato de arena+turba en proporción 1:1, previamente esterilizado al vapor en caldera y fertilizado. Este sustrato se utilizó tanto en la germinación de plántulas como también en el trasplante posterior, debido a sus excelentes cualidades de drenaje y materia orgánica, principalmente.

El agua de riego proviene de un pozo aledaño y es de pH neutro, posee 0,6 mmhos/cm de conductividad eléctrica y 340 ppm de carbonates. Los parámetros más importantes, que son la conductividad eléctrica y el pH, están en un rango apropiado para paltos. La cantidad de carbonates es muy alta, pero no presenta mayores limitantes debido a las características del sustrato.

3.3. Material vegetal y su tratamiento:

Se utilizaron cien semillas de la especie *Persea americana* Mill cv. Mexicola, la cual es usada como portainjerto. Éstas se obtuvieron a fines de abril. Para mejorar la germinación, se les removió la testa y se realizó un corte apical de 1,5 cm. Luego se realizó un tratamiento en agua caliente a 45-48°C durante 2-3 minutos para evitar la infección por *Phytophthora cinnamomi* y se sumergieron en una solución fungicida de Captan en dosis de 2,3 g/l de producto comercial. Luego de la desinfección, las semillas de *Persea americana* Mill cv. Mexicola se pusieron a germinar sobre un sustrato de turba y arena fina en proporción 1:1, previamente esterilizado mediante vaporización, en vasos de 250 ml de capacidad, individualmente, tapándolos con un plástico para aumentar la temperatura del sustrato y evitar la pérdida de humedad. Los vasos fueron mantenidos en invernadero. Esto se realizó a inicios de mayo (05/05/97), y germinaron a mediados de junio. El trasplante a macetas de mayor capacidad (4 litros), se realizó a fines de julio, cuando habían copado el espacio del recipiente y se traspasaron al invernadero no climatizado.

3.4. Producción de inóculo e inoculación:

El inóculo utilizado se obtuvo de tres fuentes : 1°) aislamiento n° 481 de la colección de hongos del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, proporcionado por el Dr. Bernardo Latorre, Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile, 2°) aislamiento n° 475 de la colección de hongos del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, obtenido de palto de vivero enfermo y, 3°) aislamientos n° 523 y 524 de la colección de hongos del mismo

laboratorio obtenido de paltos adultos enfermos de la Estación Experimental La Palma, Quillota.

Para identificar a la especie *Phytophthora cinnamomi* como causante de la pudrición de raicillas en palto, se realizaron aislamientos desde raicillas de paltos enfermos extrayendo trozos de raíces desde la zona de avance del patógeno para cultivarlos en un medio selectivo a éste (PioPV, Anexo 1). Para la obtención de esporangios de *Phytophthora*, se sumergieron trozos de micelio en jugo de zanahoria por 36 horas, expuestos a la luz. Luego se eliminó este jugo para mantener los trozos durante tres minutos en solución salina (Anexo 2) y luego se mantuvo en extracto de suelo por 48 hr bajo luz. El extracto de suelo se preparó poniendo en una matraz de Erlenmeyer un poco de suelo con suficiente actividad de microorganismos y materia orgánica, agregándole agua destilada y dejándolo reposar por 24 horas para luego filtrar esta solución con papel filtro. Siguiendo todo este proceso se pudo observar al microscopio óptico e identificar esporangios de *Phytophthora cinnamomi*, por sus características propias de forma y tamaño.

Además de todo el proceso señalado anteriormente, se realizó en forma previa la caracterización de las hifas de aspecto coraloide, características de esta especie.

Por tratarse de *Phytophthora dnnamorni*, especie heterotálica, se realizaron cruzamientos entre cepas para saber si éstas eran tipo A1 o A2. Estos se efectuaron con cepas previamente identificadas como tipo A1 y A2, usando un medio de cultivo de agar jugo V-8 clarificado. Las placas de Petri que contenían el medio de cultivo se dividieron en la mitad a través del trazado de una línea, repicando una cepa a cada lado: cepas tipo A1 con cada una de las cepas a identificar y cepa tipo A2 con cada una de las cepas a identificar.

La preparación del inóculo se realizó repicando el hongo desde placas de Petri que ya contenían cada una de las cepas a utilizar, llegando a obtener 60 placas. A la semana siguiente al repique, al observar crecimiento del micelio, se sumergieron trozos de agar con crecimiento de micelio en seis litros de jugo de zanahoria, dejándolo por una semana tapados con parafilm y en presencia de luz, logrando un mayor volumen micelial. Luego se procedió al lavado del micelio para traspasarlo a la misma cantidad de agua estéril y se fragmentó la solución en juguera. Posteriormente, para obtener una solución homogénea se midió la concentración de propágulos /mi en microscopio óptico, llegando a una solución de $1 \cdot 10^6$ propágulos por mi.

La inoculación se realizó en primavera (16 de septiembre), para asegurar las condiciones favorables para infección, colocando 200 mi de la solución por maceta de 4 litros. La mitad de las plantas del ensayo (20 plantas), fueron inoculadas y al resto se le agregó 200 mi de agua destilada, para luego someter a todas, a los distintos periodos de inundación.

3.5. Inundación:

Las plántulas fueron inundadas por 12, 24, 48 ó 96 horas, cada dos semanas, durante tres meses. Para mantener los periodos de inundación se colocaron las macetas dentro de un macetero de plumavit de mayor capacidad (61), los cuales se llenaron de agua hasta 2 cm sobre el nivel del cuello de la planta. Al terminar el periodo requerido de inundación se dejó drenar el exceso de agua de los maceteros. La primera inundación se realizó el día 29 de septiembre, dos semanas después de la inoculación y así sucesivamente cada dos semanas.

3.6. Riego:

Para regar se determinó el peso del sustrato en saturación, el cual contuvo un 54% de humedad (100% saturación). De éste se dejó perder agua hasta que contenga un 20% de humedad, lo que corresponde a un 36% de la saturación. Según estos porcentajes se calcularon los pesos máximos y mínimos en los cuales deben fluctuar los maceteros. Para este fin, los maceteros se pesaron diariamente en una balanza modelo GSP-15, 15 kg/5 gr, reponiendo el agua faltante a aquellos que habían bajado del 20%. Además se construyó la curva característica de humedad del sustrato (Anexo 3), la cual permitió conocer la tensión límite a la cual se estaba regando, la que correspondió a -0,35 bar. El Cuadro 1 explica lo señalado anteriormente:

CUADRO 1. Cálculo del rango de pesos para regar plantas de palto.

Peso maceta	Peso suelo	Peso total	Peso con agua	
(kg)	seco (kg)	sin agua(kg)	Máx.	Mín.
0,114	2,409	2,523	3,824	3,005

El límite máximo de peso corresponde al peso del suelo seco más un 54% en agua y el peso mínimo corresponde al peso del suelo seco más un 20% en agua. Así, los pesos de los maceteros deben fluctuar entre el rango calculado, y al bajar de 3,005 kg, se vuelve a reponer el peso faltante, hasta llegar a 3,824 kg.

3.7. Fertilización:

Desde el inicio de los tratamientos de inundación se fertilizó con 500 ml de una solución de macronutrientes cada 20 días. La solución incorporada al sustrato consistió en:

- 10 g de nitrato de amonio (NH_4NO_3)
- 5 g de nitrato de calcio (CaNO_3)
- 6 g de nitrato de potasio (KNO_3)
- 25 l de agua

Al sustrato ($0,16 \text{ m}^3$) se le incorporó en forma previa una solución de macro y micronutrientes que contenía los siguientes elementos:

- 266,667 g de Superfosfato triple (SPT) -160 g de carbonato de calcio (CaCO_3) -346,667 g de sulfato de magnesio (MgSO_4) -0,4144 g de ácido bórico (H_3BO_3) -3,52 g de sulfato de cobre (CuSO_4) -11,52 g de sulfato de zinc (ZnSO_4) -8 l de agua

3.8. Diseño estadístico:

Se realizó un diseño al azar con arreglo factorial 2X4, cuyos factores y respectivos niveles fueron: a) planta inoculada y no inoculada, b) inundación durante 0,12,24 y 48 horas.

Se consideraron cuatro repeticiones por tratamiento. El Cuadro 2 indica el orden de los tratamientos.

CUADRO 2. Tratamientos de inoculación/inundación en plantas de palto cv. Mexicola.

Duración de la inundación.	0 hr	12 hr	24 hr	48 hr	96 hr
Planta inoculada	T0	T1	T2	T3	T4
Planta no inoculada	T5	T6	T7	T8	T9

Se planificó de este modo con el propósito de observar el efecto de la interacción entre ambos factores. Además, se realizó una separación de medias por la prueba de comparación múltiple de Duncan a $P=0,05$, para observar las diferencias significativas que pudieran existir entre tratamientos. Al no existir interacción se analizó el factor significativo mediante un t de student (factor inoculación), de dos niveles, o por una prueba de comparación múltiple de Duncan (factor inundación).

El tratamiento correspondiente a 96 horas de inundación no se consideró en el análisis estadístico debido a la alta mortalidad de plantas en los tratamientos inoculados y sólo se analizó y discutió en forma cualitativa.

3.9. Evaluación de los resultados:

Se midieron los siguientes parámetros: porcentaje de pudrición de raicillas, área foliar, número de hojas, diámetro del tallo y altura de la planta.

