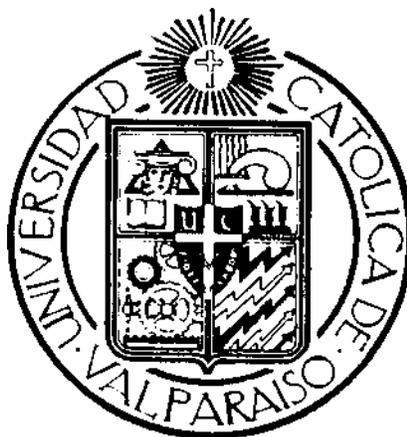


UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
FACULTAD DE AGRONOMIA

AREA DE FRUTALES



TALLER DE TITULACION

METODOLOGIA PARA LA EVALUACION DE LA INCIDENCIA Y
SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD "TRISTEZA DEL PALTO"
AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y PATOGENICIDAD DE
CEPAS DE *Phytophthora* ASOCIADAS

KAREN INGE GEORGI JIMENEZ

QUILLOTA CHILE
1993

ÍNDICE DE MATERIA

1. INTRODUCCIÓN
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA
 - 2.1. Género Phytophthora
 - 2.1.1. Taxonomía
 - 2.1.2. Morfología
 - 2.2. Phytophthora cinnamomi
 - 2.2.1. Hospederos
 - 2.2.2. Sintomatología
 - 2.2.3. Epidemiología
 - 2.2.4. Factores predisponentes
 - 2.2.5. Estructuras de sobrevivencia
 - 2.2.6. Descripción y características de Phytophthora cinnamomi
 - 2.3. Metodología experimental asociada a Phytophthora
 - 2.3.1. Aislamientos y cultivos
 - 2.3.2. Incubación
 - 2.3.3. Esporulación
 - 2.3.3.1. Potencial hídrico
 - 2.3.3.2. Temperatura
 - 2.3.3.3. pH
 - 2.3.3.4. Aireación
 - 2.3.3.5. Luz
 - 2.3.3.6. Agentes microbiológicos

2.3.3.7. Nutrición

2.3.3.8. Edad

2.3.4. Metodología de inoculación

2.3.5. Evaluación del daño en plantas afectadas

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Ubicación del ensayo

3.2. Elección de los árboles

3.2.1. Caracterización de los grados de severidad de daño

3.3. Aislamientos

3.3.1. Muestreo de raíces

3.3.2. Medios de cultivo

3.3.3. Conservación de las cepas obtenidas en los aislamientos

3.4. Identificación de Phytophthora sp.

3.4.1. Aislamientos a identificar

3.4.2. Tratamientos para inducir la esporulación

3.5. Ensayo de patogenicidad

3.5.1. Inoculación al sustrato

3.6. Evaluación

3.6.1. Evaluaciones descriptivas

3.7. Recuperación de Phytophthora cinnamomi

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Sintomatología de los árboles que componen la muestra

4.1.1. Sintomatología aérea

4.1.2. Sintomatología del sistema radicular

4.2. Aislamientos

4.2.1. Recuperación de *Phytophthora* sp. desde las muestras de raíces

4.2.2. Medios de cultivo

4.2.3. Conservación de las cepas aisladas

4.3. Identificación de *Phytophthora* sp.

4.4. Evaluación del ensayo de patogenicidad

4.4.1. Evaluaciones descriptivas

4.5. Reaislamiento de *Phytophthora* sp.

5. CONCLUSIONES

6. RESUMEN

7. LITERATURA CITADA

8. ANEXO

ÍNDICE DE CUADROS

- CUADRO 1. : Sintomatología de los paltos del ensayo asociado a la enfermedad causada por Phytophthora sp.
- CUADRO 2. : Sintomatología del sistema radicular de los paltos que componen la muestra, asociado a la enfermedad causada por Phytophthora sp.
- CUADRO 3. : Sintomatología aérea, Sintomatología radicular y evaluación del grado de afección en los paltos inoculados al sustrato.

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. Sintomatología de un palto severamente enfermo, uno medianamente enfermo y uno sano.
- FIGURA 2. Aislamientos C16, C33 y C38 on patrón de crecimiento tipo camelia y los aislamientos C25, C34, C52 y C53 con patrón de crecimiento tipo roseta.
- FIGURA 3. Vista microscópica del micelio, clamidospora y esporangio del aislamiento C34.
- FIGURA 4. Sintomatología observada en las plantas C38 en relación al testigo.

1. INTRODUCCIÓN

La "Tristeza del palto", causada por Phytophthora cinnamomi es la enfermedad más importante que afecta a este cultivo, tanto en Chile como en el mundo (COFFEY, 1991; GARDIAZABAL y ROSENBERG, 1991).

Dentro de las estrategias de control integrado, encontramos la incorporación de materia orgánica, el manejo del suelo, del agua de riego y el control químico.

Desde el punto de vista del control químico, la aplicación de fosetil de aluminio o ácido fosforoso han contribuido a solucionar este problema. Sin embargo, una vez realizadas las aplicaciones químicas, es común observar la reaparición de problemas. En parte puede deberse a una situación de mal manejo del agua de riego, ya que muchas veces sistemas radiculares atrofiados aunque estén temporalmente libres de este problema, vuelven a contaminarse al existir asfixia radicular. Esta importancia del agua y la opción de manejarla para permitir la recuperación de árboles afectados por la "tristeza", motivaron la presente investigación, como una etapa preliminar a modo de poder homogenizar el material de trabajo para investigaciones posteriores, y determinar que efectivamente están tratando los árboles que están

afectados por Phytophthora cinnamomi. por lo tanto se desarrollan los siguientes objetivos:

-Seleccionar árboles con diferentes grados de ataque: aparentemente sano, medianamente afectados y severamente afectados a partir de apreciaciones visuales de la canopia y del sistema radicular.

-Realizar aislamientos del agente causal de árboles con "tristeza" y establecer una metodología para la identificación de Phytophthora cinnamomi a nivel de laboratorio.

-Realizar pruebas de patogenicidad de cinco cepas aisladas de árboles enfermos mediante la inoculación de plantas de palto aparentemente sanas, mantenidas bajo condiciones de semisombra.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. Género Phytophthora:

2.1.1. Taxonomía

El género Phytophthora está en la División Mastigomycota. Sus principales características son el micelio filamentoso, cenocítico y algunas veces pseudoseptado. La reproducción asexual se lleva a cabo por zoosporas flageladas, las que son producidas en esporangios. Pertenece a la Subdivisión Diplomastigomycotina, por producir zoosporas biflageladas y presentar meiosis gametangial (AGRIOS, 1978; RIBEIRO, 1978; ALEXOUPOLUS y MIMS, 1979).

Clase Oomycetes, debido a su reproducción sexual por contacto gametangial produciendo oosporas. Los hongos de esta clase tienen un talo que varía desde uno simple y unicelular hasta un micelio filamentoso muy ramificado (AGRIOS, 1978; RIBEIRO, 1978; ALEXOUPOLUS y MIMS, 1979).

Orden Peronosporales, donde se encuentran las especies más especializadas de los Oomycetes. El esporangio es limoniforme u ovalado, pudiendo ser sésil o deciduo. Las zoosporas a su vez son reniformes y biflageladas. La reproducción sexual ocurre entre un anteridio y un

oogonio, claramente difetouciados, pudiendo ser homotáticos o heterotáticos (AGRIOS, 1978; RIBEIRO, 1978; ALEXOUPOLUS y MIMS, 1979).

Familia Pythiaceae. (AGRIOS, 1978; RIBEIRO, 1978; ALEXOUPOLUS y MIMS, 1979).

Phytophthora y Pybhium son géneros de la familia Pythiaceae. La forma correcta de distinción entre ambos géneros está en la germinación esporangial, pues las zoosporas de Pythium se diferencian en una vesicula formada en el extremo del esporangio, en cambio en Phytophthora se producen y diferencian en el esporangio, sin formar vesícula (ALEXOPOULOS y MIMS, 1979).

2.1.2. Morfología

El micelio se caracteriza por ser hialino, ligero o profusamente ramificado, cenocítico, pero en la medida que el tiempo transcurre se pueden apreciar carentes de protoplasma y a veces aparecen septas. A veces el micelio se presenta nudoso, las hifas se ramifican en ángulos rectos y a menudo estranguladas en su base. El esporangioforo es indiferenciable de las hifas. Los esporangios son de tamaño variable, de forma usualmente ovoide, piriforme u limoniforine. Son incoloros o de color

amarillo leve. En algunas especies se produce la proliferación, en donde el nuevo esporangio crece desde la base de un esporangio vacío. Las proliferaciones pueden ser internas o externas y el esporangio puede ser caduco o deciduo. El contenido interior se divide en un número indefinido de zoosporas, dependiendo de la especie. Las zoosporas son reniformes y biflageladas (WATERHOUSE, 1963; RIBEIRO, 1978).

Posee clamidosporas apapiladas, con posición terminal o intercalada, y su forma varía de esférica a ovoide (WATERHOUSE, 1963; RIBEIRO, 1978).

La oospora es el resultado de la interacción del oogonio, que es generalmente esférico a piriforme y ubicado en el ápice de una hifa lateral, con el anteridio, que corresponde a una hifa engrosada y multinucleada (WATERHOUSE, 1963; RIBEIRO, 1978).

Los esporangios son estructuras, muy importantes, ya sea por su rol en la reproducción asexual como por su gran variabilidad en genes y tamaños, y permiten la identificación de las diferentes especies (RIBEIRO, 1978; ALEXOUPULUS y MIMS, 1979; NEWHOOK et al., 1978).

2.2. Phytophthora cinnamomi:

2.2.1. Hospederos

Phytophthora cinnamomi fue descrita por primera vez por Rands en 1922 y desde ese tiempo se ha constatado que causa pudrición de raíces y/o canchros en aproximadamente 1000 especies diferentes en unos 70 países (COFFEY, 1991).

Phytophthora cinnamomi Rands es la responsable de la "tristeza" en paltos y de la "pudrición al cuello" de nogales (LATORRE, 1988a).

Se citan como hospederos además del palto y el nogal a especies como Eucalyptus marginata, Ananas comosus, finus echinata y muchas especies ornamentales como la azalea, camelia y rododendro, entre otras. Gran número de especies nativas de Australia son hospederos, al igual que las especies provenientes de climas tropicales o subtropicales (THORN y ZENTMYER, 1952; ROTH, 1963; PINTO y ENGLISH, 1972; DOMSH, GAMS y TRAUTE-HEIDI, 1980; ZENTMYER, 1980; ZENTMYER, 1983).

2.2.2. Sintomatología

Phytophthora cinnamomi puede atacar paltos de diferentes

edades, incluyendo árboles recién propagados. El daño más severo se produce en suelos pesados o suelos livianos arenosos con un impedimento de drenaje (BEKEY, 1987; COFFEY, 1991).

El síntoma más destacable de la enfermedad en paltos consiste en la muerte progresiva del follaje. Las hojas producidas son más pequeñas, existiendo una amarillez y clorosis progresiva, que comienza en las ramas superiores. Posteriormente, se va produciendo una defoliación y muerte de las ramas hasta causar la muerte del árbol (CRANDALL, 1948; VERGARA, 1957; BEKEY, 1987; LATORRE 1988a; ZENTMYER, 1980; COFFEY, 1991; WHITE, 1991).

Es característico en árboles con un estado avanzado de la enfermedad, que carezcan de nuevos crecimientos y además, que presenten una carga abundante y de bajo calibre (ZENTMYER, 1980; COFFEY, 1991).

En los primeros estadios de la enfermedad, es común que los árboles presenten mayor carga frutal, producto probablemente de la acumulación de carbohidratos en la parte superior del árbol, siendo un efecto atribuido a la muerte de raíces (ZENTMYER, 1980).

En algunos casos, se puede observar el tronco afectado por la formación de canchales con presencia de exudados o secreciones (ZENTMYER, 1980; LATORRE, 1988b; COFFEY, 1991).

Todos estos síntomas aéreos, son producto de una invasión a nivel de las raicillas absorbentes (1-3 mm de diámetro), las que presentan una pudrición negra y firme, que puede progresar en longitud (ZENTMYER, 1980; COFFEY, 1991).

El fruto del palto también puede ser colonizado por Phytophthora cinnamomi produciendo una pudrición firme, de un color café. Sin embargo, este síntoma no es muy común bajo condiciones de campo (ZENTMYER, 1980).

2.2.3. Epidemiología

En 1960 y 1961, se reportó que las zoosporas móviles eran atraídas por la zona de elongación de las raicillas del palto, mucho más que por la zona de diferenciación de la raíz (ZENTMYER, 1960; ZENTMEYER, 1961).

En 1966 se logró determinar que la sustancia liberada en el exudado radicular, que ejercía una atracción positiva del tubo germinativo de la zoospora hacia la zona de elongación, correspondía a aminoácidos (ZENTMYER, 1966).

2.2.4. Factores predisponentes

La enfermedad "Tristeza del palto" causada por Phytophthora cinnamomi se produce y favorece bajo condiciones de alta humedad (BEKEY, 1987).

