

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS**



**“INOCULACIÓN DE *Persea americana* CON RIZOBACTERIAS DE  
LOS GÉNEROS *Pseudomonas* Y *Bacillus* ANTAGONISTAS DE  
*Phytophthora cinnamomi* Y *Lasiodiplodia theobromae*”**

**Presentada por:**

**RICHARD ANDI SOLÓRZANO ACOSTA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR  
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIAS E INGENIERÍA  
BIOLÓGICAS**

**Lima - Perú**

**2023**

## Document Information

---

<b>Analyzed document</b>	Informe de tesis palto Richard Solórzano 17.04.2023 (1).pdf (D164747153)
<b>Submitted</b>	4/22/2023 2:24:00 PM
<b>Submitted by</b>	Doris Zúñiga
<b>Submitter email</b>	dzuniga@lamolina.edu.pe
<b>Similarity</b>	2%
<b>Analysis address</b>	dzuniga.unalm@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

---

<b>SI</b>	<b>M3.627_20202_Desarrolla tu proyecto: de la idea a los resultados_15163833.txt</b>	1
	Document M3.627_20202_Desarrolla tu proyecto: de la idea a los resultados_15163833.txt (D107268764)	
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-33802020000100411&amp;script=sci_arttext&amp;lng=es">https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-33802020000100411&amp;script=sci_arttext&amp;lng=es</a>	4
	Fetches: 9/6/2022 11:25:29 AM	
<b>SI</b>	<b>Dacia Gallegos . Prueba de la unidad 3-4.pdf</b>	1
	Document Dacia Gallegos . Prueba de la unidad 3-4.pdf (D126313735)	
<b>W</b>	URL: <a href="https://worldwidescience.org/topicpages/l/las+micorrizas+arbusculares.html">https://worldwidescience.org/topicpages/l/las+micorrizas+arbusculares.html</a>	1
	Fetches: 11/6/2019 6:56:43 PM	
<b>W</b>	URL: <a href="https://agraria.pe/noticias/en-peru-hay-51-mil-hectareas-destinadas-al-cultivo-de-palta--29046">https://agraria.pe/noticias/en-peru-hay-51-mil-hectareas-destinadas-al-cultivo-de-palta--29046</a>	1
	Fetches: 4/22/2023 2:24:00 PM	
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.researchgate.net/publication/256537346_Efecto_del_cloruro_de_sodio_NaCl_sobre_el_c...">https://www.researchgate.net/publication/256537346_Efecto_del_cloruro_de_sodio_NaCl_sobre_el_c...</a>	1
	Fetches: 11/22/2019 8:29:58 AM	
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5860777/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5860777/</a>	6
	Fetches: 6/13/2020 4:00:38 PM	
<b>W</b>	URL: <a href="https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/609">https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/609</a>	2
	Fetches: 4/22/2023 2:24:00 PM	
<b>SI</b>	<b>15. Pseudomonas fluorences FitoG3.docx</b>	1
	Document 15. Pseudomonas fluorences FitoG3.docx (D93657700)	

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS**

**“INOCULACIÓN DE *Persea americana* CON RIZOBACTERIAS DE  
LOS GÉNEROS *Pseudomonas* Y *Bacillus* ANTAGONISTAS DE  
*Phytophthora cinnamomi* Y *Lasiodiplodia theobromae*”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR**

***Doctoris Philosophiae***

**Presentada por:**

**RICHARD ANDI SOLÓRZANO ACOSTA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Dra. Rosa Espejo Joya  
**PRESIDENTE**

Dra. Doris Zúñiga Dávila  
**ASESORA**

Dra. Marcia Toro  
**CO-ASESORA**

Dr. Raúl Blas Sevillano  
**MIEMBRO**

Dr. Jorge Escobedo Álvarez  
**MIEMBRO**

Dra. Maribel Eugenia Parada Ibañez  
**MIEMBRO EXTERNO**

*La presente tesis se ha ejecutado en el marco de la ejecución del proyecto 177-2015-FONDECYT de Fortalecimiento de Programas de Doctorado en Universidades Peruanas.*

## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesora, la Dra. Doris Zúñiga Dávila por su orientación y sobre todo por su paciencia, no sólo en la revisión del presente trabajo de investigación sino en cada momento compartido, aprendí mucho.

A mi co-asesora, la Dra. Marcia Toro García por su paciencia y carisma para la revisión y orientación de los experimentos con micorrizas.

Un especial agradecimiento a CONCYTEC-FONDECYT por el otorgamiento de la beca completa para mis estudios de doctorado a través del proyecto No 177-2015-FONDECYT.

Al proyecto MAGNET en la línea de “Interacción Microorganismo-planta”. Financiamiento FONDECYT por la permitir la presencia de mi co-asesora, la Dra. Marcia Toro, y capacitación en el trabajo con micorrizas.

A la Universidad Agraria La Molina por acogerme en el desarrollo de mis estudios e impulsar la verdadera reforma agraria en Perú a través del conocimiento científico e innovación tecnológica.

Al laboratorio de Ecología microbiana y biotecnología por permitirme a través de sus instalaciones e infraestructura recorrer el camino de la investigación con microorganismos.

Al laboratorio agrícola BIASTER de Ica, en la persona de Noemí Varas, por la donación de cepas de patógenos empleados en algunas pruebas de antagonismo.