El área foliar se determinó usando la fórmula de la elipse, debido a la similitud de esta figura con una lámina foliar, la cual es:

$$AF = \frac{1}{2} * E * e * \pi$$

donde, AF= Area foliar (cm²)

E= largo de la hoja (cm)

e= ancho de la hoja (cm)

$\pi = 3.1416$

Para conocer el área foliar total de la planta, se multiplicó este valor con el número de hojas de la planta.

Mediante la comparación de los parámetros con los correspondientes a los testigos, se evaluó la severidad de la enfermedad con respecto a los distintos tiempos de inundación.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Identificación de la especie *Phytophthora cinnamomi* Rands:

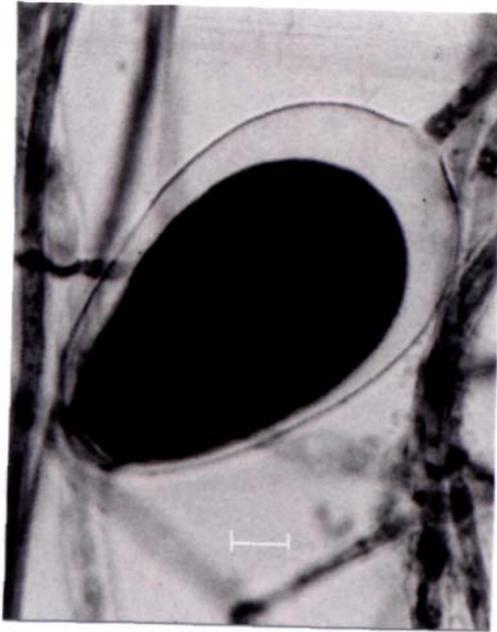
Se logró identificar a la especie *Phytophthora cinnamomi* Rands como causante de la tristeza del palto, a través de la caracterización de sus estructuras reproductivas y somáticas desde el punto de vista macro y microscópico.

La colonia de *Phytophthora cinnamomi* cultivada en medio P₁₀Vp. presentó un micelio blanquecino con crecimiento en forma de camelia, típico de esta especie.

Los esporangios de las diferentes cepas utilizadas en la inoculación fueron medidos al microscopio óptico encontrando un promedio de 63,9 µm de largo y 39,4 µm de ancho. Las medidas de todas las cepas se encuentran en el Anexo 4. La forma de los esporangios es alargada-elipsoidal, son no papilados y posee zoosporas móviles que se diferencian en el esporangio antes de ser liberadas (Figuras 1a y 1b). Estas características coinciden con las descritas para esta especie de *Phytophthora*.

Al observar el micelio de estas cepas, se observaron las típicas hifas coraloides, características de esta especie y la ausencia de septos (Figura 1c).

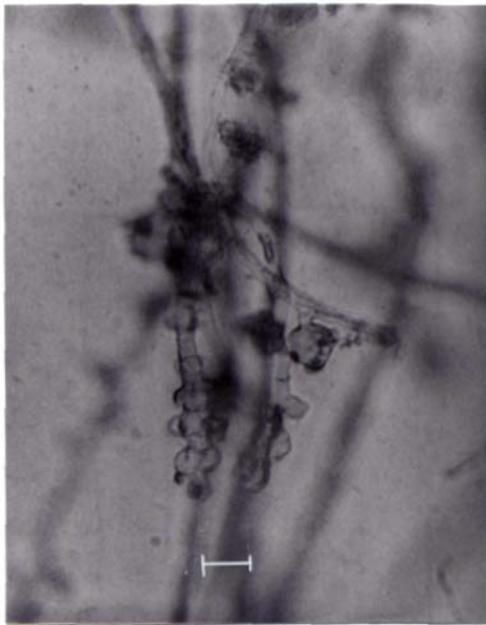
De los cruzamientos efectuados con cepas previamente identificadas como tipo A1 y A2 (proporcionada por Dr. Bernardo Latorre, Pontificia Universidad Católica de Chile), se tuvieron resultados para la cepa n° 475 de la colección del laboratorio de



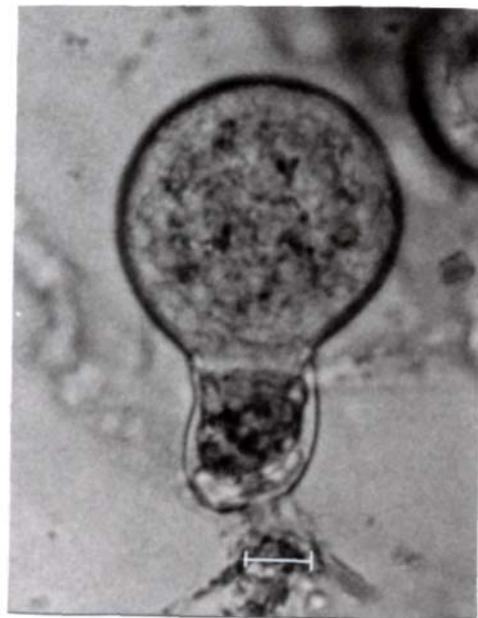
a)



b)



c)



d)

FIGURA 1. Estructuras de *Phytophthora cinnamomi* Rands. a) Esporangio inicial con zoosporas inmaduras, b) esporangio con zoosporas maduras, c) micelio de tipo coraloide, sin septos y d) fertilización entre anteridio y oogonio. Barra=10 μ m.

Fitopatología de la Facultad de Agronomía de La Universidad Católica de Valparaíso, la que demostró pertenecer al tipo A2, el cuál es el más ampliamente distribuido a nivel mundial. En éste se observó la presencia del anteridio en posición anfígena con respecto al oogonio (Figura 1d).

4.2. Evaluación de los tratamientos :

En el experimento realizado durante tres meses para evaluar la severidad de la tristeza del palto causada por *Phytophthora cinnamomi* en relación a distintos períodos de inundación del suelo y del análisis multifactorial efectuado, se obtuvo una interacción no significativa entre los factores inoculación/inundación, al igual que para el factor inundación en la mayoría de los parámetros evaluados. El único factor significativo, en todos los parámetros evaluados fue la inoculación. Sólo en el parámetro área foliar se encontró un efecto significativo del factor inundación. La separación de medias presentó pocas diferencias significativas entre ellas. Los valores correspondientes a los parámetros evaluados en los diferentes tratamientos, se encuentran en el Anexo 5.

Los tratamientos de 96 horas de inundación no fueron considerados en el análisis estadístico. El tratamiento inoculado con 96 horas de inundación (T4) obtuvo una alta mortalidad de plantas. Tres repeticiones de un total de cuatro murieron antes de los tres meses del ensayo. Sus síntomas consistieron en una clorosis progresiva, posterior necrosis de los márgenes de las hojas para terminar en una necrosis generalizada (Figura 2). Al observar las raíces de estas plantas se encontraban necrosadas con fácil desprendimiento de su corteza. Se realizaron aislamientos y se obtuvo en forma consistente *Phytophthora cinnamomi* lo que se comprobó por la observación al microscopio óptico del micelio sin septos y ramificación en ángulo



FIGURA 2. Síntomas de marchitez de plantas en tratamientos inoculados con 96 horas de inundación.

recto.

En el tratamiento no inoculado con 96 horas de inundación (T9) no hubo mortalidad de plantas pero se presentaron ciertos síntomas como menor crecimiento, epinastia de hojas (enrollamiento de los bordes), y clorosis. Esto, debido a una asfixia radicular provocada al inundar el sustrato por un gran número de horas.

La mortalidad de plantas en T4 (tratamiento inoculado con 96 horas de inundación) indica un efecto conjunto de la inoculación y excesiva inundación, ya que no hubo muerte de plantas inoculadas con menos horas de inundación. Esta última induce una asfixia radical, ya que existe una reducida disponibilidad de oxígeno para las raíces necesario para su respiración, por lo que dejan de proporcionar la energía para todas sus funciones como el transporte activo de algunos nutrientes, lo que desencadena un menor desarrollo y consecuente muerte. Además, al generarse una anaerobiosis se forman compuestos tóxicos para las propias raíces. Esta situación de anaerobiosis estimula la acumulación en las raíces de un compuesto precursor del etileno: ACC (ácido 1-aminocidopropano 1-carboxílico). Éste se transporta a la parte aérea y en presencia de oxígeno, se convierte en etileno, el cual produce síntomas como epinastia de hojas y otros (BRADFORD y YANG, 1981).

La inoculación de las plantas tuvo un efecto significativo en todos los parámetros evaluados. Esto se debe a que la presencia del hongo *Phytophthora cinnamomi* en raíces de palto susceptibles desencadena la enfermedad tristeza del palto, al existir períodos de humedad excesiva. El efecto de la inoculación se puede observar en la Figura 3.



FIGURA 3. Diferencias de crecimiento entre plantas inoculadas y no inoculadas, a los 85 días de comenzado el ensayo. Arriba: De izquierda a derecha, plantas no inoculadas con O, 12, 24, 48 y 96 horas de inundación. Abajo: De derecha a izquierda, plantas inoculadas con O, 12, 24, 48 y 96 horas de inundación.

4.2.1. Pudrición de raicillas

Para el parámetro pudrición de raicillas de las plantas de palto cv. Mexicola evaluadas, la separación de medias por el test de Duncan al 5%, arroja diferencias significativas entre los tratamientos T1, T2 y T3 que son inoculados con 12 24 y 48 horas de inundación con los tratamientos no inoculados (T5, T6, T7 y T8) e inoculado sin inundación (T0). Los resultados ya descritos se presentan a continuación en el Cuadro 3.