Son muchos los autores que concuerdan que los factores que predisponen a los frutales, como el palto o cítricos entre otros, a una infección por especies del género Phytophthora, tiene relación con la acumulación de un exceso de humedad.

Esta condición se puede presentar por una mala práctica de riego, por presencia de niveles freáticos altos, o bien por el uso de suelos de textura pesada, con drenaje deficiente. Otros factores importantes son las lesiones o heridas en el tronco o raíces, ya sea por el uso de maquinaria u otra herramienta, pues a pesar que Phytophthora es capaz de penetrar directamente, su acción se ve facilitada, aumentado el riesgo de la infección (PINTO y ENGLISH, 1972; ZENTMYER, 1980; MORALES, 1985; MORALES y MORENO, 1986; BEKEY, 1987; LATORRE, 1988abc; COFFEY, 1991).

Además, otro factor significativo es la acumulación de guano junto al tronco, pues este sustrato rico en nutrientes es ideal para el desarrollo de los hongos, los

cuales al tener un huésped susceptible y condiciones ambientales favorables inician el proceso infeccioso (PINTO y ENGLISH, 1972; MORALES y MORENO, 1986).

Sin embargo, suelos ricos en materia orgánica favorecen el desarrollo de la microflora antagonista (ZENTMYER, 1980).

El contenido de humedad del suelo es un factor decisivo en el ciclo de la enfermedad causada por Phytophthora cinnamomi. La alta humedad del suelo provee la condición de agua libre, que favorece la liberación de zoosporas del esporangio. Además, favorece el movimiento de las zoosporas hacia las raicillas absorbentes. La liberación de exudados radiculares, generan un gradiente quimiotáxico, capaz de atraer gran número de zoosporas. La infección y rápida muerte de raíces, es seguida por la formación en pocos días de esporangios y clamidosporas. Esto permite perpetuar el ciclo de la enfermedad (ZENTMYER, 1980; BEKEY, 1987; COFFEY, 1991).

La reducción en el intervalo de riego aplicando igual volumen de agua, causa que el suelo se sature más frecuentemente. Esto puede incrementar el número de oportunidades posibles para la producción de zoosporas, seguido por su liberación, lo que se traduce en un

aumento del inóculo (LUTZ, MENGE y HENDER, 1988).

Especialmente, la interacción entre la humedad del suelo, temperatura de éste y la aireación están influenciando la patogenicidad de Phytophthora cinnamomi. La humedad del suelo es el primer factor que influye en el desarrollo de este patógeno y también temperaturas del suelo del orden de 15°C hasta 30°C las que favorecen la infección y su desarrollo, acompañado todo esto de una buena aireación (15-16% O₂), pues se trata de un hongo aeróbico (CURTÍS y ZETMYER, 1949; ZETMYER, 1980).

En relación al pH, cuando éste fluctúa entre 4,5 y 7,5, se pueden observar árboles severamente afectados, y cuando fluctúa entre 6 y 6,5 es ideal para la infección y desarrollo del hongo (ZETMYER, 1980).

2.2.5. Estructuras de sobrevivencia

El género Phytophthora se caracteriza por sobrevivir a través de la colonización de materia orgánica en descomposición y también por medio de propágulos dormantes (WESTE, 1983).

Estos propágulos se ven afectados en su sobrevivencia por factores como la temperatura y la humedad (WESTE, 1983).

Estructuras de sobrevivencia son el micelio en materia orgánica en descomposición y propágulos en forma de esporangios, clamidosporas y oosporas (PINTO y ENGLISH, 1972; WESTE, 1983; MORALES y MORENO, 1986; COFFEY, 1991).

Phytophthora cinnainomi sobrevive primero como clamidospora en raicillas afectadas. Este tipo de estructura es liberada eventualmente en el suelo en donde persiste por largos períodos. La producción, tanto de clamidosporas como esporangios, ocurre en el suelo con temperaturas sobre 13°C hasta 30°C, siendo el rango de temperatura óptima entre 21°C y 24°C (COFFEY, 1991).

En la mayoría de los suelos este patógeno sobrevive como clamidospora, pero la estructura dormante con mayor habilidad para sobrevivir bajo condiciones extremas es la oospora (COFFEY, 1991).

Tanto oosporas como clamidosporas tienen una gruesa pared, que las hace muy resistentes a la falta de humedad (BEKEY, 1987).

2.2.6. Descripción y características de Phytophthora cinnamomi

Las especies del género Phytophthora, de acuerdo a sus características morfológicas, fueron agrupadas en siete

grupos encontrándose la especie Phytophthora cinnamomi en el sexto grupo, que posee las siguientes características: esporangios no papilados, con proliferación y persistentes; el anteridio es mayoritariamente amfigeno; en la producción de oosporas existen especies homotálicas y heterotálicas (WATERHOUSE, 1963).

La descripción original de Phytophthora cinnamomi es publicada por Rands en 1922. Información adicional es proporcionada por Waterhouse y Waterston en 1966. Ribeiro en 1978 aporta nuevos conocimientos para ayudar a su identificación, por ser una de las especies de éste género de más difícil identificación (ZENTMYER, 1980).

Una característica distintiva de esta especie es el aspecto coraloide del micelio, con frecuentes nodulos redondeados, alcanzando la hifa un diámetro de ocho micrómetros o más. Además presenta un gran número de clamidosporas (WATERHOUSE y WATERSTON, 1966, citado por ZENTMYER, 1980; RIBEIRO, 1978; NEWHOOK et al., 1978).

Las clamidosporas son mayoritariamente terminales y rara vez intercalares. Phytophthora cinnamomi las produce en forma abundante en cultivos artificiales y especialmente en agar jugo V-8. Su forma varía desde globosa a piriforme y generalmente tiene un diámetro que fluctúa

entre 31 - 50 micrómetros, siendo el promedio 41 micrómetros (RANOS, 1922, citado por ZENTMYER, 1980; NEWHOOK et al.,1978) .

Son formadas lentamente a partir de una porción de micelio en raicillas enfermas y liberadas en suelo cuando éstas mueren. Es el principal propágulo recolectado en muestras de suelo. Germina formando tres a once tubos germinativos, esto ocurre en presencia de exudados radiculares (MIRCETICH y ZENTMYER, 1967; MIRCETICH y ZENTMYER, 1968).

Por otro lado, los esporangios son estructuras reproductivas que tienen la capacidad de incrementar el inóculo en muy poco tiempo a través de la producción de zoosporas (ZENTMYER, 1980). Los esporangios no se observan fácilmente en forma natural, y menos aún en medios de cultivo comunes; pero si son producidos cuando se transfiere micelio desde una solución nutritiva a agua (RANOS, 1922, citado por ZENTMYER, 1980). Estos carecen de papilas y generalmente su forma es elipsoide a ovoide, no son caducos y poseen proliferación interna. Su dimensión varía de acuerdo a las diferentes condiciones durante su desarrollo, variando sus medidas entre 15-122 micrómetros de longitud y 11-71,4 micrómetros de ancho,

con promedios reportados; entre 1.3,6 y 7.5 micrómetros de longitud, y entre 25,9 y 47 micrómetros de ancho (ZENIMYER, 1980).

Al igual que otras especies del género, Phytophthora cinnamomi libera zoosporas cuando la temperatura del líquido donde está el esporangio es disminuida en varios grados °C. En condición normal, cada esporangio produce entre 10 y 30 zoosporas móviles y biflageladas en su mayoría mononucleadas, pues sólo se ha observado un bajo porcentaje de zoosporas binucleadas (ZENTMYER, 1980; COFFEY, 1991).

Los estadios sexuales raramente son producidos en medios con agar en cultivos puros, pero sí son producidos en forma abundante al estar creciendo con Phytophthora cinnamomi (WATERHOUSE y WATERSTON, 1966).

Los estadios sexuales se pueden producir en Phytophthora cinnamomi por un cruzamiento interespecífico con otras especies del mismo género o bien por cruzamientos intraespecíficos en cepas normales heterotálicas, pues Phytophthora cinnamomi es reconocida por ser una especie heterotálica con un tipo A1 compatible con uno A2. En último caso, aunque es mucho más escaso, puede ocurrir la producción de oosporas por cruzamiento homotálico de

cepas puras, pero sólo bajo condiciones especiales, en cultivos adultos o jóvenes como resultado de una aparente estimulación química, por ejemplo por extracto de raíces de palto en la presencia de Trichoderma. Esto se ha visto sólo en el tipo A2, que es más común y no en el tipo A1, que es obtenido rara vez en los aislamientos (SAVAGE et al., 1968; ZENTMYER, 1980).

Las dimensiones del oogonio, oospora y anteridio se ha visto que varían de acuerdo al tipo de cruzamiento, siendo significativamente más largo el oogonio y oospora en un cruzamiento homotálico del tipo A2, que en un cruzamiento heterotálico entre A1 y A2 (ZENTMYER, 1980).

Según WATERHOUSE y WATERSTON (1966), los oogonios miden en promedio 40 micrómetros de diámetro y como máximo 58 micrómetros y a medida que envejecen van adquiriendo un tono amarillo o dorado. El anteridio es generalmente amfígeno, largo, cuya dimensión se encuentra entre 21-23 micrómetros de longitud por 17 micrómetros de ancho.

La característica morfológica de la mayoría de los aislamientos realizados de Phytophthora cinnamomi. presentan un crecimiento micelial con patrón tipo roseta o tipo camelia en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (TUCKER, 1931; ZENTMYER, 1980).

2.3. Metodología experimental asociada a Phytophthora:

2.3.1. Aislamientos y cultivos

Las especies del género Phytophthora pueden ser detectadas y aisladas a partir de cualquier tejido infectado del hospedero, ya sean raíces, frutos, semillas, hojas o canchales, y también a partir de propágulos dormantes presentes en el suelo (AGRIOS, 1978; ZENTMYER, 1980; TSAO, 1983).

La detección y/o aislamiento de hongos del género Phytophthora desde tejidos vegetales recién infectados, con un activo crecimiento micelial, es generalmente realizable. Sin embargo, si el tejido proviene de un hospedero con estado avanzado de la enfermedad, o de suelos naturalmente infectados, especialmente los que contienen un bajo nivel de propágulos, es extremadamente difícil o imposible, si no se utilizan técnicas apropiadas (TSAO, 1983).

Es así como fue necesario el desarrollo de nuevos métodos para aislar, porque los métodos convencionales no eran efectivos para la mayoría de las especies del género, incluyendo a Phytophthora cinnamomi (ZENTMYER, 1980).

La dificultad radica muchas veces en el antagonismo e interferencia con el rápido crecimiento de la microflora asociada y en la lenta emergencia de los propágulos dormantes, en general clamidosporas, provenientes del tejido infectado o del suelo (TSAO, 1983).

Las técnicas especiales de aislamientos, como el uso de cebos y medios selectivos, han permitido superar estas dificultades (ZENTMYER, 1980; TSAO, 1983).

El éxito que se obtenga en los aislamientos desde muestras de suelo utilizando cebos, dependerá en gran medida del tipo de propágulo dormante, densidad de éste, interferencias de la microflora asociada, condiciones edáficas y del cebo que se utilice (JEFFERS y ALWINCKLE, 1988).

Generalmente el material vegetal a utilizar como cebo es seleccionado de hospederos, para los cuales Phytophthora sp. es patogénica, pues la susceptibilidad es una característica a considerar en esta técnica (TSAO, 1983).

Es así que fue común por muchos años, la utilización de frutas como cebos para aislar hongos de la familia Pythiaceae, especialmente el género Phytophthora (ZENTMYER, 1980; TSAO, 1983).

Con el fin de reducir la contaminación por otros hongos del suelo, como Pythium sp., se modificaron las técnicas. CAMPBELL (1949) modificó la técnica al introducir suelo en el fruto que era utilizado como cebo.

Los frutos de palto son un cebo muy selectivo para recuperar Phytophthora cinnamomi (ZENTMYER, 1960; ZENTMYER y OHR, 1978; TSAO, 1983). Además, la gruesa y firme piel de la palta sirve de barrera a otros hongos (ZENTMYER y OHR, 1978).

En esta técnica se deposita el fruto del palto en una muestra de suelo infectado por Phytophthora cinnamomi contenida en un recipiente. A la muestra se le adiciona un alto contenido de humedad y la fruta se incuba por cuatro a cinco días a una temperatura de 24°C - 27°C. Luego se remueve el fruto, se lava y deja a la misma temperatura por algunos días. La presencia del hongo se expresa con el desarrollo de manchas púrpuras o cafés en la zona de contacto del fruto con el agua (ZENTMYER et al., 1960; ZENTMYER y OHR, 1978).

Otros cebos utilizados para aislar Phytophthora cinnamomi son: frutos de manzano (CAMPBELL, 1949), hojas de pina (ANDERSON, 1951), semillas de Persea indica (ZENTMYER, 1960; ZENTMYER y OHR, 1978), radículas de

lupino (CHEE y NEWHOOK, 1965; MARKS et al., 1972), cotiledones de eucaliptus (MARKS y KASSEBY, 1974; GREENHALGH, 1978, citados por TSAO, 1983).