A la empresa Avo Hass Perú en la persona del Dr. Isaack Vázquez por su aprecio y la gentil donación de las semillas de palto y muestreo de suelo en sus fundos de los que provienen las cepas aquí descritas.

A mis eternos amigos Edwin, Celia y Berni, en especial a Daniela Landa, por su amistad y apoyo con los aislamientos de las cepas y orientación en la microbiología y apoyo en el cuidado de las plantas.

A Evan Solórzano, mi hijo y a la memoria de mis abuelas Nicasia y Dolores por la motivación.

Al Ing. Wilson Castañeda por su apoyo con la preparación de los inóculos de micorrizas y su buena predisposición hacia mi persona.

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1. Cultivo de <i>Persea americana</i> y portainjerto zutano .....	6
2.1.1. Importancia y sustentabilidad del cultivo del palto en el Perú.....	6
2.1.2. Tipos de portainjertos en palto .....	7
2.1.3. Portainjerto y variedad Zutano .....	8
2.2. Pudrición radicular en el palto por <i>P. cinnamomi</i> .....	9
2.2.1. Características del sistema radicular del palto.....	9
2.2.2. Género <i>Phytophthora</i> .....	9
2.2.3. El patógeno <i>P. cinnamomi</i> Rands.....	10
2.2.4. Taxonomía de <i>P. cinnamomi</i> .....	10
2.2.5. Descripción morfológica de <i>P. cinnamomi</i> .....	11
2.2.6. Estructuras de propagación, resistencia e infección de <i>P. cinnamomi</i> .....	11
2.2.7. Sintomatología de la infección de <i>P. cinnamomi</i> en palto .....	12
2.2.8. Interacciones ambientales con el hospedante y el patógeno .....	12
2.3. Muerte regresiva en el palto por <i>L. theobromae</i> .....	13
2.3.1. Taxonomía de <i>L. theobromae</i> .....	13
2.3.2. Incidencia de <i>L. theobromae</i> .....	14
2.3.3. Sintomatología de la muerte regresiva por <i>L. theobromae</i> en el palto .....	14
2.4. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y el cultivo del palto .....	15
2.4.1. Promoción del crecimiento vegetal por rizobacterias.....	15

2.4.2.	Efecto promotor del crecimiento vegetal del género <i>Pseudomonas</i> .....	16
2.4.4.	Promoción del crecimiento en palto por microorganismos .....	19
2.5.	Actividad antagónica de bacterias PGR sobre <i>P. cinnamomi</i> y <i>L. theobromae</i> .....	20
2.6.	Acción de las bacterias-micorrizas sobre la infección por <i>P. cinnamomi</i> .....	22
2.7.	Acción de las bacterias-micorrizas sobre el estrés salino .....	24
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1.	Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas al cultivo del palto .....	26
3.1.1.	Toma de muestras.....	26
3.1.2.	Recuento y aislamiento de rizobacterias del género <i>Pseudomonas</i> y <i>Bacillus</i> ...	28
3.1.3.	Conservación de las bacterias aisladas por congelación a – 80 °C.....	28
3.1.4.	Determinación de la actividad solubilizadora de fosfatos .....	29
3.1.5.	Determinación de la síntesis de sideróforos .....	29
3.1.6.	Identificación molecular de las rizobacterias por el gen 16S ADNr .....	30
3.1.7.	Análisis filogenético de las rizobacterias identificadas en la rizosfera de <i>P. americana</i> .....	30
3.1.8.	Actividad promotora de crecimiento vegetal de cepas aisladas de la rizosfera...30	
3.1.9.	Análisis estadístico .....	32
3.2.	Evaluación de la actividad antagónica de bacterias PGR aisladas de la rizosfera del palto sobre <i>P. cinnamomi</i> y <i>L. theobromae</i> .....	32
3.2.1.	Aislamiento de <i>Pseudomonas</i> y <i>Bacillus</i> .....	32
3.2.2.	Propagación de <i>P. cinnamomi</i> .....	33
3.2.3.	Propagación de <i>L. theobromae</i> .....	34
3.2.5.	Actividad antagónica <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas spp.</i> y <i>Bacillus spp.</i> sobre <i>L. theobromae</i> .....	35
3.2.7.	Análisis estadístico .....	36

3.3.	Evaluación del efecto de la co-inoculación bacteria-micorriza sobre el crecimiento de plantones de palto var. Zutano bajo condiciones de infección con <i>P. cinnamomi</i> .....	36
3.3.1.	Ensayo de co-inoculación bacteria/micorriza.....	36
3.3.2.	Inoculación de micorrizas.....	37
3.3.3.	Propagación e inoculación de <i>P. cinnamomi</i> .....	37
3.3.4.	Análisis estadístico .....	37
3.4.	Evaluación del efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento de <i>P. americana</i> var. Zutano bajo condiciones de estrés salino	39
3.4.1.	Selección de bacterias PGP resistentes a altas concentraciones osmóticas.....	39
3.4.2.	Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la resistencia al estrés salino en <i>P. americana</i> var. Zutano .....	39
3.5.	Evaluación del efecto de la inoculación de micorrizas arbusculares sobre el crecimiento de <i>P. americana</i> var. Zutano bajo condiciones de estrés salino .....	40
3.5.1.	Selección de micorrizas arbusculares .....	40
3.5.2.	Efecto de la inoculación con micorrizas arbusculares sobre la resistencia al estrés salino en <i>P. americana</i> var. Zutano.....	41
3.5.3.	Análisis estadístico .....	41
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	42
4.1.	Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas al cultivo del palto .....	42
4.1.1.	Recuento de <i>Pseudomonas</i> y <i>Bacillus</i> .....	42
4.1.2.	Aislamiento de <i>Pseudomonas</i> y <i>Bacillus</i> .....	42
4.1.3.	Conservación de las bacterias aisladas por congelación a – 80 °C.....	43
4.1.4.	Identificación molecular de bacterias de los géneros <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i> asociadas a la rizósfera de palto .....	43