CUADRO 3. Porcentaje promedio de pudrición de raicillas de paltos cv. Mexicola de siete meses de edad, en tratamientos de inundación/inoculación, a los tres meses de ensayo.

Tratamiento	Porcentaje de pudrición de raicillas (%)
T3 Inoculado/48 hr. Inundación	62.5 a
T1 Inoculado/12 hr. Inundación	55 a
T2 Inoculado/24 hr. Inundación	45 a
T0 Inoculado/0 hr. inundación	12.2 b
T8 No inoculado/48 hr. Inundación	11.3 b
T6 No inoculado/12 hr. Inundación	5 b
T5 No inoculado/0 hr. inundación	3.3 b
T7 No inoculado/24 hr. Inundación	2.5 b

Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de probabilidad $P=0,05$ según test de Duncan.

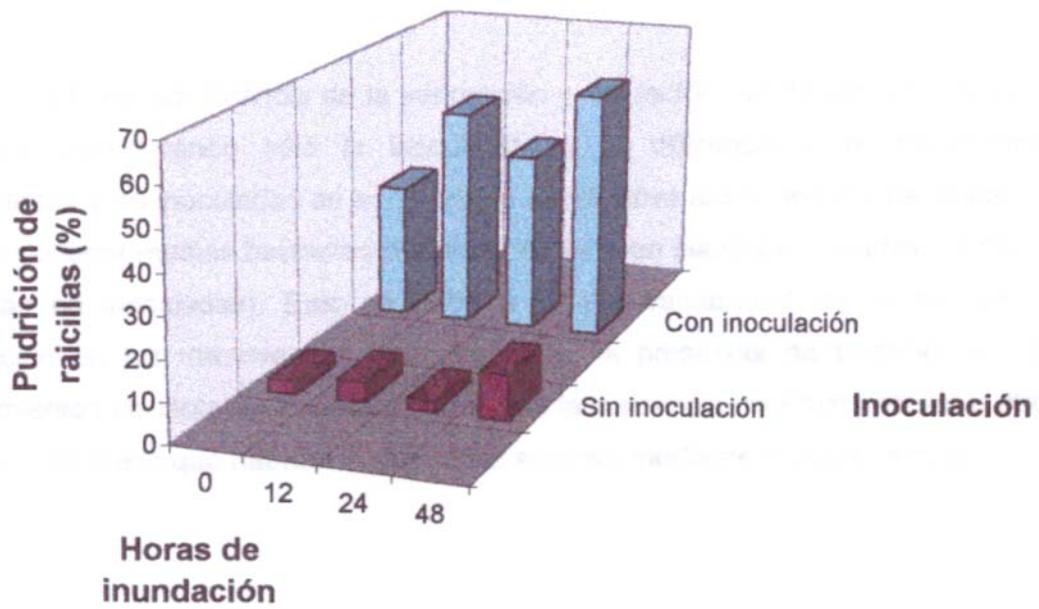


FIGURA 4. Porcentaje promedio de pudrición de raicillas en plantas inoculadas y no inoculadas con distintos períodos de inundación, a los tres meses de ensayo.

El gráfico que presenta las diferencias entre tratamientos de inundación con plantas inoculadas y no inoculadas, con respecto al porcentaje promedio de pudrición de raicillas, se muestra en la Figura 4.

Los resultados de la separación de medias indican claramente el efecto significativo de la inoculación. También se deduce que no es igual estadísticamente inundar y no inundar plantas inoculadas y que una planta inoculada sin inundación no difiere significativamente de una no inoculada con inundación.

Debido a la no significancia de la interacción y del factor inundación, se realizó un análisis considerando sólo la inoculación y la diferencia entre tratamientos inoculados y no inoculados se encontró no significativa al 5% según t de student, a pesar de tener medias bastantes distintas (43,64% en plantas inoculadas y 5,5% en plantas no inoculadas). Esto se debe a la alta variabilidad del porcentaje de pudrición en los tratamientos. Por otra parte, la presencia de pudrición en los tratamientos no inoculados podría deberse a la presencia de *Phytophthora* u otros hongos del suelo que habrían ingresado al sustrato mediante el agua de riego.

4.2.2. Número de hojas.

Para el parámetro número de hojas en las plantas evaluadas, la separación de medias mediante test de Duncan al 5 % indica una diferencia significativa entre los tratamientos inoculados con 12, 24 y 48 horas de inundación (T1, T2 y T3) y el tratamiento testigo, sin inocular y sin inundación (T5). El tratamiento inoculado con 48 horas de inundación (T3) difiere significativamente de todos los tratamientos no inoculados (T5, T6, T7 y T8). El Cuadro 4 presenta lo anteriormente expuesto.

CUADRO 4. Número de hojas de paltos cv. Mexicola de siete meses de edad, en diferentes tratamientos de inundación/inoculación, a los tres meses de ensayo.

Tratamiento	Número de hojas
T5 No inoculado/0 hr. inundación	31.25 a
T6 No inoculado/12 hr. Inundación	29.75 ab
T7 No inoculado/24 hr. Inundación	29.25 ab
T8 No inoculado/48 hr. Inundación	28.50 ab
T0 Inoculado/0 hr. inundación	27.75 abc
T1 Inoculado/12 hr. Inundación	24.75 bc
T2 Inoculado/24 hr. Inundación	24.25 bc
T3 Inoculado/48 hr. Inundación	22.50 c

Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de probabilidad $P= 0,05$ según test de Duncan.

El gráfico que representa los distintos tratamientos en relación al parámetro número de hojas promedio de las plantas, se muestra en la Figura 5.

Al comparar las medias de los tratamientos inoculados con los no inoculados, se observa más claramente el efecto de inoculación, ya que la diferencia entre estos tratamientos es significativa al 5% mediante t de student. De esto se deduce que en los tratamientos inoculados el número de hojas promedio se reduce en un 16,5% con respecto de los no inoculados, como se muestra en el Cuadro 5.

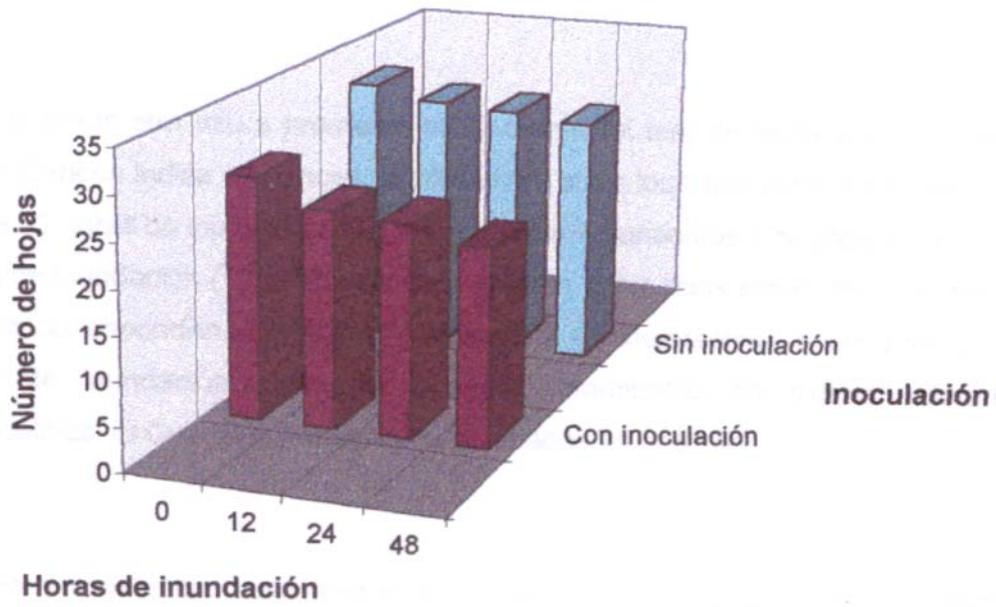


FIGURA 5. Número de hojas promedio de paltos de 7 meses de edad en tratamientos inoculados y no inoculados con distintos periodos de inundación, a los tres meses de ensayo.

CUADRO 5. Número de hojas promedio en plantas de palto inoculadas y no inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* Rands.

Tratamiento	Inoculadas	No inoculadas
Número de hojas	24,8 a	29,7 b
Porcentaje de disminución	16,5	

Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al 5% según t de student.

4.2.3. Altura de la planta

Para el parámetro altura promedio de la planta, el test de separación de medias según Duncan indica diferencias significativas entre los tratamientos sin inoculación de 0 y 12 horas de inundación (T5 y T6) con los tratamientos inoculados con 12 y 24 horas de inundación (T1 y T2). También existen diferencias significativas entre T5 y T3 que corresponden al testigo (sin inocular y sin inundación), e inoculado con 48 horas de inundación. Entre los demás tratamientos no existen diferencias significativas. El Cuadro 6 presenta los resultados ya descritos.

Las diferencias entre tratamientos inoculados y no inoculados, con respecto al parámetro altura promedio de la planta, se presenta en la Figura 6.