También se pueden aislar especies del género Phytophthora a partir de tejidos infectados del hospedero. Phytophthora cinnamomi puede ser detectado y aislado fácilmente desde raíces con la sintomatología típica de avance del hongo. Siendo el hospedero, la especie Persea americana Mill, se puede aislar rápidamente desde raicillas de 1-3 milímetros de diámetro que presenten la sintomatología típica correspondiente a una pudrición negra y firme, que se origina desde la zona de elongación. Las raicillas deben lavarse con agua destilada. Se cortan segmentos de aproximadamente 1 cm de largo que presenten la zona de avance del patógeno. Luego se pueden sumergir por unos segundos en una solución de alcohol al 70%, con el fin de prevenir posibles contaminaciones. En seguida se depositan sobre un trozo de papel absorbente y una vez secas se ponen en el medio de cultivo (AGRIOS, 1978; ZENTMYER, 1980; TSAO, 1983; COFFEY, 1991).

Phytophthora cinnamomi crecerá desde las raicillas afectadas en unas 48 horas a temperatura moderada (20 °C

- 28 °C) , permitiendo así obtener un cultivo puro (ZENTMYER, 1980) .

Son muchos los medios posibles de utilizar en el aislamiento de *P. cinnamomi*. como Cornmeal Agar, PDA, V-8 AGAR, aunque el uso de medios selectivos permite asegurar un mayor porcentaje de éxito (ZENTMYER, 1980; TSAO, 1983).

Se asegura un mayor éxito al utilizar medios selectivos en aislamientos a partir de hospederos infectados, porque ciertos antibióticos y fungicidas permiten minimizar la interferencia de bioantagonistas, como bacterias y hongos, que tienen una tasa de crecimiento mucho mayor a la especie del género *Phytophthora* (ECKERT y TSAO, 1962; TSAO, 1983). Incluso este género fue uno de los primeros para el cual se reportaron medios selectivos para su aislamiento (TSAO, 1970).

Los medios selectivos son frecuentemente más utilizados en aislamientos a partir de tejidos que del suelo, y más bien a partir de tejidos envejecidos, secos o muy decaídos (TSAO et al.,, 1976, citado por TSAO, 1983).

Si el medio selectivo es selectivo, no es necesario esterilizar la superficie de la muestra. Además, el uso inadecuado de desinfectantes causa muchas veces la muerte de Phytophthora, sp. cercana a la superficie desinfectada (TSAO, 1983).

Un medio selectivo efectivo contiene apropiadas concentraciones de agentes antimicrobiales que inhiben a un amplio espectro de hongos y bacterias indeseadas y que no son tóxicos para Phytophthora (ZENTMYER, 1980; TSAO, 1983), y se basan en el principio de inhibición selectiva (TSAO, 1970).

Es así como especies del género Pythium sp. y Mortierella sp. al crecer en este medio base, tienen un crecimiento débil no denso, de tal modo que las colonias de Phytophthora son claramente visibles y aislables (TSAO, 1983).

Dentro de la lista de medios selectivos más comunes, predomina como medio base el Agar Harina de Maíz (Corn meal) (ECKERT y TSAO, 1962; HAAS, 1964; ZENTMYER, 1980; TSAO, 1983), Agar jugo V-8 (ZENTMYER, 1980; BIELENIN y JONES, 1988; MATHERON y MATHJKA, 1988), Agar Papa Dextrosa (MASAGO et al., 1977) y otros como Agar de Malta, Agar de Arveja, Agar Agua (TSAO, 1983).

En relación a la utilización de otras sustancias, Phytophthora se caracteriza por responder frente a compuestos tóxicos en forma muy diferente a la gran mayoría de hongos. Por eso es posible usar excelentes químicos selectivos para aislar Phytophthora (BARTNICKI-GARCIA y WANG, citados por TSAO, 1983).

Los antibióticos, dentro de los químicos antimicrobiales, son los más efectivos y utilizados para la inhibición bacterial en los medios para aislar hongos (TSAO, 1970).

Existen agentes antibacteriales que provocan la inhibición de hongos Pythiaceos, especialmente del género Phytophthora. Algunos de ellos corresponden a cloranfenicol, clortetraciclina, neomicina, novobicina, oxitetraciclina y streptomycin (VAARTAJA, 1960; ECKERT y TSAO, 1962).

Sin embargo, existen otros antibióticos posibles de utilizar en medios selectivos para Phytophthora. como ampicilina, penicilina, rifampicina y varicomicina o sus combinaciones, cuando se utilizan en la concentración adecuada (ECKERT y TSAO, 1962; TSAO, 1983). De todos, la vancomicina, es generalmente el antibiótico más utilizado (TSAO, 1983).

En un medio selectivo se deben utilizar antibioticos que cumplan con las características de ser estables en el medio, solubles, poseer un amplio espectro de acción sobre bioantagonistas y no ser tóxicos para el microorganismo a cultivar (ECKERT y TSAO, 1962).

Tanto la penicilina como la vancomicina poseen estas características y son utilizadas en los medios selectivos para Phytophthora (ECKERT y TSAO, 1962).

Por otro lado, la pimaricina como la nistatina inhiben el desarrollo de hongos no pertenecientes a la familia Pythiaceae, siendo muchos de estos antagonistas de Phytophthora sp. ; pero no tiene un efecto inhibitorio detectable sobre el crecimiento y/o esporulación de Phytophthora sp. y Pythium sp. (VAARTAJA, 1960; ECKERT y TSAO, 1962). Además, la pimaricina es un antibiótico de amplio espectro, mayor que la nistatina y más efectivo (TSAO, 1983).

La piramicina al no inhibir la esporulación, no dificulta la identificación de la especies del género Phytophthora. Además es efectivo a bajas concentraciones, muy soluble y estable a altas temperaturas, pudiendo ser esterilizado al autoclavar el medio. Todas estas razones hacen que sea incluido este antibiótico en los medios selectivos para

las especies de este género (ECKERT y TSAO, 1962; OCANA y TSAO, 1966; TSAO, 1983).

Benomilo y pentacloronitrobenceno (PCNB) son dos fungicidas sintéticos, también utilizados en los medios selectivos para Phytophthora como agentes antimicóticos, pues son selectivos y no tóxicos para especies de este género y en general de la familia Pythiaceae (TSAO, 1983).

La tasa de crecimiento de Pythium sp. es usualmente mucho mayor a la de Phytophthora sp. en muchos medios comunes, por lo cual se dificulta su identificación y aislamiento desde tejidos y suelos infectados (MASAGO et al., 1977; DOMSCH, GAMS y TRAUTEHEIDI, 1980) . La incorporación de hymexasol en concentraciones de 25 y 50 microgramos/ml incluido en un medio selectivo, logra inhibir el crecimiento de Pythium sp., sin afectar el crecimiento de Phytophthora sp. (MASAGO et al., 1977; TSAO y GUY, 1977; SOLEL y PINKAS, 1984).

El fungicida hymexasol, por otro lado, resultó inhibitorio para Mortierella sp. , que generalmente está presente en altas densidades en el suelo dificultando así también el aislamiento de Phytophthora sp. (TSAO y GUY, 1977).

Similar efecto tiene iprodione en inhibir el crecimiento de Pythium sp. sin afectar a Phytophthora sp. (SOLEL y PINKAS, 1984).

El medio selectivo en base a Agar Harina de Maiz desarrollado por OCANA y TSAO (1966), denominado P10VP, y que contiene piramicina, vancomicina y PCNB, es muy efectivo para detectar y aislar especies del género Phytophthora. El uso de este medio selectivo ha permitido aislar con éxito Phytophthora cinnamomi a partir de raicillas infectadas (ZENTMYER, 1980).

JEFFERS y MARTIN (1986) reconocieron la utilidad del medio selectivo. P10VP, ya que no afecta la identificación de la especie del género Phytophthora.

OCANA y TSAO (1966) determinaron que las especies del género Phytophthora. incluyendo Phytophthora cinnamomi. presentan diferentes sensibilidades a la pimaricina. Si el medio selectivo contiene 100 ppm de pimaricina se inhibirá la germinación de las clamidosporas, sin embargo con 10 ppm no se ven afectadas. En cambio, el crecimiento micelial no se ve afectado al usar 100 ppm.

Reconocer las diferentes sensibilidades del micelio y clamidosporas, es particularmente importante al aislar

desde el suelo Phytophthora cinnamomi. donde las clamidosporas son normalmente el principal propágulo dormante (ZENTMYER, 1980).

2.3.2. Incubación

Phytophthora cinnamomi se favorece por temperaturas moderadas. El rango de temperatura óptima para su crecimiento es de 20°C hasta 32,5°C. La temperatura mínima es desde 5°C hasta 15°C y la máxima desde 30°C hasta 36°C. El crecimiento no es común a 36°C (ZENTMYER, 1980) .

La temperatura de incubación emplea el principio general de hacer las condiciones menos favorables para el desarrollo de microorganismos indeseados asociados a Phytophthora. aunque las condiciones estén bajo el óptimo de las diferentes especies del género. Temperaturas bajas de incubación, 15°C- 20°C, reducen la tasa de multiplicación en bacterias, muchas de las cuales son extremadamente antagonistas para Phytophthora. siendo la supresión del crecimiento bacteriano especialmente importante durante el primer y segundo día. También aparece Pythium, sp. en la mayoría de los medios para aislar Phytophthora. y su crecimiento se ve disminuido por temperaturas bajas de incubación (TSAO, 1983).

Debido a que la luz inactiva la pimaricina y otros poliénicos, los medios selectivos para Phytophthora que contienen estos químicos deben ser incubados en la oscuridad (TSAO, 1983).

También BIELENIN y JONES, (1988); FALLONM y GROGAN, (1988); JEFFERS y ALDWINCKLE, (1988) coinciden en esta condición en sus experiencias con diferentes especies del género Phytophthora.

La emergencia de las colonias de Phytophthora sp. a partir de trozos de tejidos o partículas de suelo infectado sobre medios selectivos, usualmente comienza entre el primero y segundo día, y muchas veces es completada recién al tercer a cuarto día. Otras veces puede demorar incluso entre seis a siete días, hasta tener establecida una colonia visible, pues los propágulos dormantes pueden necesitar más tiempo para germinar (TSAO, 1983).

2.3.3. Esporulación

2.3.3.1. Potencial hídrico

La humedad del suelo es uno de los factores ambientales más importantes para Phytophthora cinnamomi en relación al crecimiento y esporulación. La humedad relativa

cercana al 100% favorece la producción de esporangios (ZENTMYER, 1980; RIBEIRO, 1978) .

Phytophthora cinnamomi sólo forma esporangios en medios de cultivo líquido, como en extractos de suelo (MEHRLICH, 1935, citado por ZENTMYER, 1980; ZENTMYER y MARSHALL, 1959), y raramente o nunca los forma en medios sólidos (ZENTMYER, 1980) .

Las soluciones minerales salinas inducen a la formación de esporangios (CHEN y ZENTMYER, 1970; ZENTMYER 1980).

El agua no es indispensable para la producción de clamidosporas y oosporas, sin embargo, pueden ser producidas en un medio líquido (MIRCETICH y ZENTMYER, 1967) .

Se observó que Phytophthora cinnamomi tiene el mayor crecimiento "in vitro" en medios de cultivo líquido, cuando el potencial osmótico es del orden de -2 a -8 bars, que corresponde al rango de tolerancia de la mayoría de las plantas económicamente interesantes. Este patógeno no crece a potenciales osmóticos del orden de -20 hasta -30 bars (STERNE, 1976; STERNE et al., 1976, citados por ZENTMYER, 1980).

La producción de esporangios es usualmente óptima cuando el rango del potencial métrico se encuentra entre $-0,025$ y $-0,3$ bars (DUNIWAY, 1975).

La aireación en combinación con la humedad, es un factor importante en la formación de esporangios (ZENTMYER, 1980).

La alta humedad del suelo favorece la infección, porque existe un aumento en la formación de esporangios y proporciona las condiciones para la liberación, movilidad y transporte de las zoosporas (ZENTMYER, 1980; COFFEY, 1991).

2.3.3.2. Temperatura

Phytophthora cinnamomi forma esporangios principalmente cuando la temperatura se encuentra entre 21°C y 31°C , y oosporas cuando se encuentra entre 16°C y 21°C (ZENTMYER, 1980; COFFEY, 1991).

No se observa producción de esporangios a temperaturas inferiores a 12°C y superiores a 30°C , sin embargo, su producción es abundante a 24°C (ZENTMYER y MARSHALL, 1959).

2.3.3.3. pH

Generalmente se considera que Phytophthora cinnamomi crece mejor en un medio ácido (ZENTMYER, 1980).

Reduciendo el pH de un extracto de suelo no estéril desde 7,4 hasta 4,5 , se determinó que la producción de esporangios no disminuía (ZENTMYER y MARSHALL, 1959).

CHEE y NEWHOOK (1965), citados por ZENTMYER (1980), obtuvieron una buena producción de esporangios en extracto de suelo no estéril cuando el pH se encontraba entre 4 y 7 .

ZENTMYER (1980) a través de toda la evidencia, determina que el pH entre 6 y 6,5 sería el óptimo para la producción de esporangios.