4.1.5.	Actividades promotoras del crecimiento vegetal <i>in vitro</i> de bacterias rizosféricas de <i>P. americana</i> var. Zutano .....	48
4.2.	Evaluación de la actividad antagonica de bacterias PGR aisladas de la rizosfera del palto sobre <i>P. cinnamomi</i> y <i>L. theobromae</i> .....	57
4.2.1.	Actividad antagonica <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas spp.</i> y <i>Bacillus spp.</i> sobre <i>P. cinnamomi</i> .....	57
4.2.2.	Actividad antagonica <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas spp.</i> y <i>Bacillus spp.</i> sobre <i>L. theobromae</i> .....	61
4.2.3.	Actividad antagonica <i>in vivo</i> de <i>B. subtilis</i> sobre <i>P. cinnamomi</i> a nivel de invernadero.....	65
4.3.	Evaluación del efecto de la co-inoculación bacteria-micorriza sobre el crecimiento de plántones de palto var. Zutano bajo condiciones de infección con <i>P. cinnamomi</i> .....	72
4.3.1.	Efecto de la co-inoculación bacteria-micorrizas en parámetros de crecimiento de plántones de <i>P. americana</i> var. Zutano infectadas con <i>P. cinnamomi</i> .....	74
4.3.2.	Acumulación de macronutrientes en plántones co-inoculados con bacterias y micorrizas .....	86
4.4.	Evaluación del efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento de <i>P. americana</i> var. Zutano bajo condiciones de estrés salino	92
4.4.1.	Efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre el crecimiento bacteriano de bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal aisladas del palto. ....	92
4.4.2.	Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la resistencia al estrés salino en <i>P. americana</i> var. Zutano .....	94
4.4.3.	Acumulación de iones en hojas de palto .....	101
4.4.4.	Acumulación de iones en raíces de palto .....	103
4.5.	Evaluación del efecto de la inoculación de micorrizas arbusculares sobre el crecimiento de <i>P. americana</i> var. Zutano bajo condiciones de estrés salino .....	105

4.5.1. Efecto de la inoculación con micorrizas arbusculares sobre la resistencia al estrés salino en <i>P. americana</i> var. Zutano.....	106
4.5.2. Acumulación de iones en hojas de palto .....	111
4.5.3. Acumulación de iones en raíces de palto .....	112
V. CONCLUSIONES .....	115
5.1. Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas al cultivo del palto .....	115
5.2. Evaluación de la actividad antagonica de bacterias PGR aisladas de la rizosfera del palto sobre <i>P. cinnamomi</i> y <i>L. theobromae</i> .....	116
5.3. Evaluación del efecto de la co-inoculación bacteria-micorriza sobre el crecimiento de plantones de palto var. Zutano bajo condiciones de infección con <i>P. cinnamomi</i> .....	116
5.4. Evaluación del efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento de <i>P. americana</i> var. Zutano bajo condiciones de estrés salino	117
5.5. Evaluación del efecto de la inoculación de micorrizas arbusculares sobre el crecimiento de <i>Persea americana</i> var. Zutano bajo condiciones de estrés salino.....	117
VI. RECOMENDACIONES .....	118
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	120
VIII. ANEXOS.....	137

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recuento de bacterias aisladas de la rizosfera de palto .....	42
Tabla 2. Identificación molecular de rizobacterias aisladas de <i>Persea americana</i> .....	44
Tabla 3. Comparación de la eficiencia solubilizadora de fosfato tricálcico .....	48
Tabla 4. Rizobacterias de <i>P. americana</i> seleccionadas por su actividad antagónica .....	51
Tabla 5. Características agronómicas evaluadas en plántulas de <i>P. americana</i> var. Zutano tratadas con rizobacterias.....	54
Tabla 6. Análisis de macronutrientes en plántulas de <i>P. americana</i> var. Zutano tratadas con rizobacterias.....	56
Tabla 7. Porcentaje de inhibición de <i>P. cinnamomi</i> por bacterias aisladas de la rizosfera de palto .....	58
Tabla 8. Parámetros de crecimiento evaluados en plantones de palto en respuesta a la infección por <i>P. cinnamomi</i> .....	66
Tabla 9. Escala de severidad de la enfermedad por <i>P. cinnamomi</i> en palto evaluado en condiciones de invernadero .....	67
Tabla 10. Tratamientos según la combinación de los niveles de los factores micorrizas y bacterias ensayadas.....	72
Tabla 11. Análisis multivariante factorial del efecto de la co-inoculación bacteria-micorrizas en parámetros de crecimiento de plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano infectadas con <i>P. cinnamomi</i> .....	76
Tabla 12. Efectos principales de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la resistencia a <i>P. cinnamomi</i> en plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano.....	78