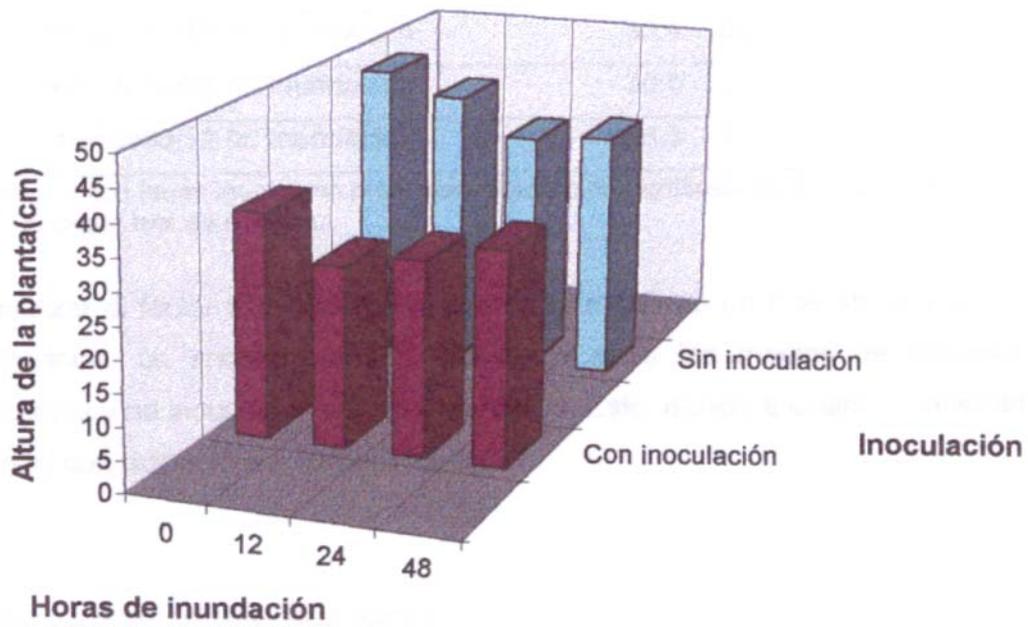


FIGURA 6. Altura promedio de plantas de paltos de siete meses de edad en tratamientos inoculados y no inoculados con distintos períodos de inundación, a los tres meses de ensayo.

CUADRO 6. Altura promedio de paltos cv. Mexicola de siete meses de edad con diferentes tratamientos de inundación/inoculación a los tres meses del ensayo.

Tratamiento	Altura (cm)
T5 No inoculado/0 hr. inundación	47.5 a
T6 No inoculado/12 hr. Inundación	44.1 ab
T8 No inoculado/48 hr. Inundación	39.3 abc
T7 No inoculado/24 hr. Inundación	38.3 abc
T0 Inoculado/0 hr. inundación	35.4 abc
T3 Inoculado/48 hr. Inundación	33.4 bc
T2 Inoculado/24 hr. Inundación	30.5 c
T1 Inoculado/12 hr. Inundación	28.3 c

Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de probabilidad $P= 0,05$ según test de Duncan.

Al analizar el factor significativo (inoculación), mediante un t de student ai 5% de significancia, se encontró que la diferencia entre las medias de tratamientos inoculados y no inoculados era no significativa. Esto, debido a la alta variabilidad del material con respecto a este parámetro.

4.2.4. Diámetro del tallo de la planta

Para el parámetro diámetro promedio del tallo, la separación de medias según test de Duncan al 5 % da diferencias significativas entre los tratamientos testigo (T5) y no inoculado con 48 horas de inundación (T8), con los tratamientos inoculados con 12 y 48 horas de inundación (T1 y T3). Además, el tratamiento inoculado con 48 horas de inundación (T3) tiene diferencias significativas con el tratamiento no

inoculado con 12 horas de inundación (T6). Los resultados de este test se muestran en el Cuadro 7,

CUADRO 7. Diámetro promedio del tallo de palto cv. Mexicola de siete meses de edad en tratamientos de inund./inoculación, a los tres meses de ensayo.

Tratamiento	Diámetro promedio del tallo (cm)
T5 No inoculado/0 hr. inundación	0.80 a
T8 No inoculado/48 hr. Inundación	0.80 a
T6 No inoculado/12 hr. Inundación	0.78 ab
T7 No inoculado/24 hr. Inundación	0.70 abc
T0 Inoculado/0 hr. inundación	0.70 abc
T2 Inoculado/24 hr. Inundación	0.65 abc
T1 Inoculado/12 hr. Inundación	0.60 bc
T3 Inoculado/48 hr. Inundación	0.58 c

Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de probabilidad $P=0,05$ según test de Duncan.

Comparando las medias de tratamientos inoculados y no inoculados, se observa una diferencia significativa entre ambas medias, al 5% de significancia según t de student. De esto se deduce una reducción del 18,2% del diámetro promedio del tallo al inocular plantas con *Phytophthora cinnamomi*, lo que se muestra en el Cuadro 8.

CUADRO 8. Diámetro promedio del tallo en plantas de palto inoculadas y no inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* Rands.

Tratamiento	Inoculadas	No inoculadas
Diámetro promedio (cm)	0,63 a	0,77 b
Porcentaje de disminución	18,2	

Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al 5% según t de student.

La Figura 7 contiene los datos de diámetro promedio del tallo de las plantas con respecto a cada tratamiento,

4.2.5. Área foliar total

El análisis multifactorial para este parámetro dio significativos los factores inundación e inoculación lo que implica que el área foliar se afecta por distintos períodos de inundación y también por la inoculación de las plantas. Sin embargo, la interacción de estos factores no es significativa, es decir, el efecto de ambos factores no es dependiente sino que actúan por separado.

Para el parámetro área foliar total de las plantas evaluadas, el test de Duncan al 5% detecta diferencias significativas entre el testigo (T5) y todos los demás tratamientos, excepto del tratamiento sin inocular con 12 horas de inundación (T6). El T6 y el tratamiento no inoculado con 48 horas de inundación (T8) difieren significativamente de los tratamientos inoculados con 12, 24 y 48 horas de inundación. Cabe destacar que en los tratamientos no inoculados existe una diferencia entre períodos de inundación, ya que el testigo sólo es igual estadísticamente al tratamiento 6, lo que implica que no es lo mismo no inundar que inundar por 24 ó 48 horas. El Cuadro 9 presenta los resultados de la separación de medias.

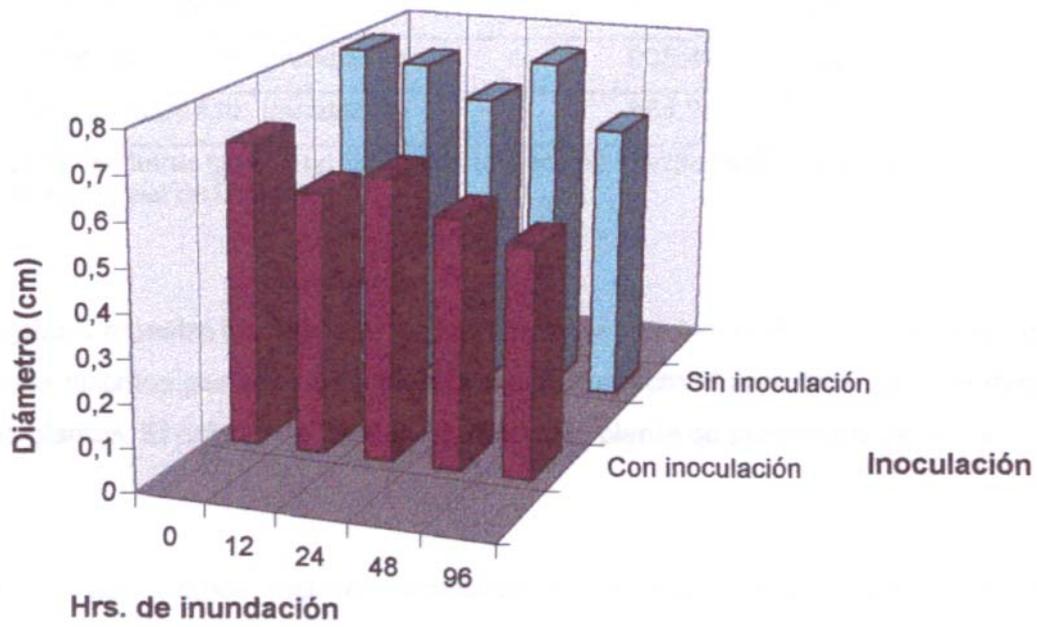


FIGURA 7. Diámetro promedio del tallo de paltos de 7 meses de edad inoculados y no inoculados con distintos períodos de inundación, a los tres meses de ensayo.

CUADRO 9. Area foliar promedio de paltos cv. Mexicola de siete meses de edad, con diferentes tratamientos de inundación/inoculación, a los tres meses de ensayo.

Tratamiento		Área foliar promedio (cm ²)	
T5	No inoculado/0 hr. inundación	2457.39	a
T6	No inoculado/12 hr. Inundación	2003.29	ab
T8	No inoculado/48 hr. Inundación	1718.10	b
T7	No inoculado/24 hr. Inundación	1620.96	bc
T0	Inoculado/0 hr. inundación	1304.98	bcd
T2	Inoculado/24 hr. Inundación	944.05	cd
T1	Inoculado/12 hr. Inundación	905.42	cd
T3	Inoculado/48 hr. Inundación	854.28	d

Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de probabilidad $P=0,05$ según test de Duncan.

La Figura 8 muestra las diferencias entre tratamientos inoculados y no inoculados y entre los distintos períodos de inundación con respecto al área foliar total promedio de las plantas. El cálculo de área foliar total de la planta se presenta en el Anexo 6.