2.3.3.4. Aireación

Phytophthora cinnamomi: se caracteriza por ser tolerante a diferentes concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono, en relación al crecimiento micelial y a la producción y germinación de sus esporas (MITCHELL y ZENTMYER, 1971) .

La infección puede ser acelerada con una buena aireación, pues es importante en la producción de esporangios. Sin

embargo la interrelación entre el potencial hidrico y la aireación es compleja (ZENTMYER, 1980).

La producción de esporangios se puede ver reducida por la falta de oxígeno o también afectada por un exceso de dióxido de carbono (MITCHELL y ZENTMYER, 1971) .

GOODING y LUCAS (1959) concluyen que la formación de esporangios ocurre en las zonas donde el micelio toma contacto con la superficie de la solución de incubación.

2.3.3.5. Luz

GOODING y LUCAS (1959) concluyen que la luz es indiferente en la formación de esporangios en Phytophthora parasítica var. nicotianae. Sin embargo, según ARAGARI y HIÑE (1963) la luz puede inhibir, no influir o estimular la esporulación de las especies pertenecientes al género Phytophthpra.

ZENTMYER (1980) concluye que la producción de esporangios en extractos de suelo era mayor en oscuridad y mínimo con luz continua.

ZENTMYER y RIBEIRO (1977) determinan que la producción de esporangios en phytophthora cinnamomi no depende de la luz. Los esporangios son formados bajo un amplio rango de

longitudes de onda, extendiéndose desde 300 nm (cercano UV) hasta 1300 nm (infrarrojo) y en la oscuridad.

Aparentemente P. cinnamomi se encuentra adaptada para producir esporangios a cualquier profundidad, pues la luz no es requerida para producirlos (ZENTMYER, 1980).

2.3.3.6. Agentes microbiológicos

ZENTMYER y MARSHALL (1959), a través de sus investigaciones, comprobaron que la producción de esporangios en Phytophthora cinnamomi. no ocurre cuando se autoclava o se filtra con filtro bacteriológico la muestra de extracto de suelo.

Estos estudios indican que un agente microbiológico, probablemente una bacteria, está involucrada en el proceso de estimulación para la producción de esporangios (ZENTMYER, 1980; COFFEY, 1991) .

Se encontró que las especies del género Pseudomorias. son agentes microbiológicos, con un rol importante en la estimulación para la formación de esporangios (CHEE y NEWHOOK, 1965; AYERS y ZENTMYER, 1970).

2.3.3.7. Nutrición

AYERS y ZENTMYER (1971) postulan que las bacterias y

otros microorganismos en una muestra de extracto de suelo no estéril contribuyen a alcanzar la baja condición nutritiva que favorece el cambio del estado vegetativo al de esporulación.

FAUCETT y KLOTZ (1934), citados por CANCINO (1966), idearon un medio para inducir la formación de esporangios en phytophthora sp. Para ello transfirieron el micelio desde el agar nutritivo a un caldo débil de jugo de ciruelas, incubándolo por unos 10 a 15 días. Luego se transfirió a una placa de petri con agua hasta quedar sumergido, logrando inducir una gran producción de esporangios.

GOODING y LUCAS (1959) utilizan diferentes soluciones de incubación a 24 °C para inducir la formación de esporangios en phytophthora parasítica var . nicotianae. como: agua bidestilada, agua destilada y solución de nitrato de potasio 0,01 M en agua destilada. El micelio se transfiere desde una placa con PDA a otra con la solución correspondiente, humedeciendo sólo el micelio y obteniendo la mayor cantidad de esporangios en la solución de nitrato de potasio 0,01 M y la menor en agua bidestilada. Además, determinan que la profundidad con que se sumerge el micelio debe ser sólo la suficiente

para humedecerlo, porque la producción de esporangios disminuye en la medida que la profundidad aumenta hasta cubrir el micelio.

WILLS (1954), citado por GOODING y LUCAS (1959), señala que la solución de incubación tiene elementos capaces de iniciar las transformaciones bioquímicas para la formación de esporangios. Además, concluye que esto se logra con la adición de compuestos iónicos.

HALBALL y FORRESTER (1977), citados por ETCHEVERRY (1991), indican que la presencia de iones como K^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Ca^{+} en la solución de incubación, pueden estimular la esporulación del género Phytophthora.

CHEN y ZENTMYER (1970) encontraron que la formación de esporangios en Phytophthora cinnamomi se puede obtener al agotar el contenido nutritivo del micelio joven, por medio de continuos lavados con agua destilada estéril, seguido por una incubación en una solución salina.

2.3.3.8. Edad

GOODING y LUCAS (1959) determinan que en la medida que el micelio envejece, aumenta la tendencia a formar esporangios en Phytophthora parasítica var nicotianae.

En cambio, AYERS y ZENTMYER (1971) señalan que el micelio juvenil forma con mayor facilidad esporangios, que un micelio con varias semanas de edad. Por lo tanto, ellos prefieren trabajar con micelio joven y en activo crecimiento.

2.3.4. Metodología de inoculación

McINTOSH (1964) , citado por CANCINO (1966) señala que la inoculación al sustrato es una buena alternativa de infección, que se ve favorecida con abundante riego.

La fuente de inóculo que se requiere para la infección, pueden ser las estructuras reproductivas o las infectivas. En la segunda alternativa se encuentran los trozos de hifas resultantes de la fragmentación del micelio (RIBEIRO, 1978) .

En el caso de Phytophthora cinnamomi se utiliza el micelio fragmentado como partícula de inóculo. Esta es una buena alternativa, pues resulta difícil inducir la formación de las estructuras reproductivas en esta especie (ZENTMYER, 1980) .

El mismo autor señala que la acción del micelio de Phytophthora cinnamomi. puede producir infección en la zona de elongación de la raíces.

Buenos resultados obtiene, BAKTOLOTTI (1989), al realizar inoculaciones al sustrato con micelio fragmentado en kiwi, espárragos y frambuesa. En estos ensayos las concentraciones fueron: $2 \cdot 10^8$ propágulos/ml en kiwi y espárragos; $4 \cdot 10^8$ propágulos/ml en frambuesa.

Se señala también que la concentración de la suspensión de propágulos en especies del género Phytophthora debe fluctuar entre $1 \cdot 10^8$ hasta $1 \cdot 10^9$ propágulos/ml, para asegurar una buena infección (LATORRE, 1992)*.

*LATORRE, B. Ing. Agr. M.Sc., PhD. Pontificia Universidad Católica de Chile. Comunicación Personal.

2.3.5. Evaluación del daño en piñatas de palto afectadas

Para evaluar la severidad del daño causado por P. cinnamomi en paltos adultos, se han utilizado dos métodos: el primero consiste en evaluar el crecimiento del brote durante una o dos temporadas, y el otro en una apreciación visual. Es así, como PINTO y CARREÑO (1986), al evaluar diferentes tratamientos químicos, marcaron cinco brotes terminales por árbol, a 15 cm por debajo de la yema apical. Los brotes se seleccionaron al azar, en el contorno de los árboles en direcciones opuestas y se midió en dos temporadas por varios períodos el último crecimiento. Sin embargo, en la segunda temporada de evaluación determinaron que el óptimo número de brotes era de 9-10 por planta.

Otra forma de evaluar la severidad de la enfermedad es la utilizada por COFFEY en 1991, mediante una escala numérica cuyo rango iba de cero a cinco, basándose esta escala en la sintomatología visual, donde cero corresponde a un árbol sano y cinco a un árbol severamente afectado. La escala es subjetiva y considera el vigor del árbol, la defoliación, muerte de ramillas y coloración del follaje.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Ubicación del ensayo:

Para llevar a cabo este ensayo se seleccionaron árboles de la especie Persea americana. Mill, variedad Hass sobre patrón Mexicola, ubicados en la Estación Experimental La Palma, perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, ubicada en la provincia de Quillota, Quinta región.

Los paltos fueron seleccionados por presentar diversos grados de desarrollo de la enfermedad "Tristeza del palto", con el propósito de aplicar diversas cargas de agua (reducidas en 15% y 35%), con el fin de determinar el efecto que tiene la reducción de la carga de agua en la recuperación de los paltos afectados por phytophthora cinnamomi.

La muestra está formada por 18 paltos sanos, 18 paltos moderadamente afectados y 18 paltos severamente afectados por Phytophthora cinnamomi.

La superficie abarcada en total por el ensayo, es de aproximadamente 15.000 metros cuadrados, encontrándose dividido este ensayo en seis bloques. Por lo tanto, se eligieron al azar, dentro de cada bloque, tres árboles

sanos, tres árboles moderadamente afectados y tres árboles severamente afectados por Phytophthora cinnamomi.

3.2. Elección de los árboles:

La muestra de 54 árboles se eligió en base a la sintomatología visual, considerando por lo tanto el vigor del árbol, el estado de la canopia, presencia de ramillas muertas, coloración del follaje, tamaño de las hojas, carga frutal, calibre de los frutos, la sanidad y cantidad de raicillas presentes bajo la canopia.

3.2.1. Caracterización de los grados de severidad de daño

Para la clasificación de los paltos en tres grados de severidad de daño, se utilizó la siguiente escala, en donde:

-árbol sano: es un árbol vigoroso, tupido, con gran número de brotes sanos y vigorosos; no presenta ramillas muertas, el follaje presenta una tonalidad verde y sus hojas alcanzan un buen tamaño; su carga frutal es adecuada y de buen calibre. El sistema radicular presenta un gran número de raicillas que cubren prácticamente toda la superficie bajo la canopia y presentan un porcentaje ínfimo de raicillas con pudrición. Las

raicillas tienen una tonalidad que va desde blanco hasta amarillo leve.

-árbol medianamente afectado: presenta características intermedias entre un árbol sano y uno severamente enfermo. Es decir, los árboles clasificados en esta categoría son árboles decaídos, con moderado vigor. El follaje empieza a decaer, se observa clorótico y las hojas son de menor tamaño. La brotación es mediana a baja y de poco vigor. La carga frutal es adecuada, pero de menor calibre. El sistema radicular se ve ya afectado, pero no cuesta encontrar raicillas bajo la canopia. Apreciando, sin embargo, que en su mayoría presentan el síntoma característico de avance del patógeno desde la zona de elongación, que corresponde a una pudrición negra y firme.

árbol severamente afectado: presenta a simple vista falta de vigor, se ve muy decaído, el follaje reducido, pues ha perdido paulatinamente sus hojas, y se han secado los extremos de las ramillas. Es decir, es un árbol a través del cual se puede ver el otro lado y el follaje que aún conserva está clorótico. No existe prácticamente

brotación en esta etapa de la enfermedad. La carga frutal es baja y de calibre pequeño. Por lo tanto, se aprecia un colapso generalizado y el porcentaje de raíces sanas es prácticamente nulo, siendo difícil encontrar raicillas bajo la canopia, pues en su mayoría ya han sido desintegradas por el patógeno. Las pocas raíces que se encuentran tienen la pudrición avanzada y en las raíces más viejas se aprecian manchas de color castaño.

3.3. Aislamiento:

3.3.1. Muestreo de raíces

Se tomaron muestras de raíces en los cuatro puntos cardinales de cada árbol que compone la muestra, ya sea sano, moderadamente afectado o severamente afectado.

Se utilizó una pala para extraer las muestras que contenían trozos de raicillas, raíces secundarias y principales, junto a un buen volumen de suelo, para evitar que se deshidrataran.

Las muestras se depositaron por separado en bolsas de polietileno, siendo clasificadas y posteriormente llevadas al laboratorio de Fitopatología de la Facultad

de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso.

En el laboratorio se lavaron las raíces de cada muestra con agua bidestilada, para posteriormente extraer de ellas, ocho o diez segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, desde la zona marginal de la lesión, es decir la zona de avance del patógeno. Estos segmentos se lavaron en agua bidestilada estéril, para ser secadas luego sobre papel absorbente.

Una vez secos los trozos de tejido, fueron depositados en el medio de cultivo selectivo P10VP (OCANA y TSAO, 1966), siendo posteriormente incubadas en oscuridad durante siete días a una temperatura promedio de 22°C, en cámara de incubación.

3.3.2. Medios de cultivo

Se utilizó inicialmente el medio selectivo P10VP, formulado en base al medio agar harina de maíz, que contiene además 10 mg/l de pimariciina, 200 mg/l de vancomicina y 100 mg/l de pentacloronitrobenceno.

Transcurridos los siete días correspondientes al tiempo de incubación, se determinó el porcentaje de recuperación del patógeno a partir de las raíces y se procedió a extraer tres trozos desde el margen de las colonias en

activo crecimiento, siendo repicados a Agar Agua, y nuevamente incubadas a 22°C. Luego fueron nuevamente sembradas en PDA y una vez que se comprobó la pureza de la colonia, se extrajeron trozos de cultivo puro para ser guardados en Agua destilada estéril.

Las características propias del micelio desarrollado en los diferentes medios de cultivo fueron observados macroscópicamente y microscópicamente.