Tabla 13. Efecto de la co-inoculación bacteria-micorrizas en parámetros de crecimiento de plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano infectadas con <i>P. cinnamomi</i> .....	79
Tabla 14. Severidad de la enfermedad por <i>Phytophthora cinnamomi</i> en palto por tratamientos .....	82
Tabla 15. Efectos principales de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la absorción de macronutrientes en plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano, infectados con <i>P. cinnamomi</i> .....	87
Tabla 16. Efecto de la co-inoculación bacteria-micorrizas sobre la absorción de macronutrientes en plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano, infectados con <i>P. cinnamomi</i> .....	88
Tabla 17. Efectos principales de las bacterias PGP en plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano en tres niveles de estrés salino.....	96
Tabla 18. Análisis multivariante unifactorial del efecto de la inoculación de bacterias PGP en parámetros de crecimiento de plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano inducidas a estrés por salinidad.....	97
Tabla 19. Análisis de varianza de parámetros de crecimiento de plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano inoculadas con bacterias PGP e inducidos a estrés por salinidad .....	98
Tabla 20. Efectos principales de las bacterias PGP en la acumulación de iones salinos en hojas de <i>P. americana</i> var. Zutano en tres niveles de estrés salino .....	101
Tabla 21. Acumulación de iones salinos en hojas de <i>P. americana</i> var. Zutano inoculadas con bacterias PGP e inducidos a estrés por salinidad.....	102
Tabla 22. Efectos principales de las bacterias PGP en la acumulación de iones salinos en raíces de <i>P. americana</i> var. Zutano en tres niveles de estrés salino .....	103
Tabla 23. Acumulación de iones salinos en raíces de plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano inoculadas con bacterias PGP e inducidos a estrés por salinidad.....	103
Tabla 24. Descripción de los tratamientos con micorrizas arbusculares y niveles de salinidad .....	105

Tabla 25. Efecto de la inoculación con micorrizas arbusculares sobre características agronómicas en plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano, inducidos a estrés salino.....	107
Tabla 26. Efectos principales de las micorrizas arbusculares en la acumulación de iones salinos en hojas de <i>P. americana</i> var. Zutano bajo estrés por salinidad .....	111
Tabla 27. Acumulación de iones salinos en hojas de plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano inoculadas con micorrizas arbusculares bajo estrés por salinidad.....	111
Tabla 28. Efectos principales de las micorrizas arbusculares en la acumulación de iones salinos en raíces de <i>P. americana</i> var. Zutano bajo estrés por salinidad .....	112
Tabla 29. Acumulación de iones salinos en raíces de plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano inoculadas con micorrizas arbusculares bajo estrés por salinidad.....	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muestreo de árboles de palto.....	27
Figura 2. Esporangios de <i>P. cinnamomi</i> PIB-03 .....	33
Figura 3. Conidias de <i>L. theobromae</i> LTB-05 .....	34
Figura 4. Inóculo de <i>P. cinnamomi</i> en agua mineral y pétalos de clavel .....	38
Figura 5. Colonias crecidas en medios selectivos para el aislamiento .....	43
Figura 6. Árbol filogenético construido según el Maximum Likelihood Method basado en la relación entre las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas de <i>Bacillus</i> aisladas de la rizosfera de la <i>P. americana</i> y especies relacionadas con <i>Bacillus</i> .....	45
Figura 7. Árbol filogenético construido según el Maximum Likelihood Method basado en la relación entre las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas de <i>Pseudomonas</i> aisladas de la rizosfera de la <i>Persea americana</i> y especies relacionadas con <i>Pseudomonas</i> .....	46
Figura 8. Halo de cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato aisladas de la rizosfera de <i>P. americana</i> var. Zutano .....	49
Figura 9. Viraje de color de azul a amarillo alrededor del crecimiento bacteriano para las cepas P10 y P12.....	50
Figura 10. Plántulas de <i>P. americana</i> var. Zutano inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	52
Figura 11. Plántulas de palto var. Zutano inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	53
Figura 12. Halos de inhibición de bacterias rizosféricas de palto sobre <i>P. cinnamomi</i> .....	59
Figura 13. <i>B. subtilis</i> enfrentado a <i>P. cinanommi</i> respecto al control .....	59
Figura 14. <i>B. subtilis</i> enfrentado a <i>P. cinanommi</i> .....	60
Figura 15. Halos de inhibición de bacterias rizosféricas de palto sobre <i>P. cinnamomi</i> .....	61