Debido a que ambos factores resultaron significativos para el área foliar, se analizaron en forma independiente. Al comparar las medias de tratamientos inoculados y no inoculados se obtiene no significativa la diferencia entre éstas, según t de student al 5% de significancia. Al comparar las medias de tratamientos con distintos periodos de inundación se observa una diferencia significativa, según Duncan ($P=0,05$), entre no inundar e inundar por 24 horas y no existe diferencia entre inundar por 12 ó 48 horas y no inundar. La inundación por periodos de 24 horas, inciden en una disminución del área foliar de un 39,3 con respecto a los tratamientos sin inundación. Esto último se puede observar en el Cuadro 10.

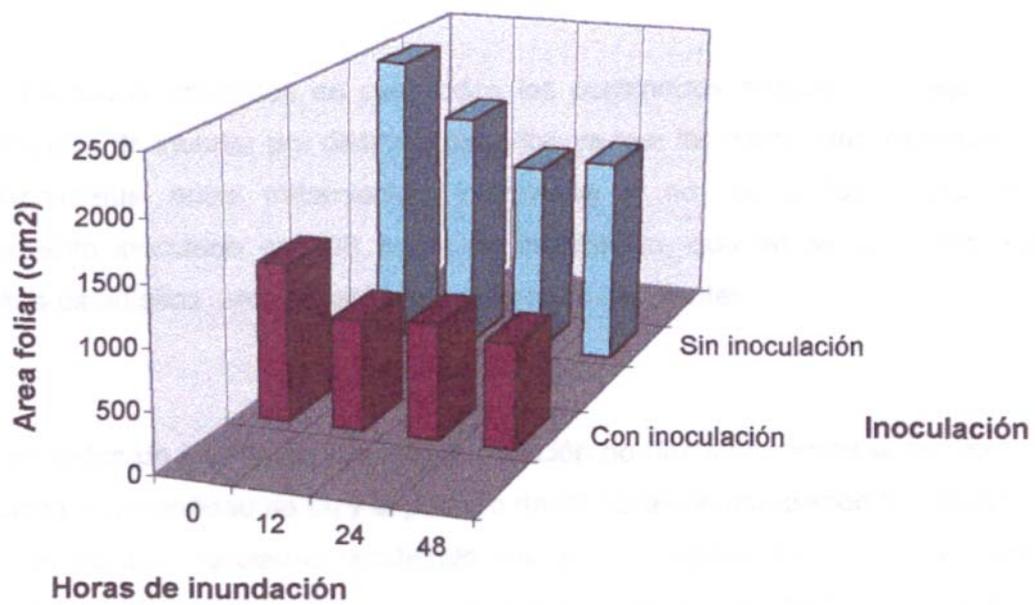


FIGURA 8. Área foliar total promedio de paltos de 7 meses de edad inoculados y no inoculados con distintos periodos de inundación, a los tres meses de ensayo.

CUADRO 10. Diferencias en el área foliar de plantas de palto, a los tres meses de ensayo, en tratamientos de inundación.

Tratamiento	Area foliar (cm ²)	Porcentaje de disminución
Sin inundación	1976,683 a	
Inundación por 12 horas	1454,359 ab	26,4
Inundación por 24 horas	1199,999 b	39,3
Inundación por 48 horas	1286,156 ab	34,9

Los promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al 5% según test de Duncan.

Los resultados obtenidos en casi todos los parámetros evaluados reflejan lo no significativo de inundar por distintos períodos ya que las diferencias se encuentran principalmente entre tratamientos inoculados y no inoculados, salvo en el tratamiento inoculado con 96 horas de inundación, que no se consideró en el análisis estadístico, pero resultó en la muerte de las plantas.

Los períodos de inundación de mayor duración no desfavorecieron al hongo por la reducida disponibilidad de O₂ y el período de 96 horas de inundación fue detrimental para las plantas inoculadas, existiendo una alta mortalidad. Esto puede deberse a que *Phytophthora cinnamomi* es un hongo menos aeróbico que los demás patógenos comunes del suelo como *Rhizoctonia sotani*, *Phytophthora cactorum* y *Sclerotium rolfsii* (DURBIN, 1959). Además, estos resultados concuerdan con estudios realizados en varias especies de *Phytophthora*, probando distintas concentraciones de CO₂ y O₂ donde se llegó a la conclusión de que *Phytophthora cinnamomi* no se favorecía con ninguna de las concentraciones probadas ya que requería de un medio líquido para la formación de esporangios (MITCHELL y ZENTMYER 1971). La pudrición de raíces ocurre en un amplio rango de niveles de O₂ si las condiciones de humedad favorecen al hongo (STOLZY *et al.*, 1967).

Los resultados de este ensayo no coinciden con los entregados por WAGER (1942), quién encontró que plantas de palto inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*, con más de 24 horas de inundación se dañaban severamente y luego se marchitaban y morían. En cambio, plantas regadas normalmente inoculadas con el hongo, se mantenían al menos seis meses sin presentar daños. Esto puede deberse a las condiciones del ensayo, ya que Wager utilizó plantas de dos y tres años y bajo condiciones de campo.

Al no encontrar diferencias significativas entre plantas no sometidas a períodos de inundación y sometidas a éstos se puede pensar que la humedad presente con el riego (cercana a capacidad de campo), es suficiente para mantener cierto nivel de enfermedad si el hongo se encuentra presente. Esto último concuerda con la afirmación de que la capacidad de campo es el contenido de humedad más bajo para la infección por *Phytophthora cinnamomi* (SHEA, 1975). El nivel crítico en el cual las plantas inoculadas colapsan es mantenerlas inundadas por 96 horas. Este nivel de inundación junto a la presencia del hongo determinan un gran potencial de enfermedad acompañado de una asfixia radicular los que implican un estrés irreparable para la planta, terminando en su muerte.

El crecimiento de la parte aérea de la planta depende en gran medida del crecimiento radicular ya que a través de éste se toman los nutrientes y agua necesarios para su metabolismo normal. Al existir un daño a las raíces disminuye la superficie de captación de agua y nutrientes por lo que disminuye el crecimiento aéreo. El hongo *Phytophthora cinnamomi* produce la pudrición de raicillas lo que conlleva un reducido crecimiento además de los síntomas típicos de esta enfermedad, como clorosis, menor número y tamaño de hojas, etc. Esto se puede demostrar con los resultados obtenidos ya que comparando diámetro y número de hojas de plantas inoculadas v/s plantas no inoculadas, se puede observar una

disminución significativa de estos parámetros en plantas inoculadas. PLOETZ y SHAFFER (1992) encontraron que el intercambio neto de gases disminuye a los tres días de inundación de plantas de palto y dedina aún más rápidamente para plantas con pudrición de raíces. Esto último explica la reducción del crecimiento ya que al bajar el intercambio de gases disminuye la fotosíntesis y todo el metabolismo se hace más lento.

En los parámetros número de hojas y diámetro promedio del tallo existieron disminuciones significativas en plantas inoculadas con respecto a no inoculadas. El número de hojas es un parámetro importante ya que éstas son la fábrica de fotosintatos de la planta, y su disminución conlleva una menor disponibilidad de nutrientes para su crecimiento. El diámetro del tallo también constituye un parámetro de evaluación importante ya que las plantas deben alcanzar en esta etapa (siete meses de edad), el diámetro de injertación. El valor mínimo para este diámetro es 0.52 cm y las plantas inoculadas presentaron un promedio de 0.63 cm, lo que representa un 18,2 % de disminución con respecto a plantas no inoculadas. Por consiguiente, plantas con diámetro cercano al mínimo de injertación podrían ser indicio de la presencia de *Phytophthora cinnamomi*. La disminución del 18,2 % del diámetro promedio del tallo puede ser determinante en la decisión de injertar o no esa planta, debido a que podría encontrarse con tristeza.

Por otra parte, el área foliar presentó algunas diferencias significativas entre periodos de inundación y presentó una reducción del 39,3% del área foliar en tratamientos de 24 horas de inundación con respecto a testigos no inundados. Esta disminución de área foliar implica una reducción de crecimiento al reducir el área fotosintética, lo que repercute en una menor producción de fotosintatos y, por consiguiente, una menor proporción de energía necesaria para un funcionamiento normal de la planta.

Los coeficientes de variación de los parámetros altura, diámetro y número de hojas fluctuaron entre 12 y 20 % lo que indica la presencia de material de estudio homogéneo y, por lo tanto, resultados concluyentes. El parámetro área foliar obtuvo un coeficiente de variación del 30,7% lo que no es tan alto como para concluir que el material no sea homogéneo. El único parámetro que presentó un coeficiente de variación excesivamente alto (84,2%), y que supone resultados del estudio poco concluyentes es el parámetro pudrición de raicillas. Esto podría tener su causa en el origen del material con el que se realizó el estudio o en el método de estimación de la pudrición de raicillas. Este último es visual lo que podría significar un cierto grado de subjetividad en la medición. Por otra parte, el material del estudio provenía de semilla lo que conlleva una alta variabilidad genética entre unidades experimentales, ya sea en características propias de la planta, o en una resistencia diferencial a la enfermedad causada por el hongo inoculado: *Phytophthora cinnamomi*. Las características propias de la planta, como son los otros parámetros evaluados (número de hojas, diámetro del tallo, área foliar y altura de la planta), no tuvieron la misma variación que la pudrición de raicillas debido a que en plantas inoculadas lo primero que se afecta son las superficies de las raicillas tornándose de un color pardo oscuro a negro, cuando aún no se ha afectado el tejido vascular encargado de la absorción de agua. Esto último implica que al inicio de la enfermedad se puede observar una alta pudrición de raicillas sin, necesariamente, demostrarse con una marchitez o disminución de crecimiento de la parte aérea.