3.3.3. Conservación de las cepas obtenidas en los aislamientos

Se procedió a conservar los aislamientos, cuando se obtuvieron colonias puras en Agar Papa Dextrosa. Para ello se removieron cinco trozos de micelio puro desde el margen de la colonia en activo crecimiento. Siendo posteriormente traspasados a un tubo con tapa rosca que contenía cinco ml de agua destilada estéril. El tubo se cerró y selló con parafilm y se dejaron por cinco días a 22°C, para ser luego trasladado a un refrigerador a 5° +/- 1°C.

3.4. Identificación de Phytophthora sp.

3.4.1. Aislamientos a identificar

En el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, se seleccionó un conjunto de aislamientos, eligiéndose al menos uno de un grupo con iguales características de colonia y micelio, siendo utilizados los aislamientos de cultivos puros, C8, C16, C25, C33, C34, C38, C48, C51 y C52, aislados de las muestras de raíces, los que fueron sometidos a distintos tratamientos, destinados a inducir la esporulación, necesaria para la correcta identificación del género y o especie de Phytophthora.

3.4.2. Tratamientos para inducir la esporulación

Los aislamientos fueron cultivados en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa. La incubación se realizó en la cámara durante ocho días a 25°C.

Posteriormente, de cada cultivo se extrajeron con el sacabocado de 6 mm, diez trozos desde el borde en activo crecimiento de las colonias, las que fueron colocadas en placas de petri con seis diferentes tratamientos correspondiente a distintos caldos o soluciones para lograr esporulación.

Tratamiento N°1 : Consistió en colocar los diez trozos de micelio en una placa de petri que contenía 15 ml

de jugo diluido do extracto de zanahoria como solución de incubación. Las placas fueron incubadas en la cámara por 72 horas a 25°C.

Tratamiento N°2 :Se procedió a lavar los diez trozos de micelio con agua bidestilada estéril a 5°C, para luego sumergirlos en una solución salina durante 4 minutos.

La solución salina fue formulada utilizando:

Ca (NO ₃) ₂	: 2,36 g/l
KN ₃	: 0,50 g/l
Mg S ₄ * 7 H ₂ O	: 1,00 g/l
QUELATO DE Fe	: 1,00 g/l
EDTA	:13,00 g/l
KOH	: 7,50 g/l
Fe S ₄ * 7 H ₂ O	:12,45 g/l

Posteriormente se lavó el micelio con agua bidestilada estéril. Luego fue incubado por 72 horas a 25°C en una solución de extracto de suelo al 15%. Terminado este periodo, fue repetido una vez más el procedimiento.

Tratamiento N°3 : Los diez trozos de micelio se colocaron en una solución de incubación compuesta por agua

bidestilada estéril, y nitrato de potasio (KNO_3 0,1 M) . El micelio fue incubado en la cámara por 72 horas a 25°C .

Tratamiento N°4 : Los trozos de micelio fueron colocados en una solución de jugo hervido de zanahorias más KNO_3 (0,1 M), siendo también incubado en la cámara por 72 horas a 25°C .

Tratamiento N°5: Los trozos de micelio fueron colocados en una solución de suelo al 15%, preparada con agua bidestilada estéril, incubándose luego por 72 horas a 25°C .

Cumplido el plazo de incubación en la cámara, se procedió a buscar esporangios u otras estructuras reproductivas.

Tratamiento N°6: Los aislamientos fueron cultivados en el medio de cultivo Agar Agua. La incubación se realizó en la cámara por tres días a 25°C . Posteriormente, de cada cultivo se extrajo diez trozos de 1cm de diámetro desde el borde de crecimiento de las colonias, los que fueron colocados en una solución de incubación compuesta por 100 g de arvejas, 0,8 g de carbonato de calcio y 1 l de agua destilada.

Este caldo se preparó moliendo los 100 g de arvejas congeladas y agregándole inicialmente 200 ml de agua destilada. Se hirvió por tres minutos a fuego lento. Luego se adicionaron los 800 ml restantes de agua destilada, para completar el litro.

Por último se agregaron los 0,8 g de carbonato de calcio y fue posteriormente filtrado dos veces, utilizando para ello muselina. Luego se autoclavó el caldo por 20 minutos.

La incubación en el caldo de arvejas duró cinco días a 25°C en la cámara.

Transcurrido este período se procedió a lavar el micelio con agua bidestilada estéril. Después fue transferido el micelio a una nueva placa con 15 ml de agua bidestilada estéril, siendo nuevamente incubada en la cámara a 25°C por cinco días. Al término de ellos, se procedió a buscar esporangios o estructuras reproductivas en el micelio.

3.5. Ensayo de patogenicidad:

El ensayo de patogenicidad fue realizado en plantas de

palto var. Edranol, provenientes del vivero de la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso.

Se seleccionó material vegetal aparentemente sano, altura homogénea y vigor equivalente.

Las plantas se mantuvieron en los contenedores originales de polietileno de ocho l, cuyo sustrato estaba compuesto por una mezcla de tierra, arena y tierra de hoja, en relación 1:1:1. El sustrato fue previamente esterilizado con vapor.

La inoculación se efectuó utilizando aislamientos provenientes de los paltos que componen la muestra de 54 plantas, que presentaban el cuadro patológico correspondiente a la enfermedad denominada "tristeza" del palto, causada por Phytophthora cinnamomi.

Para tal efecto, se utilizaron las cepas 16, 25, 34, 38 y 52 que presentaban el crecimiento micelial con patrón tipo roseta o tipo camelia sobre PDA, que es una característica morfológica de la mayoría de los aislamientos realizados de Phytophthora cinnamomi.

3.5.1. Inoculación al sustrato

El ensayo se llevó a cabo con 18 plantas de palto o unidades experimentales, utilizando tres por cada tratamiento correspondiente a una cepa, más el respectivo tratamiento testigo.

Para realizar la inoculación se vació micelio puro correspondiente a tres placas de cada aislamiento de seis días de edad a 300 ml de agua bidestilada estéril.

El micelio contenido en agua fue fraccionado durante cinco minutos en el agitador mecánico.

La suspensión se adicionó directamente al sustrato de cada planta, recibiendo cada una 50 ml de la suspensión correspondiente.

Una vez homogenizada la mezcla se midió la concentración de propágulos infectivos en cada suspensión, mediante la utilización de un hematocímetro, obteniéndose las siguientes concentraciones:

CEPA	CONCENTRACION DE PROPAGULOS INFECTIVOS N° propágulos/ml	TIPO DE INOCULACION
C 16.	$1,90 \cdot 10^6$	al sustrato
C 25.	$1,35 \cdot 10^6$	al sustrato
C 34.	$1,50 \cdot 10^6$	al sustrato
C 38.	$1,65 \cdot 10^6$	al sustrato
C 52.	$1,25 \cdot 10^6$	al sustrato
Test.	--	--

Al tratamiento testigo se le adicionaron 50 ml de agua destilada por planta.

Las inoculaciones se realizaron la primera semana de noviembre.

Se procuró inundar y saturar por completo el contenedor, para lo cual se regó cada planta con 500 ml cuatro veces al día, durante tres meses.

Las plantas o unidades experimentales se dispusieron aleatoriamente en un sombreadero.

3.6. Evaluación:

3.6.1 Evaluación descriptiva

Se realizaron observaciones descriptivas relacionadas con

aspectos morfológicos y fisiológicos de las plantas, ya sea clorosis foliar, vigor, cantidad de raíces y sanidad de ellas.

3.7. Recuperación de Phytophthora cinnamomi:

El patógeno fue reaislado desde las raíces infectadas de las unidades experimentales, utilizando técnicas mencionadas en el punto 3.3.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Sintomatología de los árboles que componen la muestra:

4.1.1. Sintomatología aérea

La sintomatología aérea observada en los paltos medianamente afectados y severamente afectados (Cuadro 1, Anexo 1) es similar a la sintomatología aérea asociada a la enfermedad causada por Phytophthora cinnamomi, que es descrita por VERGARA (1957); BEKEY (1987); LATORRE (1988a); ZENTMYER (1980); COFFEY (1991).

Por lo tanto son paltos que presentan clorosis, defoliación y muerte progresiva de las ramillas (Figura 1).

CUADRO 1. Sintomatología de los paltos del ensayo asociado a la enfermedad causada por Phytophthora sp.

Arboles sanos: Todos los árboles considerados sanos en el ensayo se caracterizan por poseer un vigor alto, abundante brotación, sin presencia de clorosis foliar y una alta carga.

Arboles medianamente enfermos: Los árboles considerados medianamente enfermos en el ensayo se caracterizan por poseer un vigor medio, brotación moderada, clorosis moderada y baja carga.

Arboles severamente enfermos: Los árboles considerados enfermos se caracterizan por presentar un vigor bajo, escasa brotación, presencia clorosis severa y baja carga.



FIGURA 1. A: Síntomatología de un palto severamente enfermo. Nótese la presencia de brotes defoliados en la parte aérea

B: Síntomatología de un palto medianamente enfermo.



FIGURA 1. C: Sintomatología de un palto sano. Nótese la presencia de abundantes brotes vigorosos.

4.1.2. Sintomatología del sistema radicular

La pudrición negra y firme a nivel radicular en los árboles medianamente y severamente afectados, es también similar a la sintomatología asociada a la enfermedad denominada "tristeza" del palto causada por Phytophthora cinnamomi y descrita por ZENTMYER (1980) y COFFEY (1991).

Además, se observa que en la medida, que los árboles se encuentran más comprometidos disminuye también el cubrimiento radicular bajo la canopia (Cuadro 2, Anexo 2).

Se manifiesta claramente que la sintomatología aérea es el reflejo del estado sanitario de las raíces, concordando con lo señalado por ZENTMYER (1980).

CUADRO 2. Sintomatología del sistema radicular de los paltos que componen la muestra, asociado a la enfermedad causada por Phytophthora sp.

Arboles sanos: Presencia de abundantes raíces y todas se observan visualmente sanas en los cuatro sectores evaluados de todos los árboles considerados sanos.

Arboles medianamente enfermos: Presencia moderada de raíces y se observan desde moderadamente afectadas a muy afectadas en los cuatro sectores evaluados de los árboles.

Arboles severamente enfermos: Ausencia de raíces o presencia escasa en los cuatro sectores evaluados de los árboles. Las escasas raíces se observan severamente dañadas.

4.2. Aislamiento:

4.2.1. Recuperación de Phytophthora sp. desde las muestras de raíces

Se recuperó Phytophthora sp. a partir de cada palto o unidad experimental que compone el ensayo, independiente del grado de afección, determinando así el porcentaje de recuperación en cada unidad experimental (Anexo 3) . Los porcentajes obtenidos indican que existe una exitosa recuperación del patógeno, tanto en árboles medianamente y severamente enfermos, como en árboles sanos.

Esto nos señala que la mejor forma de evaluar la severidad de la enfermedad es la apreciación visual de la canopia o evaluación del largo del brote (aspecto que será realizado en la segunda etapa).

También nos indica que el huerto de palto seleccionado está infectado con Phytophthora en forma más o menos pareja, por lo que se podría esperar una respuesta al manejar adecuadamente el agua de riego.

4.2.2. Medios de cultivo

De acuerdo a los resultados obtenidos, se comprueba que el medio selectivo P10VP fue eficiente para aislar Phytophthora sp. a partir de las raíces dañadas que presentaban el síntoma característico de avance del hongo. Esto concuerda con lo señalado por OCANA y TSAO (1966) y ZENTMYER (1980).

Se confirmó que el uso del medio de cultivo Agar Agua minimiza el crecimiento de bioantagonistas y no el de Phytophthora sp. Esto es corroborado por TSAO (1983) .

En algunas cepas fue necesario realizar constantes repiques, para eliminar la interferencia de agentes antagonistas, como Pythium sp. y ciertas bacterias. Esto ocurre principalmente en medios de cultivo no selectivos y nutritivos, como Agar Papa Dextrosa.

4.2.3. Conservación de las cepas aisladas

Los aislamientos C8, C16, C25, C33, C34, C38, C48, C51, y C52 de Phytophthora sp. conservados en agua destilada estéril a 5 °C + /- 1 °C durante dos hasta tres meses, fueron recuperados sin problema en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).

4.3, identificación de Phytophthora sp.

El micelio de los aislamientos C8, C16, C25, C33, C34, C38, C48, C51 y C52 presentó las siguientes características morfológicas: cenocítico, hialino, muy ramificado, ramificaciones en ángulo recto, aspecto coraloide y nudoso (Figura 3.A).

Las colonias de los aislamientos C8, C16, C33 y C38, presentaron crecimiento tipo camelia (Figura 2.A), y los aislamientos C25, C34, C48, C51 y C52 tipo roseta (Figura 2.B).

Debido al crecimiento tipo roseta o camelia, que presentan las colonias de los aislamientos en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa, y a las características morfológicas del micelio, se presume que pertenecen al género Phytophthora.

Sin embargo, para identificar la especie involucrada en los aislamientos, es necesario contar con la presencia de estructuras reproductivas.

Esto se logró en los aislamientos C16 y C34 (Figura 3.C), cuando se realizó el tratamiento de inducción de la esporulación número tres y seis, determinando así que las cepas 16 y 34 corresponden a Phytophthora cinnamomi .