Figura 16. Bacterias rizosféricas de palto sobre <i>L. theobromae</i> sin efecto antagónico a los 3 días.....	62
Figura 17. Bacterias rizosféricas de palto sobre <i>L. theobromae</i> con efecto antagónico a los 3 días.....	63
Figura 18. <i>B. subtilis</i> aislado de la rizosfera de palto sobre <i>L. theobromae</i> con efecto antagónico a los 7 días.....	63
Figura 19. Efecto antagónico de <i>B. subtilis</i> sobre <i>P. cinnamomi</i> en plantones de palto .....	68
Figura. 20. Estructuras fúngicas en raíces teñidas con azul de tripan por tratamiento (1000X) .....	69
Figura 21. Raíces micorrizadas y esporas de micorrizas.....	80
Figura 22. Efecto de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la resistencia a <i>P. cinnamomi</i> en plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano .....	81
Figura 23. Efecto de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la raíz de plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano, infectados con <i>P. cinnamomi</i> .....	83
Figura 24. Efecto de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la altura de planta en plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano, infectados con <i>P. cinnamomi</i> .....	84
Figura 25. Efecto de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la longitud de raíz en plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano, infectados con <i>P. cinnamomi</i> .....	85
Figura 26. Efecto de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la longitud de raíz/biomasa seca de raíz de <i>P. americana</i> var. Zutano, infectados con <i>P. cinnamomi</i> .....	93
Fig. 27. Crecimiento de bacterias rizosféricas de palto en concentraciones crecientes de NaCl .....	99
Figura 28. Efecto de la inoculación de bacterias PGP en la biomasa seca radicular de plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano, inducidos a estrés por salinidad.....	100
Figura 29. Efecto de la inoculación de bacterias PGP en el crecimiento de plantones de <i>P. americana</i> var. Zutano, inducidos a estrés por salinidad .....	108

Figura 30. Efecto de la inoculación con micorrizas arbusculares en plántones de <i>P. americana</i> var. Zutano, inducidos a estrés salino.....	109
Figura 31. Efecto de la inoculación con micorrizas arbusculares sobre la acumulación de biomasa seca aérea en plántones de <i>P. americana</i> var. Zutano, inducidos a estrés salino.....	110
Figura 32. Acumulación de iones salinos en hojas de plántones de <i>P. americana</i> var. Zutano inoculadas con bacterias PGP e inducidos a estrés por salinidad.....	143
Figura 33. Acumulación de iones salinos en raíces de plántones de <i>P. americana</i> var. Zutano inoculadas con bacterias PGP e inducidos a estrés por salinidad.....	144
Figura 34. Acumulación de iones salinos en hojas de plántones de <i>P. americana</i> var. Zutano inoculadas con micorrizas arbusculares bajo estrés por salinidad.....	145
Figura 35. Acumulación de iones salinos en raíces de plántones de <i>P. americana</i> var. Zutano inoculadas con micorrizas arbusculares bajo estrés por salinidad.....	146



## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Informes de análisis de suelos y plantas .....	137
Anexo 2. Composición de medios de cultivo .....	139
Anexo 3. Figuras complementarias .....	143

## RESUMEN

La presente investigación se condujo bajo el objetivo de aislar, identificar y caracterizar bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. Se inocularon plántulas de palto de la variedad Zutano con 10 cepas seleccionadas de 26 aislamientos en las que *Bacillus subtilis* incrementa el número de hojas, peso fresco de hojas y raíz, peso seco de raíz, tallo y hojas, y área foliar. Se evaluó la actividad antagónica a nivel *in vitro* sobre *Phytophthora cinnamomi* donde las cepas Bac F (*B. subtilis*) y P3 (*P. putida*) generan un halo de inhibición de 45 por ciento y de 47 por ciento respectivamente; y sobre *Lasiodiplodia theobromae* la cepa Bac F obtuvo 33.33 por ciento. A nivel de invernadero Bac F redujo la severidad de los síntomas ocasionados por *P. cinnamomi* e incrementó significativamente la longitud y el peso seco de la raíz. Se evaluó la interacción entre micorrizas y las bacterias promotoras; frente a la presencia de *P. cinnamomi* y se encontró que las micorrizas mejoran los parámetros de crecimiento de las plantas como la longitud y contenido de humedad de la raíz a pesar de estar infectadas por *P. cinnamomi*; mientras que las bacterias PGP tuvieron un efecto en el incremento de la absorción de potasio, calcio y magnesio. También se evaluó la interacción entre micorrizas y las bacterias en condiciones de salinidad en las que las rizobacterias *P. plecoglossicida* y *B. subtilis* disminuyen la acumulación de los iones cloro y sodio; y disminuyen la pérdida de materia seca. Las micorrizas arbusculares incrementan la acumulación de los iones sodio, potasio y cloro; y disminuyen la acumulación del ion sodio en las hojas respecto al control, también incrementan el contenido de materia seca. Se concluye que la rizosfera de palto de la variedad Hass/Zutano está relacionada con los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Lysinibacillus*, y destaca la especie *B. subtilis* por su actividad promotora del crecimiento vegetal, mejora de la resistencia frente al estrés salino y se confirma el potencial de las rizobacterias antagonistas *B. subtilis* y *P. putida* para el control biológico de la pudrición radicular (*P. cinnamomi*) y la muerte regresiva del palto (*L. theobromae*) tanto por independiente y en interacción con micorrizas arbusculares.