Debido a los resultados de este ensayo se propone repetirlo considerando los siguientes aspectos:

- Aumentar el número de plantas iniciales, puestas a germinar, con el propósito de elegir material homogéneo desde el principio del experimento.

- Debido a la alta variabilidad del material de semilla se debería aumentar el número de repeticiones por lo menos a diez, lo que permitiría atenuar el efecto de alguna unidad experimental fuera de rango.
- Usar como material vegetal otro portainjerto menos variable en cuanto a su crecimiento, como por ejemplo, cv. Nabal.
- Buscar un método de propagación vegetativa que asegure la uniformidad de las plantas. En la actualidad, el enraizamiento de estacas no ha sido satisfactorio pero existe un método que emplea la micropropagación que tiene buenos resultados. Sin embargo, es un método caro y demoroso de efectuar por lo que se debe disponer de suficiente tiempo y financiamiento para su realización.
- Inocular con una menor concentración de propágulos/ml o menor cantidad de esta solución, ya que las plantas inoculadas sin inundación tuvieron pudrición, lo que indicaría una excesiva cantidad de inóculo.
- Aumentar el período de evaluación del ensayo a un mayor número de meses. Esto, para observar si el efecto de la inundación requiere un mayor tiempo para manifestarse.

5. CONCLUSIONES Bajo las

condiciones de este estudio se puede concluir lo siguiente:

* Periodos de 96 horas de inundación cada dos semanas en plantas inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* son críticos para la supervivencia de éstas, llegando a morir antes de tres meses bajo condiciones de invernadero no climatizado. Por otro lado, se demuestra que el hongo puede sobrevivir en presencia de un bajo contenido de oxígeno por un período de al menos cuatro días, cada dos semanas.

* Períodos de 96 horas cada dos semanas, en ausencia del hongo *Phytophthora cinnamomi* no comprometen la supervivencia de las plantas durante tres meses bajo estas condiciones, pero provocan marchitamiento, clorosis y menor crecimiento aéreo.

* La inundación de plantas de palto cv. Mexicola, por períodos de distinta duración no tienen un efecto significativo en la pudrición de raicillas, altura, diámetro y número de hojas de plantas inoculadas o no inoculadas.

* El área foliar se ve afectada por distintos periodos de inundación, sobre todo en plantas inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*.

* La inoculación del hongo *Phytophthora cinnamomi* tiene un efecto significativo en las plantas, afectando el crecimiento aéreo de éstas al disminuir significativamente su diámetro y número de hojas. Esto significa que las razas de *Phytophthora cinnamomi* presentes en Chile son patogénicas y los síntomas de decaimiento son atribuibles a esta enfermedad.

6. RESUMEN

La enfermedad más importante en palto (*Persea americana* Mill.) corresponde a la pudrición de raicillas causada por el hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands, enfermedad que se favorece en condiciones de humedad excesiva.

Estudios con otras especies de *Phytophthora* y en otras especies de frutales han demostrado un aumento de la severidad de la enfermedad al aumentar la duración de períodos de inundación del suelo, lo que se debe a que este género se favorece con la presencia de agua libre.

Debido a lo anteriormente mencionado se realizó un ensayo consistente en someter plantas de palto cv. Mexicola inoculadas y no inoculadas con el hongo *Phytophthora cinnamomi*, cultivadas en maceta, a períodos de inundación de 0, 12, 24, 48 y 96 horas cada dos semanas, con el objetivo de evaluar parámetros como pudrición de raicillas, altura, diámetro, número de hojas y área foliar, a los tres meses de comenzado los períodos de inundación.

Con el fin ya citado se pusieron a germinar semillas de palto var. Mexicola en sustrato esterilizado de turba y arena, previamente desinfectadas con fungicida y tratamiento de agua caliente, para luego trasplantarlas a maceteros de cuatro litros. Posteriormente, cuando las condiciones ambientales de temperatura eran favorables para el hongo (septiembre), se inoculó la mitad de las plantas con 200 ml de una solución de 1×10^6 propágulos/ml de micelio de *Phytophthora cinnamomi*, y se comenzaron los períodos de inundación en todas las plantas, cada dos semanas durante tres meses, sumergiendo las macetas en contenedores de plumavit de mayor capacidad (6 l). Durante el tiempo del estudio se fertilizó cada 20 días con una mezcla de macronutrientes y el riego se efectuó mediante pesaje de las macetas, manteniendo un nivel de humedad entre un 20 y 54 % del sustrato.

Al término del ensayo se evaluaron los parámetros: pudrición de raicillas, altura, diámetro, número de hojas y área foliar en los distintos tratamientos de inundación/inoculación, a través de un análisis multifactorial, encontrando significativo sólo el factor inoculación, en casi todos los parámetros, no existiendo diferencias significativas entre distintos períodos de inundación. Para el área foliar fue significativo también el factor inundación. El período de 96 horas de inundación, no incluido en el análisis, en plantas inoculadas causó mortalidad de éstas antes de terminado el ensayo y en plantas no inoculadas sólo disminuyó el crecimiento y hubo clorosis foliar. La inoculación tuvo un claro efecto al disminuir un 16,5 y 18,2% los parámetros número de hojas y diámetro promedio del tallo, respectivamente, de las plantas en estudio.

Finalmente, se hace necesario repetir este ensayo con un mayor número de repeticiones y por más tiempo para confirmar los resultados obtenidos.

7. LITERATURA CITADA AGRIOS, G.

- N. 1985. Fitopatología. Mexico, editorial Limusa. 756 p.
- ALEXOPOULUS, C. J. and MIMS, C. W. 1979. Introductory Mycology. 3ed. ed. United States of America, John Wiley and sons, inc. 632 p.
- BARTNICKI-GARCIA, S. and WANG, M. C. 1983. Biochemical aspects and morphogenesis in *Phytophthora* Jin: Erwin, D.; Bartnicki-garcia, S. y Tsao, P. Eds. *Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology*. Minnesota, APS Press, pp. 121-137
- BENSON, D. M. 1982. Cold inactivation of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 72 (5): 560-563.
- BERNHARDT, E.A. and GROGAN, R. G. 1982. Effect of soil matric potential on the formation and indirect germination of sporangia of *Phytophthora parasitica*, *P. capsici*, and *P. cryptogea*. *Phytopathology* 72 (5): 507-511.
- BOWER, J. H. and MITCHELL, D. J. 1989. The effect of periodic flooding on infection of pepper by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 79(10): 1223
- BRADFORD, K. J. and FANG, S. F. 1981. Physiological responses of plants to waterlogging. *Hort Science* 16(1): 25-29.
- BROWNE, G. T. and MIRCETICH, S. M. 1988 Effect of flood duration on development of *Phytophthora* root and crown rots of apple. *Phytopathology* 78 (6): 846-851.
- CASTRO, F. O. 1990. Efecto de tres niveles hidricos y 4 texturas de suelo sobre el crecimiento radical y aereo de plarrtas de papayo (*Carica pubescens* tenne et koch), chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.), lucumo (*Pouteria lucuma*(R.et Pav.). O. Kze) y palto (*Persea americana* Mill.) creciendo en contenedores. Tesis Ing. Agr. Quillota, Universidad Catolica de Valparaiso, Facultad de Agronomia. 91 p.

- CHEN, D. W. and ZENTMYER, G. A. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 62: 397-402.
- COFFEY, M. 1991. Cause and diagnosis Avocado root rot. *California Grower* 15(3): 17,22-23
- CURTIS, D. S. and ZENTMYER, G. A. 1949. Effect of oxygen supply on *Phytophthora* root rot of avocado in nutrition solution. *American Journal of Botany* 36(6): 471-474.
- DUNIWAY, J. M. 1975, Formation of sporangia by *Phytophthora dreschleri* in soil at high matric potentials. *Canadian Journal of Botany* 53:1270-1275.
- _____. 1976. Movement of zoospores of *Phytophthora cryptogea* in soils of various textures and matric potentials. *Phytopathology* 66 (7): 877-882
- _____. 1983. Role of physical factors in the development of *Phytophthora cinnamomi*. In: Erwin, D.; Bartnicki-garcia, S. y Tsao, P. Eds. *Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology*. Minnesota, APS Press, pp. 175-187.
- DURAN, S. 1976. Replantation de arboles frutales. Barcelona, Aedos. 332 p.
- DURBIN, R. D. 1959. Factors affecting the vertical distribution of *Rhizoctonia* so/an/with special reference to CO₂ concentration. *American Journal of Botany* 46(1): 22-25
- ERWIN, D. C. and RIBEIRO, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. Minnesota, APS Press. 562 p.
- GALINDO, J. and ZENTMYER, G. A. 1964. Mating types in *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 54 (2): 238-239.