Los restantes aislamientos C0, C25, C33, C38, C48, C51 y C52 sometidos también a los distintos tratamientos, no pudieron ser identificados debido a la ausencia de estructuras reproductivas.

Sin embargo, en todos los aislamientos sometidos a los tratamientos tres y seis, se observó la presencia de un gran número de clamidosporas, en su mayoría terminales (Figura 3.B).

Posiblemente los aislamientos no identificados perdieron su capacidad reproductiva por el largo período que transcurrió desde el aislamiento hasta que se realizaron los tratamientos de inducción de la esporulación. AYERS y ZENTMYER (1971) determinaron esta misma condición.

El tratamiento número seis logró inducir la esporulación, lo cual es respaldado por AYERS y ZENTMYER (1971), quienes postulan la necesidad de alcanzar una baja condición nutritiva para lograr el cambio del estado vegetativo al de esporulación. Esto se habría realizado al transferir el micelio previamente lavado, desde el caldo de incubación de arvejas a una nueva placa con agua bidestilada estéril.

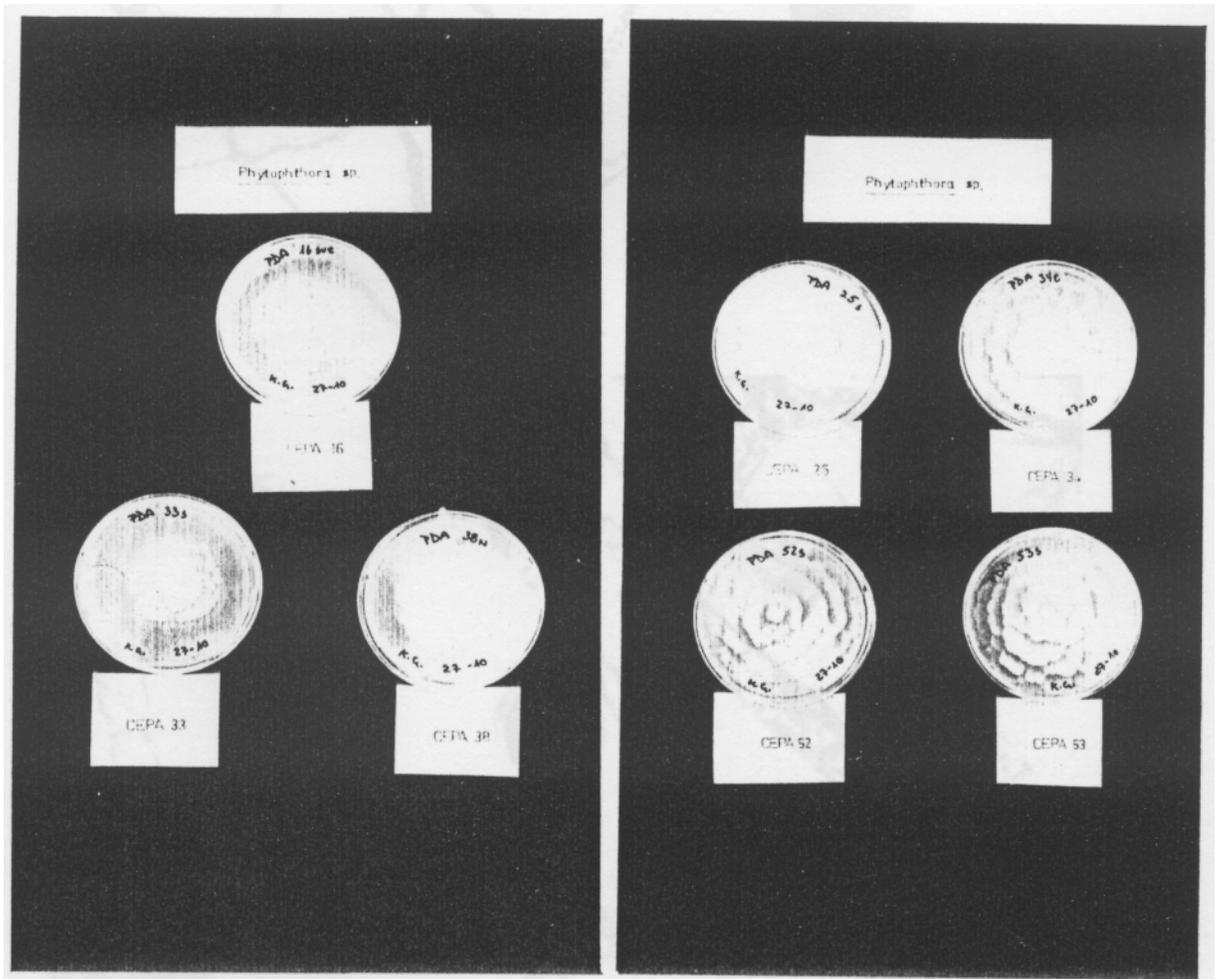


FIGURA 2. A: aislamientos, C16 , C33 y C38, con patrón de crecimiento tipo camelia.

B: aislamientos, C25, C34, C52 y C53, con patrón de crecimiento tipo roseta.



FIGURA 3. A: Vista microscópica (20 x) del micelio del aislamiento C34, identificado como *Phytophthora cinnamomi*. B: Vista microscópica (40 x) de una clamidospora terminal del aislamiento C34. Mide 28,9 micrómetros de diámetro. C: Vista microscópica (40 x) de un esporangio del aislamiento C34 . Mide 29.5 * 23.4 micrómetros.

4.4. Evaluación del ensayo de patogenicidad:

Se eligieron al azar dos plantas de palto de las tres existentes por cada tratamiento correspondiente a cada cepa, más dos plantas testigo de un total de tres para evaluar la patogenicidad de las cepas aisladas en terreno.

4.4.1. Evaluaciones descriptivas

Se evaluó el vigor de las plantas, la clorosis del follaje y el estado sanitario del sistema radicular.

Se utilizó una escala numérica desde cero hasta cinco, donde cero corresponde a un árbol sano y cinco a un árbol severamente afectado.

La evaluación en base a la sintomatología visual (Cuadro 3) arrojó diferencias notorias entre el testigo y las plantas inoculadas con los aislamientos C16 y C38. Existe también una diferencia menos marcada con los aislamientos C25 y C34, pero la inoculación con C52 no tiene casi diferencia con el testigo.

La clorosis es un sintoma importante del follaje en árboles afectados por especies del género Phytophthora (PINTO y ENGLISH, 1972; MORALES, 1985)

En las plantas evaluadas, la necrosis superó a la etapa de pudrición de raicillas, existiendo una pudrición severa con destrucción del tejido radicular (Figura 4).

La sintomatología observada al final del del ensayo es similar a la descrita por ZENTMYER (1980) y COFFEY (1991) en paltos.

ZENTMYER (1980) indica que cepas aisladas de una misma especie pueden poseer diferente grado de virulencia. Similar situación se presenta al observar los resultados de la evaluación del ensayo de patogenicidad, siendo las cepas 16 y 38 las más patogénicas y la cepa 52 la menos patogénica.

Sin embargo, las diferencias observadas entre el testigo y las plantas inoculadas con los distintos aislamientos, pueden atribuirse en parte al diferente grado de virulencia de las cepas, como también a la influencia de la cantidad de inóculo.

CUADRO 3. Sintomatología aérea, sintomatología radicular y evaluación del grado de afección en los paltos inoculados al sustrato.

Cepa	Repetición	Sintomatología Aérea	Estado Sanitario de las Raíces	* Evaluación
C16	R1 y R2	.Clorosis severa .bajo vigor	.Totalmente .desintegradas.	5
C25	R1 y R3	.Clorosis severa .bajo vigor	.Severamente .afectadas	3
C34	R1 y R2	.Clorosis .moderada, .vigor medio	.Moderadamente .afectadas	2
C38	R1	.Clorosis severa .bajo vigor	.Severamente .afectadas	3
	R2	.Clorosis severa .bajo vigor, .necrosis en .ramillas	.Totalmente .desintegradas.	5
C52	R2 y R3	.Clorosis leve .vigoroso	.Levemente .afectadas	1
Test.	R1 y R2	.Clorosis leve .vigoroso	.Visualmente .sano	0

* 0 a 5, donde 0 corresponde a una planta sana y 5 a una planta severamente afectada.

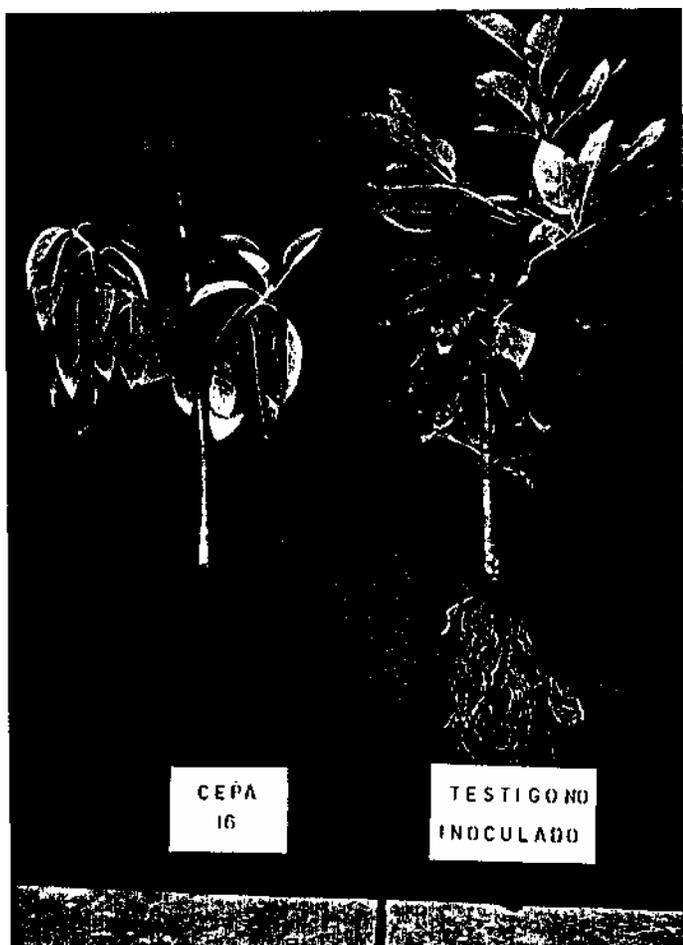


FIGURA 4 : Síntomatología observada en las plantas inoculadas en los aislamientos C16 y C38 en relación al testigo.

4.5. Reaislamiento de Phytophthora sp .

Realizados los procedimientos necesarios para reaislar el hongo desde las raíces de las plantas de palto inoculadas al sustrato, sólo fue posible obtener Phytophthora sp. desde las unidades experimentales inoculadas con las cepas C16 y C38.

5. CONCLUSIONES

En esta investigación se pudo seleccionar plantas de palto con tres grados de ataque de "Tristeza", siendo el mejor método de selección la apreciación visual de la canopia en conjunto con la evaluación de las raíces. El aislamiento de cepas de Phytophthora a partir de raíces enfermas fue llevado a cabo con éxito al utilizarse la metodología desarrollada por ZENTMYER (1980).

En relación a la identificación de cepas de Phytophthora, la mejor metodología fue al utilizarse una solución de incubación a base de arvejas, que permitió identificar los aislamientos C16 y C34, como Phytophthora cinnamomi. Sin embargo los aislamientos C8, C25, C33, C38, C48, C51 y C52 no pudieron ser identificados, dado que al ser sometidos al mismo tratamiento de inducción de la esporulación, no formaron estructuras reproductivas.

Finalmente, se probó la patogenicidad de los aislamientos de Phytophthora correspondientes a las cepas C16, C38, C25 y C34 obtenidos a partir de las muestras de raíces infectadas, existiendo la misma sintomatología asociada a árboles enfermos, recuperándose posteriormente el patógeno inoculado.

6. RESUMEN

Se seleccionaron árboles de la especie Persea americana Mill, variedad Hass sobre patrón mexícola, ubicados en la Estación Experimental La Palma, Quillota, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso.

La elección de las unidades experimentales se hizo en base al grado de ataque o grado de desarrollo de la enfermedad denominada "tristeza" del palto, causada por Phytophthora cinnamomi, diferenciando tres grados, aparentemente sano, medianamente afectado y severamente afectado.

El ensayo se dividió en seis bloques, constituyéndose cada uno de tres árboles elegidos al azar por cada grado de ataque. A futuro se aplicará a estos árboles cargas de agua reducidas en 15% y 35%, con el fin de determinar qué efecto tiene en la recuperación de la planta.

Se tomaron muestras de raíces en los cuatro puntos cardinales de cada palto, para corroborar la presencia del patógeno, presumiblemente Phytophthora cinnamomi.

Se desarrolló una metodología de aislamiento para recuperar el patógeno, que consistió en el uso del medio

de cultivo selectivo P10VP, repicando posteriormente en medio de cultivo Agar Agua y luego en Agar Papa Dextrosa. Esta metodología permitió aislar exitosamente el patógeno.

Las características morfológicas y el crecimiento patrón tipo camelia o roseta, que presentan las colonias de los aislamientos, en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa, permiten presumir que pertenecen al género Phytophthora.