**Palabras clave:** *Persea americana*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, Salinidad, Micorrizas, Pudrición radicular

## ABSTRACT

The present investigation was conducted under the objective of isolating, identifying and characterizing plant growth promoting bacteria associated with the genera *Pseudomonas* and *Bacillus*. Avocado seedlings of the Zutano variety were inoculated with 10 strains selected from 26 isolates in which *Bacillus subtilis* increased the number of leaves, fresh weight of leaves and roots, dry weight of roots, stems and leaves, and leaf area. The *in vitro* antagonistic activity was evaluated on *Phytophthora cinnamomi* where the Bac F (*B. subtilis*) and P3 (*P. putida*) strains generate an inhibition halo of 45 percent and 47 percent respectively; and on *Lasiodiplodia theobromae* the Bac F strain obtained 33.33 percent. At the greenhouse level, Bac F reduced the severity of the symptoms caused by *P. cinnamomi* and significantly increased root length and dry weight. The interaction between mycorrhizae and the promoter bacteria was evaluated; against the presence of *P. cinnamomi* and it was found that mycorrhizae improve plant growth parameters such as root length and moisture content despite being infected by *P. cinnamomi*; while the PGP bacteria had an effect in increasing the absorption of potassium, calcium, and magnesium. The interaction between mycorrhizae and bacteria was also evaluated under salinity conditions in which the rhizobacteria *P. plecoglossicida* and *B. subtilis* decrease the accumulation of chlorine and sodium ions; and decrease the loss of dry matter. Arbuscular mycorrhizae increase the accumulation of sodium, potassium, and chloride ions; and decrease the accumulation of sodium ion in the leaves compared to the control, they also increase the dry matter content. It is concluded that the avocado rhizosphere of the Hass/Zutano variety is related to the genera *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Lysinibacillus*, and the species *B. subtilis* stands out for its plant growth promoting activity, improvement of resistance against saline stress, and it is confirmed. the potential of the antagonistic rhizobacteria *B. subtilis* and *P. putida* for the biological control of root rot (*P. cinnamomi*) and avocado dieback (*L. theobromae*) both independently and in interaction with arbuscular mycorrhizae.

**Palabras clave:** *Persea americana*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, salinity, mycorrhizae, root rot

## I. INTRODUCCIÓN

Alrededor de 51,000 hectáreas existen en el Perú destinadas al cultivo de palta de la variedad Hass, que se distribuyen entre 8,000 productores (AGRARIA.PE 2023). Según estimaciones de la Asociación de Productores de Palta Hass del Perú, la superficie sembrada ascendió hasta 33 mil hectáreas en el año 2019; mientras que poseen la mayor superficie cultivada los departamentos de La Libertad, Lima y Ancash (MINAGRI 2019). De hecho, Perú es actualmente el segundo productor de palto a nivel mundial por lo que la apertura de nuevos mercados y consumidores debido a su valor nutricional continuarán en crecimiento (Arteaga 2016).

También entre los 20 países con mayor rendimiento de palta se encuentra el Perú con un rendimiento promedio de 10.8 t/ha en comparación con Samoa (29.8t/ha), Marruecos (26.3t/ha) y República dominicana (25.9t/ha) que lideran el ranking, pero superando a sus competidores en la región como México (10.1t/ha) y Chile (4.3 t/ha), según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Diario Gestión 2014).

Existen diversos factores de los que depende la producción del cultivo del palto, factores edáficos, nutricionales, climáticos y sanitarios. Es el factor sanitario uno de los que más incrementa el costo de producción de este cultivo y se manifiesta disminuyendo la supervivencia del árbol durante su fase en invernadero en la producción de plántones y en los primeros meses luego del trasplante en campo definitivo. El mayor responsable de este daño en las plántulas son las micosis (Barrientos *et al.* 2015), en el caso específico del palto el ataque de *Phytophthora cinnamomi* al sistema radicular de los plántones y *Lasiodiplodia theobromae* sobre la zona de inserción del injerto en particular.

Así, la “tristeza del palto” causada por *P. cinnamomi* (*Chromista, Heterokontophyta*) es la micosis de mayor importancia en la actualidad. Este patógeno afecta directamente la rentabilidad del cultivo al ocasionar la muerte del árbol en el largo plazo reduciendo antes el crecimiento, la producción y calidad del árbol y sus frutos. Ahora, este oomiceto es controlado con productos químicos, como fosetyl-Al y metalaxyl (Mora *et al.* 2007), Sin embargo, el uso constante de estos disminuye en el tiempo su efectividad debido a la generación de resistencia hacia el fungicida. Por ellos el control biológico parece ser una buena opción en la que se aprovechan los microorganismos con actividad antifúngica, entre ellos las bacterias del género *Pseudomonas*, responsables de suprimir algunos patógenos de suelo (Raaijmakers *et al.* 2002).

Otro patógeno importante es *L. theobromae*, un hongo endófito y parásito facultativo que ingresa a través de heridas y tejidos en descomposición que afecta severamente al cultivo del palto atacándolo en cualquier etapa de su desarrollo. Este patógeno causa la “muerte descendente” de ramas sobre todo en plantas jóvenes; además de formar necrosis y chancros en el pedúnculo de la fruta. Se le ha asociado al ataque de plantas jóvenes recién injertadas generando una alta tasa de mortalidad. Su estado sexual o teleomorfo es *Botryosphaeria rhodina*. La enfermedad ocasionada por este patógeno genera infecciones complejas de manejar, de ahí su importancia, y que se opte por el control químico como medida principal para reprimirlo con los efectos colaterales de constituir una posible vía de contaminación a los frutos por los residuos tras su aplicación (Muhammad *et al.* 2009).