- GEORGI, K. 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 Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 79 p.
- GISI, U., ZENTMYER, G. A and KLURE, L. J. 1980. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* and *P. palmivora* in soils at different matric potentials. *Phytopathology* 70 (4): 301-306.
- _____. 1983. Biophysical aspects of the development of *Phytophthora*. in: Erwin, D.; Bartnicki-garcia, S. y Tsao, P. Eds. *Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology*. Minnesota, APS Press, pp. 109-119.
- HAASIS, F. A. and NELSON, R. R. 1963. Studies on the biological relationship of species of *Phytophthora* as measured by oospore formation in intra and interspecific crosses. *Plant Disease Reporter* 47(8): 705-709.
- HO, H. H. and ZENTMYER, G. A. 1977. Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia* 69:701-713.
- KATZNELSON, H., ROUATT, J. W. and PAYNE, T. M. B. 1955. The liberation of amino acids and reducing compounds by plants roots. *Plant Soil* 7:35-48.
- KUAN, T. L. and ERWIN, D. C. 1980. Predisposition effect of water saturation of soil on *Phytophthora* root rot of alfalfa. *Phytopathology* 70 (10): 981-986.
- LATORRE, B. 1992. Enfermedades de las plantas cultivadas. 4a. ed. Santiago, Ediciones Universidad Católica de Chile. 628 p.
- LUTZ, A., MENGE, J. and BENDER, G. 1988. *Phytophthora* root rot in citrus: Can it be controlled by manipulation of irrigation practices?. *California Grower* 12(5): 8-10.
- MEHRLICH, F. P. 1935. Non-esterile soil leachate stimulating to zoosporangia production by *Phytophthora* sp. *Phytopathology* 25: 432-434.

- MIRCETICH, S. M. and ZENTMYER, G. A. 1967. Existence of *Phytophthora cinnamomi* as chlamydospores and oospores in roots and soil. California Avocado Society Yearbook 51 :117-124.
- MITCHELL, D. J. and ZENTMYER, G. A. 1971. Effects of oxygen and carbon dioxide tensions on sporangium and oospore formation by *Phytophthora* spp. Phytopathology 61 (7): 807-812
- MUJICA, F. y VERGARA, C. 1980. Flora fungosa chilena. 2a. ed. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Agronomía. 308 p. (Ciencias Agrícolas n°5)
- NESBITT, H. J., MALAJCZUK, N. and GLENN, A. R. 1979. Effect of soil moisture and temperature on the survival of *Phytophthora cinnamomi* Rands in soil. Soil Biology and Biochemistry 11: 137-140.
- PLOETZ, R. C. and SCHAFFER, B. 1992. Effect of flooding and *Phytophthora* root rot on net gas exchange of avocado in Dade County Florida. Proceedings of second World Avocado Congress II. 21-25 april 1991, Orange, California, USA. pp 111-117
- REEVES, R. J. and JACKSON, R. M. 1972. Induction of *Phytophthora cinnamomi* oospores in soil by *Trichoderma viride*. Trans. Br. Mycol. Soc. 59:156-159.
- RIBEIRO, O. K. , ERWIN, D. C. and ZENTMYER, G. A. 1975. An improved synthetic medium for oospore production and germination of several *Phytophthora* species. Mycologia67:1012-1019.
- _____. ZENTMYER, G. A. and ERWIN, D. C. 1976. The influence of qualitative and quantitative radiation on reproduction and spore germination of four *Phytophthora* species. Mycotogia 68:1162-1173.
- ROYLE, D. J. and HICKMAN, C. J. 1964. Observations on *Phytophthora cinnamomi*. Canadian Journal of Botany 42: 311-318.

- SHEA, S. R. 1975. Environmental factors of the northern jarrah forest in relation to pathogenicity and survival of *Phytophthora cinnamomi*. Perth, For. Dep. 83 p. (Bull, 85)
- STAMPS, D. J., WATERHOUSE, G. M., NEWHOOK, F. J., and HALL, G. S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. England, Commonw. Agric. Bur. Inst. Mycol. 28 p. (Paper 162)
- STERNE, R. E., ZENTMYER, G. A. and KAUFMANN, M. R. 1977. The effect of matrix and osmotic potential of soil on *Phytophthora* root disease of *Persea indica*. Phytopathology 67 (12): 1491-1494.
- _____. _____. _____. 1978. Effect of *Phytophthora* root rot on water relations of avocado: Interpretation with a water transport model. Phytopathology 68 (4): 595-602.
- STOLZY, L. H., ZENTMYER, G. A., KLOTZ, L. J. and LABANAUSKAS, C. K. 1967. Oxygen diffusion, water and *Phytophthora cinnamomi* in root decay and nutrition of avocados. Proceedings of the American Society for Horticultural Science 90:67-76.
- TORGESON, D. 1954. Root rot of Lawson cypress and other ornamentals caused by *Phytophthora cinnamomi*. Contributions from Boyce Thompson Institute 17: 359-373.
- WAGER, V. A. 1942. *Phytophthora cinnamomi* and wet soil in relation to the dying-back of avocado trees. Hilgardia 14 (9): 519-532.
- WILCOX, W. F. and MIRCETICH, S. M. 1979. The influence of different levels of soil moisture on *Phytophthora* root rot and crown rot of Mahaleb cherry rootstock. Phytopathology 69(9): 1049.
- _____. _____. 1985. Effect of flooding duration on the development of *Phytophthora* root and crown rots of cherry. Phytopathology 75(12):1451-1455

- _____. 1993. Incidence and severity of crown and root rots on four apple rootstocks following exposure to *Phytophthora* species and waterlogging. *Journal of American Society Horticultural Science* 118 (1): 63-67.
- ZAKI, A. I., ZENTMYER, G. A., SIMS, J. J. and KEEN, N. T. 1983. Stimulation of sexual reproduction in the A2 mating type of *Phytophthora dnamomi* by oteic acid and lipids from avocado roots. *Phytopathology* 73(2): 199-203.
- ZENTMYER, G. A. and KLOTZ, L. J. 1947. *Phytophthora dnamomi* in relation to avocado decline. *Phytopathology* 37: 25
- ZENTMYER, G. A. 1952. A substance stimulating sexual reproduction in *Phytophthora dnamomi*. *Phytopathology* 42:24
- _____. and RICHARDS, S. J. 1952. Pathogenicity of *Phytophthora dnamomi* to avocado trees, and the effects of irrigation on disease development. *Phytopathology* 42: 35-37
- _____. and MIRCETICH, S. M. 1966. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora dnamomi*. *Phytopathology* 56 (6): 710-712.
- _____. KLURE, L. J. and POND, E. C. 1979. The influence of temperature and nutrition on formation of sexual structures by *Phytophthora dnamomi*. *Mycologia* 71: 55-67
- _____. 1980. *Phytophthora dnamomi* and the disease it causes. Minnesota, APS Press. 96 p. (Monograph 10)
- _____. 1983. The world of *Phytophthora* in: Erwin, D.; Bartnicki-garcia, S. y Tsao, P. Eds. *Phytophthora: Its biology, taxonomy ecology and pathology*. Minnesota, APS Press, pp. 1-7
- _____. MENGE, J., and OHR, H. 1994. *Phytophthora* root rot. in: Compendium of tropical fruit disease. Minnesota, APS Press, pp. 77-79

ANEXOS

ANEXO 1. Medio selectivo para *Phytophthora* y *Pythium*: P10PV.

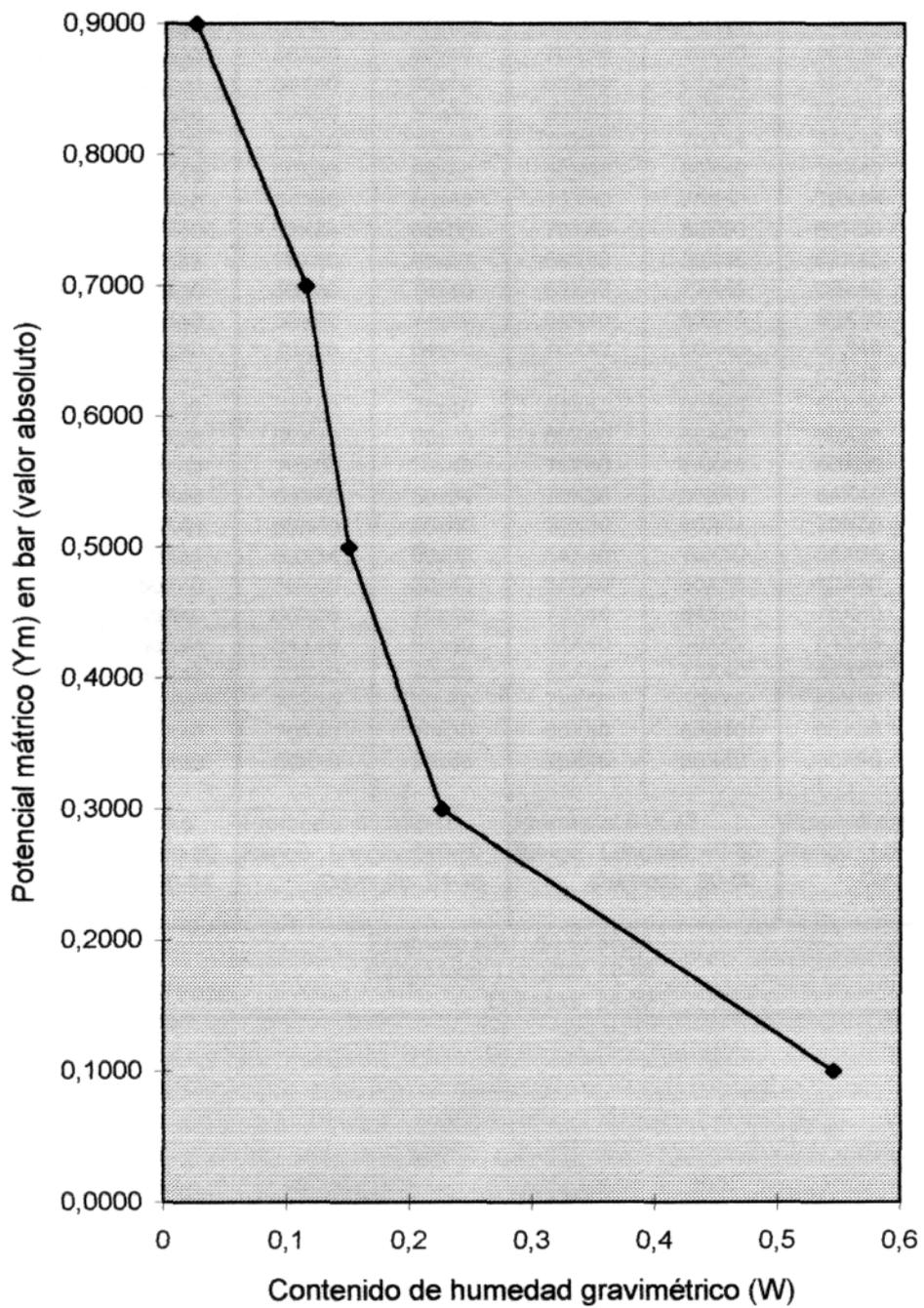
Componente	Cantidad
Agar cornmeal	17 g/l
Pimaricina	10 mg/l
Vancomicina	200 mg/l
Pentacloronitrobenceno 20% (PCNB)	500 mg/l