Los aislamientos fueron sometidos a distintos tratamientos de inducción de la esporulación. Se desarrolló una metodología de identificación, utilizando una solución de incubación a base de arvejas (tratamiento N°6), que permitió identificar los aislamientos C16 y C34, como Phytophthora cinnainoini.

Además, se evaluó la patogenicidad de las cepas aisladas, inoculando el sustrato de las plantas. Transcurridos tres meses fueron evaluadas, pudiéndose asociar la sintomatología observada a la presentada por los paltos atacados.

6. LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. 1978. Plant pathology. 2nd.ed. New York, Acad : Press. 703p.
- ALEXOPOULOS, C. and MIMS, C. 1979. Introductory Micology. 3rd.e i. New York, John Wiley. 632p.
- ARAGARI, M. and HIÑE, R. 1963. Effect of radiation on sporangial production of *Phytophthora parasitica* on artificial media and detached papaya fruit. *Phytopathology* 53:854-856.
- AYERS, W. and ZENTMYER, G. 1971. Effect of soil solution and two soil pseudomonads on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 61:1188-1193 .
- BARTOLOTTI, S. 1989. Pudriciones radiculares en kiwi, frambuesa y esparrago: Etiologia y efecto de fosetil- Al y metalaxilo. Tesis Ing. Agr. Santiago, Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. 43p.
- BEKEY, R. 1987. California avocado disease. *California Grower* 11:18-21.
- BIELENIN, A. and JONES, A. 1988a. Efficacy of sprays of fosetyl- Al and drenches of metalaxyl for the control of *Phytophthora* and crown rot of cherry. *Plant Disease* 72:477-480.
- _____ . and _____ . 1988b. Prevalence and pathogenicity of *Phytophthora* spp. from sour cherry trees in Michigan. *Plant Disease* 72:473-476.
- CAMPBELL, W. 1949. A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil. *Plant Disease* 33:134-135.
- CANCINO, E. 1966. Estudio de algunas especies de *Phytophthora* en árboles frutales. Tes. Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Agronomía. 75p.

- CHEN, D. and ZENTMYER, G. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 62:397-402.
- COFFEY, M. 1987. *Phytophthora* root rot of avocado. *Plant Disease* 71 (11) : 1046 -1052.
- _____. 1991. Cause and diagnosis of avocado root rot. *Avocado Grower* 15(3):17-22.
- _____. 1991a. Managing avocado root rot. *California Grower* 15 (4) :15-16 .
- CRANDALL, B. 1948. *Phytophthora cinnamomi* root rot of avocado under tropical conditions. *California Avocado Society. Yearbook.* pp. 76-81.
- CURTIS, D. and ZENTMYER, G. 1949. Effect of oxygen supply on *Phytophthora* root rot of avocado in nutrient solution. *Am. J. Bot.* 36:471-474.
- DOMSCH, K., GAMS, W. and TRUATE-HEIDI, A. 1980. *Compendium of soil fungi.* London, Academic Press. 859p (V.1.)
- DONAWAY, J. 1975. Limiting influence of low water potential on the formation of sporangia by *Phytophthora drechsleri* in soil. *Phytopathology* 65:1089-1093
- _____. 1983. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. In: D. C. Erwin, S. Barnicki-Garcia, and P. H. TSAO, eds. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology.* U.S.A., Minnesota, The American Phytopathological Society. pp. 175-187.
- ETCHEVERRY, E. 1991. Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Phytophthora* en plantas de chirimoyo. Tesis Ing. Agr. Quillota. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 72p.
- ECKERT, J. and TSAO, P. 1962. A selective antibiotic medium for isolation of *Phytophthora* and *Pythium* from plant roots. *Phytopathology* 52:771-777.
- ENGLANDER, L. and ROTH, L. 1980. Interaction of light and sterol on sporangium and clamydospore production by *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology* 70:650-654 .

- FALLON, P. and GROGAN, R. 1988. Isolation, distribution, pathogenicity and identification of *Phytophthora* spp. on asparagus in California. *Plant Disease* 72 :495-497 .
- GARDIAZABAL, F. y ROSENBERG, G. 1991. Cultivo del palto. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 201p.
- GISI, O. 1983. Biophysical aspects of the development of *phytophthora*. In: D. C. Erwin, S. Barnicki-García, and P. H. Tsao, eds. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. U.S.A., Georgia, The American Phytopathology Society. pp. 109-119 .
- GOODING, G and LUCAS, G. 1958. Factors influencing sporangial formation and zoospore activity in *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* 49:277-281 .
- HAAS, J. 1964. Isolation of *Phytophthora megasperma* var. *soiae* in soil dilution plates (Abstr.). *Phytopathology* 54:894.
- JEFFERS, S. and ALDWINCKLE, H. 1988. Enhancing detection of *Phytophthora cactorum* in naturally infested soil. *Phytopathology* 77:1475-1482.
- _____. and MARTIN, S. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pvthium* species. *Plant Disease* 70 (11) : 1038-1043.
- LATORRE, B. 1988a. Enfermedades de las plantas cultivadas. 2a.ed. Santiago, Universidad Católica de Chile. 307p.
- _____. 1988b. Problemas atribuidos a *Phytophthora* en uva de mesa. *Aconex* 22:15-17.
- _____. 1988c. Problemas fitopatólogicos del Kiwi Chile *Agro Export* (1):24-25.
- 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.

- MAC DONALD, J. and DUNIWAY, J. 1978. Influence of the matric and osmotic components of water potential on zoospore discharge in *Phytophthora*. *Phytopathology* 68:751-757 .
- MASAGO, H., YOSHIKAWA, M., FUKADA, M and NAKANISHI, N. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytopathology* 67:425-428.
- MATHERON, M. and MATEJKA, J. 1988. In vitro activity of sodium tetrathiocarbonate on sporulation and growth of six *Phytophthora* sp. *Phytopathology* 78:1234-1237 .
- MIRCETICH, S. and ZENTMYER, G. 1967. Existence of *Phytophthora cinnamomi* as clamydospores and oospores in roots and soil. *Calif. Avocado Soc. Yearb.* 51:117-124.
- _____, _____ . and KENDRICK, J. 1968. Physiology of germination of clamydospores of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 58:666-671.
- _____ • and MATHERON, M. 1976. *Phytophthora* root rot crown rot of cherry trees. *Phytopathology* 66:549-558.
- MITCHELL, D. and ZENTMYER, G. 1971. Effects of oxygen and carbon dioxide tension on sporangium and oospore formation by *Phytophthora* species. *Phytopathology* 61:807-812.
- MORALES, A. 1985. Principales enfermedades bióticas y abióticas en limoneros. *Revista Frutícola* 6(2) :55-59 .
- _____ . y MORENO, P. 1986. Kiwi: pudriciones radiculares. *Aconex* (12):13-16.
- NEWHOOK, F. , WATERHOUSE, M and STAMPS, J. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers* 143. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- OCANA, G. and TSAO, P. 1966. A selective agar medium for the direct isolation and enumeration of *Phytophthora* in soil (Abstr.). *Phytopathology* 56:893.

- PINTO,A. y ENGLISH,H. 1972. Principales enfermedades de los frutales de hoja caduca en Chile. Santiago, INIA. 73p.
- _____. y CARRENO,I. 1985. Decaimiento del palto causado por *Phytophthora cinnamomi*. IPA, La Platina 31:30-32.
- _____. y _____. 1986. Recuperación de paltos enfermos con pudrición de raicillas, con pulverizaciones foliares. Agr. Técnica 46 (3) : 357-360.
- RIBEIRO,O. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. Cramer, Vaduz, Liechtenstein. 417p.
- ROTH,L. 1963. . *Phytophthora cinnamomi* root rot of Douglas-fir. *Phytopathology* 53:1128-1131.
- SAFIAN,C. 1990. Cuantificación de poblaciones de *Pythium* y *Phytophthora*. Tesis Ing. Agr. Santiago, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. 46p.
- SAVAGE,E., CLAYTON,C. , HUNTER,H. , BRENNEMAN,J. , LAVIOLA,C. and GALLEGLY,M. 1968. Homothallism, heterothallism and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*. *Phytopathology* 58:1004-1021.
- SOLEL,Z. y PINKAS,Y. 1984. A modified selective medium for detecting *Phytophthora cinnamomi* on avocado roots. *Phytopathology* 84:506-508.
- STERNE,R., KAUFMANN,M. and ZENTMYER,G. 1978. Effects of *Phytophthora* root rot a water relations of avocado: interpretation with water transport model. *Phytopathology* 68:595-602.
- THORN,W. and ZENTMYER,G. 1952. Host of *Phytophthora cinnamomi* Rand., the causal organism of avocado root rot. California Assoc. Yearbook. pp. 196-200.
- TSAO,P. and GUY,S. 1977. Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora* isolation medium containing hymexazol. *Phytopathology* 67:796-801.

- _____. 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathology* 8:157-186 .
- _____. 1983. Factors affecting isolation and quantitation of *Phytophthora* from soil. In: C. D. Erwin, S. Barnicki-Garcia, and P. H. Tsao, eds, *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. U.S.A., Minnesota, The American Phytopathological Society. pp. 219-235.
- TUCKER, C. 1931. Taxonomy of genus *Phytophthora* De Bary. *Research Bull. Mo. Agric. Exp. Sta.* 153p.
- VAARTAJA, R. 1960. Selectivity of fungicidal materials in agar cultures. *Phytopathology* 50:870-873.
- VERGARA, C. 1957. Decaimiento o tristeza del palto. *Si-miente* 27 (1-4) :53-55.
- WATERHOUSE, M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* De Bary. *Mycological Papers, CMI*, 92: 1-22.
- _____. and WATERSTON, J. 1966. *Phytophthora cinnamomi*. *Commonw. Mycol. Inst. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria*. N°113.2p.
- WESTE, G. 1983. Population dynamic and survival of *Phytophthora*. In: D. C. Erwin, S. Barnicki-Garcia, and P. H. Tsao, eds. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. U.S.A., Minnesota, The American Phytopathological Society, pp. 237-257.
- WHITE, B. 1989. Root of the matter. *California Grower* 13(3):6-8.
- ZENTMYER, G. and MARSHALL, L. 1959. Factors affecting sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. (Abstr.). *Phytopathology* 49:556.
- _____. , GILPATRICK, J. and THORN, W. 1960. Methods of isolating from soil and from host tissue (Abstr). *Phytopathology* 50 : 87.
- _____. 1960. Chemotaxis of zoospores for roots exudates in relation to infection by *Phytophthora cinnamomi*. (Abstr.). *Phytopathology* 50:660

- _____. 1961. Chemotaxis of zoospores for roots exudates. *Science* 133:1595-1596.
- _____. 1966. Role of amino acids in chemotaxis of zoospores of three species of *Phytophthora*. (Abstr). *Phytopathology* 56:907.
- _____. and MIRCETICH, S. 1966. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 56:710-712.
- _____. and RIBEIRO, O. 1977. The effect of visible and near-visible radiation on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 67: 91-95.
- _____. and OHR, H. 1978. Avocado root rot. Univ. Calif. Div. Agric. Sci. 15p. (Leaflet 2440)
- _____. 1980. *P. cinnamomi* and the disease it causes. U.S.A., Minnesota, The American Phytopathological Society. 96 p. (Mongr. 10.)
- _____. 1983. The world of *Phytophthora*. In: D. C. Erwin, S. Barnicki-Garcia, and P. H. Tsao, eds. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. U.S.A., Minnesota, The American Phytopathological Society, pp. 1-7.

A N E X O S

ANEXO 1

Sintomatología de los paltos del ensayo asociado a la enfermedad causada por Phytophthora sp.

N° del árbol	N° del bloque	Grado .afección.	Sintomatología visual aérea . Vigor . Brotación . Clorosis . Carga .
2	1	M	. medio .moderada .moderada . baja .
4	1	S	. alto .abundante .ausente . alta .
5	1	E	. bajo .escasa .severa . baja .
6	1	M	. medio .moderada .moderada . baja .
7	1	M	. medio .moderada .moderada . baja .
8	1	S	. alto .abundante .ausente . alta .
9	1	E	. bajo .escasa .severa . baja .
10	1	S	. alto .abundante .ausente . alta .
12	1	E	. bajo .escasa .severa . baja .
13	2	E	. bajo .escasa .severa . baja .
14	2	E	. bajo .escasa .severa . baja .
15	2	S	. alto .abundante .ausente . alta .
16	3	E	. bajo .escasa .severa . baja .
17	2	M	. medio .moderada .moderada . baja .
18	2	E	. bajo .escasa .severa . baja .
19	2	S	. alto .abundante .ausente . alta .
20	2	M	. medio .moderada .moderada . baja .
21	2	S	. alto .abundante .ausente . alta .
22	2	M	. medio .moderada .moderada . baja .
23	3	E	. bajo .escasa .severa . baja .
24	3	M	. medio .moderada .moderada . baja .
25	3	M	. medio .moderada .moderada . baja .
26	3	M	. medio .moderada .moderada . baja .
28	3	E	. bajo .escasa .severa . baja .
29	3	S	. alto .abundante .ausente . alta .
30	3	S	. alto .abundante .ausente . alta .
31	3	S	. alto .abundante .ausente . alta .
32	4	M	. medio .moderada .moderada . baja .
33	4	M	. medio .moderada .moderada . baja .
34	4	E	. bajo .escasa .severa . baja .
35	4	E	. bajo .escasa .severa . baja .