Entre los factores abióticos, se puede mencionar el estrés hídrico y la salinidad. Los eventos climáticos adversos han aumentado en frecuencia e intensidad lo que ha conducido a periodos de excesos y deficiencia de agua que generan estrés en los cultivos y reducen su producción, y el palto no ha sido ajeno a esta problemática al ser un cultivo demandante de agua y no tolerar bien las sales (Nuruddin *et al.* 2003, citado por Martínez *et al.* 2015). El sistema radical superficial y la cantidad de consumo de agua del árbol hacen que las condiciones de sequía sean también un problema importante en el cultivo toda vez que su cultivo en Perú se realiza en áreas desérticas. A nivel mundial este fenómeno ocurre en zonas con clima árido y semiárido donde se cultiva el palto (Schaffer *et al.* 2013).

El palto es uno de los cultivos frutales más sensibles a las sales (Mickelbart *et al.* 2007), que en comparación con la mayoría de otros cultivos regados con agua que contiene cloruro y sodio evidencia en grado severo daño en las hojas, disminución y crecimiento restringido, así como menor volumen de producción (Bernstein *et al.* 2004).

Ante los varios problemas descritos, se han centrado algunas investigaciones en validar el uso de microorganismos en el manejo agronómico de los cultivos, en especial sobre los problemas fitosanitarios como una alternativa frente al uso de agroquímicos para el control de enfermedades diversas. Estos microorganismos presentan propiedades como antagonismo, mejorar el consumo de nutrientes, inducción de resistencia, producción de fitohormonas, antibiosis, micoparasitismo (Etebu y Osborn 2012, Jena 2012).

En ese sentido, los agroecosistemas pueden manejarse de manera sustentable con el uso de los microorganismos benéficos cuando se utilizan estos como inoculantes sobre las plantas para la promoción de su crecimiento y en particular su protección sanitaria (Orozco *et al.* 2010).

En la rizósfera, que es una zona de actividad biológica alrededor de la raíz, se pueden encontrar organismos diversos como bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus*, que se caracterizan por su actividad promotora del crecimiento vegetal, así como por controlar patógenos diversos, entre ellos *L. theobromae* y *P. cinnamomi*, que en el cultivo del palto son de importancia económica.

Dentro de la diversidad de bacterias con actividad bio controladora y promotoras del crecimiento vegetal destacan: *Pseudomonas* y *Bacillus*. Los géneros bacterianos *Pseudomonas* y *Bacillus* presentan versatilidad metabólica y la capacidad de colonizar diversas especies vegetales; además poseen actividad promotora del crecimiento vegetal caracterizada por mecanismos asociados a su corto tiempo de generación, movilidad alta, y metabolitos secundarios producidos que regulan el crecimiento del vegetal y también a otras poblaciones microbianas en la rizósfera de la planta (Kapulnik 2002).

En el caso de las bacterias del género *Pseudomonas*, resaltan estudios como controladores debido a su capacidad colonizadora de la raíz y porque compiten de manera activa y agresiva con otros microorganismos además de adaptarse a condiciones ambientales adversas como la salinidad (Weller 2007); mientras que las bacterias del género *Bacillus* spp. también se han descrito como promotoras del crecimiento vegetal pero más asociadas a la producción de antibióticos y enzimas; así como su capacidad para solubilizar fosfatos y producir hormonas que impactan en el desarrollo vegetal (Zuñiga 2009).

Por otro lado, la salinidad del suelo genera un efecto depresor sobre el crecimiento vegetal y algunos microorganismos pueden atenuar el estrés que ello genera (Odoh *et al.* 2020), en el caso del género *Bacillus*, diversos autores indican que *Bacillus subtilis* reduce el nivel de estrés oxidativo y osmótico inducido en las plántulas que se manifiesta en la mejora del crecimiento de las plantas (Lastochkina *et al.* 2017, Ibarra *et al.* 2021, Ferreira *et al.* 2018). Del mismo modo el género *Pseudomonas* ha mostrado reducir el nivel de estrés por salinidad en plantas cultivadas disminuyendo la actividad peroxidasa e incrementando la toma de nutrientes y mejorando el crecimiento vegetal en condiciones de salinidad a altas concentraciones (Costa *et al.* 2020, Srivastava y Srivastava 2020, Chu *et al.* 2019).

En el caso de las micorrizas arbusculares, estas establecen simbiosis con la mayoría de las plantas agrícolas y mejoran el crecimiento en condiciones de estrés del suelo, modulan el estrés de salinidad por la colonización de raíces modificando los sistemas enzimáticos antioxidantes que reducen el daño oxidativo y sostienen el crecimiento (Santander *et al.* 2020, Cardona *et al.* 2017, Silva 2019). Las simbiosis con micorrizas arbusculares aumenta la síntesis de prolina y las actividades de superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa y disminuyeron la síntesis de compuestos fenólicos relacionadas al estrés por salinidad (Santander *et al.* 2019).