ANEXO 2. Solución salina para obtención de esporangios de *Phytophthora cinnamomi*

Componente	Cantidad
<u>Solución 1:</u>	
Nitrato de Calcio (CaNO ₃)	2,36 g/l
Nitrato de Potasio (KNO ₃)	0,5 g/l
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	1,0 g/l
<u>Solución 2 (1 ml):</u>	
EDTA	13 g/l
Hidróxido de potasio (KOH)	7,5 g/l
Sulfato de Hierro (FeSO ₄)	24,5 g/l

ANEXO 3. Curva de retención de humedad del sustrato turba/arena

Ec. de Gardner: $Y_m = 0,04698 * W^E - 1,2473$



ANEXO 4. Tamaño de esporangios de cepas utilizadas en la inoculación

Tamaño de esporangios (en micras) de las cepas inoculadas de <i>Phytophthora cinnamomi</i>							
Cepa 475 (Lab. Fitop.)		Cepa 481(Santiago)		Cepa 523 (Est. Exp.)		Cepa 524 (Est. Exp.)	
80X40	40X30	50X30	60x40	70X50	40X30	56X40	64X40
70X30	40X40	60X40	80x40	60X40	60X40	50X26	60X40
60X30	60X40	70X30	56x36	54X32	60X40	86X50	52X34
60X30	60X30	80X40	70x30	70X50	70X34	60X40	60X44
70X34	60X40	60X40	68x40	60X40	60X40	70X40	64X40
50X30	56X40	44X40	60x40	72X50	70X50	70X44	70X36
60X40	60X40	52X44	60x36	70X48	80X50	64X30	66X40
70X40	60X38	70X40	68x44	66X50	56X36	64X40	62X40
60X34	40X30	50X40	74x40	64X40	72X46	60X40	68X40
60X30	74X40	50X30	74x40	68X40	60X44	66X30	68X36
60X40	50X30	70X36	64x40	70X40	60X48	60X40	62X42
50X30	70X40	50X40	60x40	80X50	60X36	60X40	64X40
80X40	60X40	52X40	70x40	60X40	60X40	50X26	80X46
70X30	70X36	62X40	60x40	60X50	56X40	60X34	56X38
60X32	50X38	70X40	70x40	76X40	64X40	60X36	60X40
80X40	70X40	64X40	50x24	70X36	60X40	64X40	50X30
70X40	50X40	60X40	60x40	50X30	60X44	70X30	80X50
76X40	70X44	80X34	60x30	54X40	76X50	56X34	60X40
50X36	50X40	58X40	60x40	64X40	50X36	60X30	60X40
60X40	60X40	60X36	70x40	70X44	64X40	76X40	60X38
60X40	50X34	64X40	64x40	64X40	60X40	64X40	50X36
60X40	60X40	60X40	80x46	66X50	70X40	64X40	60X40
50X30	80X40	70X30	60x40	78X50	60X46	60X40	60X36
50X30	80X40	70X40	40x30	60X50	60X40	66X36	70X44
60X40	40X30	50X30	70x40	76X40	66X40	60X50	80X32
Promedio: 63,1X 36,5 Rango : Longitud: 40-80 Diámetro: 30-44		Promedio: 65,3X39,5 Rango : Longitud:40-80 Diámetro: 24-46		Promedio: 64X 43 Rango : Longitud: 40-80 Diámetro: 30-50		Promedio: 63,2X 38,4 Rango : Longitud: 50-86 Diámetro: 26-50	
Promedio total : 63,9X39,35 Rango total: Longitud: 40-86 Diámetro: 24-50							

ANEXO 5. Parámetros evaluados en los tratamientos de inundación/inoculación

TRATAMIENTO Inoculados	Repeticiones	Pudrición (%)	N° de hojas	Altura (cm)	Diámetro (cm)	Area foliar (cm2)
sin inundac.	T0R1	10	30	47,5	0,9	1837
	T0R2	13,22	23	28,5	0,5	665
	T0R3	15	24	29	0,6	898,43
	T0R4	10	34	36,5	0,8	1819,48
12 hrs. inundac.	T1R1	100	18	20,7	0,5	465,03
	T1R2	40	27	30	0,7	919,38
	T1R3	10	31	40	0,7	1410,22
	T1R4	70	23	22,5	0,5	827,06
24 hrs inundac.	T2R1	80	21	30	0,6	699,34
	T2R2	40	24	35	0,7	1026,07
	T2R3	30	28	30	0,8	1278,53
	T2R4	30	24	27	0,5	772,24
48 hrs. inundac.	T3R1	95	20	24,5	0,6	625,38
	T3R2	90	21	26,5	0,5	955,04
	T3R3	25	25	34,5	0,5	917,16
	T3R4	40	24	48	0,7	919,29
No inoculados						
sin inundac.	T5R1	5	30	49	0,8	2955,79
	T5R2	3	30	45,5	0,7	2191,22
	T5R3	2	32	50	0,9	1993,85
	T5R4	3	33	45,5	0,8	2688,71
12 hrs. inundac.	T6R1	5	30	35	0,7	1812,5
	T6R2	10	32	46	0,8	2776,32
	T6R3	3	28	43,5	0,8	1631,04
	T6R4	2	29	52	0,8	1793,32
24 hrs inundac.	T7R1	1	32	47,5	0,8	2320,76
	T7R2	2	26	26,5	0,6	861,49
	T7R3	5	32	32	0,7	1426,62
	T7R4	2	27	47	0,7	1874,94
48 hrs. inundac.	T8R1	5	31	41,5	1	2338,06
	T8R2	10	27	36,5	0,7	1502,72
	T8R3	5	24	38	0,8	1449,93
	T8R4	25	32	41	0,7	1581,67

ANEXO 6. Cálculo área foliar total de cada unidad experimental

Tratamiento	Largo	Ancho	Area foliar	N° de hojas	A. foliar total
T0R1	15,3625	5,075	61,23346556	30	1837,00
T0R2	11,1555	3,3	28,91304801	23	665,00
T0R3	11,657	4,0888	37,43463141	24	898,43
T0R4	13,2625	5,1375	53,51408803	34	1819,48
T1R1	8,285714	3,97	25,83517111	18	465,03
T1R2	11,5	3,77	34,051017	27	919,38
T1R3	12,6222	4,5888	45,49095812	31	1410,22
T1R4	11,65	3,93	35,9591463	23	827,06
T2R1	10,286	4,1222	33,3017055	21	699,34
T2R2	11,2375	4,844	42,75281703	24	1026,07
T2R3	12,46	4,666	45,66186794	28	1278,53
T2R4	9,5	4,3125	32,17685625	24	772,24
T3R1	10,28750	3,87	31,26883568	20	625,38
T3R2	12,38600	4,675	45,47823357	21	955,04
T3R3	11,93330	3,9143	36,68643942	25	917,16
T3R4	11,74300	4,1531	38,30384278	24	919,29
T5R1	16,083	7,8	98,52638796	30	2955,79
T5R2	18,37	5,0625	73,04072738	30	2191,22
T5R3	15,1833	5,225	62,30793596	32	1993,85
T5R4	15,4833	6,7	81,47591159	33	2688,71
T6R1	12,75	6,0333	60,41656121	30	1812,50
T6R2	17,1	6,46	86,7599964	32	2776,32
T6R3	14,9333	4,9666	58,2513334	28	1631,04
T6R4	14,48	5,4375	61,838469	29	1793,32
T7R1	16,2	5,7	72,523836	32	2320,76
T7R2	11,25	3,75	33,1340625	26	861,49
T7R3	13,15	4,3166	44,58188797	32	1426,62
T7R4	15,4666	5,7166	69,44221351	27	1874,94
T8R1	14,85	6,4666	75,42118445	31	2338,06
T8R2	13,7333	5,16	55,65645051	27	1502,72
T8R3	14,3333	5,3666	60,41382234	24	1449,93
T8R4	12,8	4,9166	49,42716979	32	1581,67