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 1(cont)

Sintomatología de los paltos del ensayo asociado a la enfermedad causada por ghytophthora sp.

N° del árbol	N° del bloque	Grado .afección.	Sintomatología visual aérea	Vigor	Brotación	Clorosis	Carga
36	4	S	alto	abundante	ausente	alta	
37	4	S	alto	abundante	ausente	alta	
38	4	E	bajo	escasa	severa	baja	
39	4	S	alto	abundante	ausente	alta	
40	4	M	medio	moderada	moderada	baja	
41	5	E	bajo	escasa	severa	baja	
42	5	M	medio	moderada	moderada	baja	
43	5	E	bajo	escasa	severa	baja	
44	5	S	alto	abundante	ausente	alta	
45	5	S	alto	abundante	ausente	alta	
46	5	M	medio	moderada	moderada	baja	
47	5	E	bajo	escasa	severa	baja	
48	5	M	medio	moderada	moderada	baja	
49	5	S	alto	abundante	ausente	alta	
50	6	S	alto	abundante	ausente	alta	
51	6	M	medio	moderada	moderada	baja	
52	6	E	bajo	escasa	severa	baja	
53	6	E	bajo	escasa	severa	baja	
54	6	E	bajo	escasa	severa	baja	
55	6	M	medio	moderada	moderada	baja	
56	6	S	alto	abundante	ausente	alta	
57	6	M	medio	moderada	moderada	baja	
58	6	S	alto	abundante	ausente	alta	

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 2

Sintomatología del sistema radicular de los paltos que componen la muestra, asociado a la enfermedad causada por Phytophthora sp.

N° del árbol.	Nivel.	Muestra.	Cubrimiento de las raíces	Estado Sanitario de las raíces
2	M	.Norte	. Moderado a abundante	. Moderadamente afectadas
		.Sur,	. Moderado	. Moderadamente afectadas
		.Este, y .Oeste	.	.
4	S	.Norte,	. Abundante	. Sanas
		.Sur,	.	.
		.Este y .Oeste	.	.
		.	.	.
5	E	.Norte,	. Muy bajo	. Severamente afectadas
		.Sur y .Oeste	.	.
		.Este	. Bajo	. Severamente afectadas
		.	.	.
6	M	.Norte y .Sur	. Moderado	. Moderadamente afectadas a sanas
		.Este	. Abundante	. Moderadamente afectadas a sanas
		.Oeste	. Moderado a abundante	. Moderadamente afectadas a sanas
		.	.	.
		.	.	.
		.	.	.
7	M	.Norte,	. Moderado a abundante	. Moderadamente afectadas
		.Este y .Oeste	.	.
		.Sur	. Moderado	. Moderadamente afectadas
		.	.	.

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 2(cont.)

Nº del árbol . Nivel . Muestra . Cubrimiento de las raíces . Estado Sanitario de las raíces

8	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	Abundante	. Sanas
9	E	.Norte, .Sur, .Este, y .Oeste	Escaso	. Totalmente . desintegradas
10	S	.Norte, .Sur, .Este, y .Oeste	Abundante	. Sanas
12	E	.Norte, .Sur, .Este, y .Oeste	Escaso	. Totalmente . desintegradas
13	E	.Norte, .Sur, .Este, y .Oeste	Escaso	. Totalmente . desintegradas
14	E	.Norte, .Sur, .Este, y .Oeste	Escaso	. Totalmente . desintegradas
15	S	.Norte, .Sur, .Este, y .Oeste	Abundante	. Sanas

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 2(cont.)

Nº del árbol.	Nivel.	Muestra.	Cubrimiento de las raíces	Estado Sanitario de las raíces
16	E	.Norte	. Moderado	. Moderadamente afectadas
		.Sur y .Este	. Bajo	. Moderadamente a muy afectadas
		.Oeste	. Moderado	. Moderadamente a muy afectadas
17	M	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Moderado a bajo	. Moderadamente a severamente afectadas
18	E	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Bajo	. Severamente afectadas
19	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Abundante	. Sanas
20	M	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Moderado	. Moderadamente afectadas
21	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Abundante	. Sanas
22	M	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Moderado	. Moderadamente afectado

S:sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 2 (cont.)

Nº del árbol.	Nivel.	Muestra.	Cubrimiento de las raíces	Estado Sanitario de las raíces
23	E	.Norte	Moderado a bajo	Moderadamente a severamente afectadas
		.Sur y .Este .Oeste	Moderado	Moderadamente a severamente afectadas
24	M	.Norte, .Sur, y .Este	Moderado	Moderadamente a afectadas
		.Oeste	Abundante a moderado	Moderadamente afectadas
25	M	.Norte y .Oeste	Moderado	Moderadamente afectadas
		.Sur y .Este	Moderado a bajo	Moderadamente afectadas
26	M	.Norte y .Oeste	Abundante a moderado	Moderadamente afectadas a sanas
		.Sur y .Este	Moderado	Moderadamente afectadas
28	E	.Norte, .Sur y .Oeste	Bajo	Severamente afectadas
		.Este	Moderado a bajo	Moderadamente a severamente afectados
29	S	.Norte,	Abundante	Sanas
		.Sur,		
		.Este y		
		.Oeste		

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 2 (cont.)

Nº del árbol.	Nivel.	Muestra.	Cubrimiento de las raíces	Estado Sanitario de las raíces
30	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Abundante	. Sanas
31	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Abundante	. Sanas
32	M	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Bajo	. Moderadamente a . severamente . afectadas
33	M	.Norte, .Este y .Oeste	. Bajo	. Moderadamente . afectadas
		.Sur	. Bajo	. Moderadamente a . severamente . afectadas
34	E	.Norte, .Este y .Oeste	. Bajo	. Moderadamente a . severamente . afectadas
		.Sur	. Escaso	. Totalmente . desintegradas
35	E	.Norte y .Este	. Bajo	. Moderadamente a . severamente . afectadas
		.Sur y .Oeste	. Bajo	. Severamente . afectadas
36	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Abundante	. Sanas

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 2 (cont.)

N° del árbol.	Nivel.	Muestra.	Cubrimiento de las raíces	Estado Sanitario de las raíces
37	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	Abundante	Sanas
38	E	.Norte y .Sur Este y .Oeste	Escaso Bajo	Totalmente desintegradas Severamente afectadas
39	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	Abundante	Sanas
40	M	.Norte y .Sur Este y .Oeste	Moderado Moderado	Moderadamente a severamente afectadas Moderadamente afectadas
41	E	.Norte, .Sur, .Este, y .Oeste	Escaso	Totalmente desintegradas
42	M	.Norte, .Este y .Oeste .Sur	Moderado Bajo	Moderadamente afectadas Moderadamente afectadas
43	E	.Norte, .Sur, .Este, y .Oeste	Escaso	Totalmente desintegradas

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 2 (cont.)

Nº del árbol.	Nivel.	Muestra.	Cubrimiento de las raíces	Estado Sanitario de las raíces
44	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Abundante	. Sanas
45	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Abundante	. Sanas
46	M	.Norte y .Sur	. Bajo	. Severamente afectadas
		.Este y .Oeste	. Bajo	. Moderadamente afectadas
47	E	.Norte, .Sur y .Este	. Bajo	. Moderadamente a severamente afectadas
		.Oeste	. Moderado a bajo	. Moderadamente afectadas
48	M	.Norte	. Bajo	. Moderadamente afectadas
		.Sur, .Este y .Oeste	. Bajo	. Moderadamente a severamente afectadas
49	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Abundante	. Sanas
50	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	. Abundante	. Sanas

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 2 (cont.)

Nº del árbol.	Nivel.	Muestra.	Cubrimiento de las raíces	Estado Sanitario de las raíces
51	M	.Norte y .Este	Abundante a moderado	Moderadamente afectadas
		.Sur y .Oeste	Moderado	Moderadamente afectadas
52	M	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	Bajo	Severamente afectadas
53	M	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	Bajo	Severamente afectadas
54	E	.Norte y .Sur	Bajo	Moderadamente afectadas
		.Este y .Oeste	Moderado	Moderadamente afectadas
55	M	.Norte, .Este y .Oeste	Moderado	Moderadamente afectadas
		.Sur .Oeste	Moderado a bajo	Moderadamente afectadas
56	S	.Norte, .Sur, .Este y .Oeste	Abundante	Sanas
57	M	.Norte y .Sur	Bajo	Moderadamente afectadas
		.Este y .Oeste	Moderado	Moderadamente afectadas

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 2 (cont.)

Nº del árbol.	Nivel.	Muestra.	Cubrimiento de las raíces	Estado Sanitario de las raíces
---------------	--------	----------	---------------------------	--------------------------------

58	S	.Norte,	. Abundante	. Sanas
		.Sur,	.	.
		.Este y	.	.
		.Oeste	.	.

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 3

Porcentaje de recuperación de *Phytophthora* sp. desde las raíces.

N° del árbol	.N° del .bloque	. Grado .afección.	% de Recuperación			
			NORTE	SUR	ESTE	OESTE
2	1	M	55 %	50 %	78 %	58 %
4	1	S	50 %	43 %	50 %	44 %
5	1	E	50 %	67 %	42 %	58 %
6	1	M	60 %	44 %	56 %	56 %
7	1	M	42 %	45 %	60 %	55 %
8	1	S	30 %	36 %	27 %	33 %
9	1	E	55 %	60 %	42 %	70 %
10	1	S	40 %	36 %	40 %	25 %
12	1	E	67 %	63 %	100 %	70 %
13	2	E	78 %	45 %	70 %	50 %
14	2	E	44 %	90 %	82 %	67 %
15	2	S	33 %	42 %	33 %	38 %
16	3	E	67 %	58 %	25 %	57 %
17	2	M	80 %	42 %	67 %	30 %
18	2	E	54 %	50 %	89 %	33 %
19	2	S	45 %	38 %	40 %	25 %
20	2	M	70 %	50 %	58 %	67 %
21	2	S	60 %	40 %	60 %	80 %
22	2	M	25 %	33 %	33 %	50 %
23	3	E	67 %	67 %	56 %	69 %
24	3	M	69 %	62 %	67 %	56 %
25	3	M	53 %	50 %	43 %	38 %
26	3	M	64 %	42 %	33 %	33 %
28	3	E	70 %	92 %	54 %	50 %
29	3	S	27 %	36 %	29 %	29 %
30	3	S	46 %	36 %	27 %	33 %
31	3	S	25 %	55 %	46 %	45 %
32	4	M	25 %	25 %	45 %	33 %
33	4	M	25 %	50 %	17 %	33 %
34	4	E	17 %	50 %	38 %	38 %
35	4	E	92 %	80 %	58 %	53 %
36	4	S	32 %	45 %	33 %	39 %
37	4	S	40 %	37 %	39 %	27 %
38	4	E	83 %	90 %	100 %	77 %

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado

ANEXO 3 (cont.)

Porcentaje de recuperación de Phyttophthora sp. desde las raíces.

N° del árbol	.N° del .bloque	. Grado .afección.	% de Recuperación			
			. NORTE	. SUR	. ESTE	. OESTE
39	. 4	. S	. 35 %	. 38 %	. 41 %	. 39 %
40	. 4	. M	. 63 %	. 64 %	. 72 %	. 50 %
41	. 5	. E	. 100 %	. 89 %	. 100 %	. 78 %
42	. 5	. M	. 50 %	. 60 %	. 50 %	. 53 %
43	. 5	. E	. 67 %	. 80 %	. 78 %	. 73 %
44	. 5	. S	. 50 %	. 33 %	. 41 %	. 54 %
45	. 5	. S	. 37 %	. 29 %	. 32 %	. 30 %
46	. 5	. M	. 56 %	. 63 %	. 46 %	. 67 %
47	. 5	. E	. 64 %	. 83 %	. 64 %	. 73 %
48	. 5	. M	. 50 %	. 64 %	. 67 %	. 53 %
49	. 5	. S	. 28 %	. 35 %	. 27 %	. 29 %
50	. 6	. S	. 25 %	. 30 %	. 32 %	. 33 %
51	. 6	. M	. 59 %	. 67 %	. 64 %	. 79 %
52	. 6	. E	. 61 %	. 67 %	. 69 %	. 77 %
53	. 6	. E	. 81 %	. 65 %	. 65 %	. 78 %
54	. 6	. E	. 79 %	. 80 %	. 76 %	. 73 %
55	. 6	. M	. 76 %	. 70 %	. 72 %	. 71 %
56	. 6	. S	. 28 %	. 34 %	. 27 %	. 24 %
57	. 6	. M	. 56 %	. 65 %	. 57 %	. 58 %
58	. 6	. S	. 45 %	. 40 %	. 30 %	. 37 %

S: sano M: medianamente afectado E: severamente afectado