Constituyen entonces los microorganismos promotores del crecimiento vegetal alternativas potenciales para agricultura sustentable debido a su bajo costo de producción y efectividad. Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivos a nivel *in vitro* y de invernadero: aislar y seleccionar rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas al cultivo del palto, evaluar la actividad antagónica de bacterias PGR aisladas de la rizosfera del palto sobre *P. cinnamomi* y *L. theobromae*, evaluar el efecto de la co-inoculación bacteria-micorriza sobre el crecimiento de plántones de palto var. Zutano, infectados con *P. cinnamomi*, evaluar el efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento de *Persea americana* var. Zutano bajo condiciones de estrés salino y evaluar el efecto de la inoculación de micorrizas arbusculares sobre el crecimiento de *P. americana* var. Zutano bajo condiciones de estrés salino. Por otro lado, se eligió la variedad de palto Zutano porque es una variedad altamente productiva y es utilizada como polinizador de la variedad Hass además de ser uno de los principales patrones empleados en el Perú.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. CULTIVO DEL PALTO Y PORTAINJERTO ZUTANO

#### 2.1.1. Importancia y sustentabilidad del cultivo del palto en el Perú

El palto (*P. americana* Mill.) es uno de los frutales más importantes en climas tropicales y subtropicales económicamente hablando (Apaza *et al.* 2019). Su cultivo en el Perú se ha establecido en el 2018 como el principal rubro de agroexportación, superando a los productos tradicionales como el café, los espárragos, entre otros. Al presente el mercado de Estados Unidos es el principal destino de exportación (Vittery & Colchao 2020).

En el Perú existen alrededor de 33,000 hectáreas de palto “Hass”, se cultiva bajo diferentes escenarios edafoclimáticos, como son la selva alta, valles interandinos y principalmente en los valles e irrigaciones de la costa del Perú (Ministerio de Agricultura y Riego del Perú 2019). Donde se emplea un sistema de producción intensivo con riego tecnificado sobre el desierto en suelos arenosos de baja biodiversidad donde existe un consumo alto uso de insumos para este cultivo de exportación. En los últimos años su desarrollo ha sido muy importante en especial dentro de la Irrigación Chavimochic, y en toda la costa del Perú. Se estima que, la producción de palta peruana seguirá siendo un negocio rentable debido al incremento de nuevos consumidores y mercados atraídos por sus propiedades nutricionales (Apaza *et al.* 2019).

Como cualesquiera de los cultivos agroindustriales en Perú y el mundo, el manejo de las plantaciones involucra el uso de agroquímicos en busca de mejorar las características vegetativas y reproductivas que reviertan en una mayor producción que puede acarrear el uso indiscriminado de estas sustancias fertilizantes, fungicidas, estimulantes, entre otros (Gagic *et al.* 2017, Singh *et al.* 2020); lo que conduce a que el sistema se vuelva no sustentable (Elahi *et al.* 2019, Iriti y Vitalini 2020, Lema *et al.* 2014).

EL incremento de la demanda internacional por la palta de Perú debe ir acompañada de estrategias que mejoren su calidad como lo es el manejo de enfermedades fitosanitarias y la disminución y control de los productos químicos que se le aplica al cultivo de cada una de las etapas de la cadena de producción, como una gran oportunidad para el crecimiento de los agricultores.

### **2.1.2. Tipos de portainjertos en palto**

El cultivo del palto posee niveles de producción debajo de su potencial, debido a la presencia de una serie de limitantes, como por ejemplo alta sensibilidad a déficit y excesos de humedad, suelos alcalinos y salinos, temperaturas bajas, hongos del suelo y otros relacionados a la identidad genética del portainjerto. Aunque las investigaciones de propagación partieron buscando un portainjerto con resistencia a *Phytophthora*. La capacidad de este oomiceto, así como las variantes en el clima han ido mermando dicha resistencia. Al presente se han ampliado al perfeccionamiento de otras características como tolerancia a otras enfermedades, altura del árbol y resistencia a condiciones edáficas.

Según Castro y Fassio (2015), regularmente la propagación de palto para plantaciones comerciales es mediante injertos por ello se busca que el portainjerto pertenezca a una variedad resistencia a la salinidad y resistente a la pudrición radicular, entre otras condiciones bióticas y abióticas diversas. Los mismos autores

clasifican también los portainjertos según el tipo de semilla de procedencia, de la siguiente manera:

a. Portainjertos obtenidos por semilla botánica

Debido a la polinización cruzada, en el Perú existen semillas de palto con una variabilidad genética enorme; y debido a esta variación presente en los portainjertos, los huertos resultan heterogéneos en su productividad y en relación precisamente con la resistencia a factores bióticos y abióticos adversos.

b. Portainjertos clonales

Cuando los portainjertos son clonales (plantas idénticas a la planta madre) se suele ganar eficiencia en disminuir la heterogeneidad si se realiza una Buena selección en el Vivero; sin embargo, los portainjertos clonales de palto tienen un valor más alto que los que provienen de semilla debido a su difícil propagación por esta vía.

### **2.1.3. Portainjerto y variedad Zutano**

Es una variedad híbrida mexicana que pertenece al grupo Floral B (Rubinstein, 2019). Se parece a la variedad fuerte en apariencia, pero es menos sabroso. Esta es una variedad de gran producción que es un gran polinizador para otras variedades (Bezuidenhout *et al.* 2016). Es una variedad resistente al frío y de producción constante (Bhore *et al.* 2021). Se utiliza como portainjerto en diversas partes del mundo (Bayram *et al.* 2014) incluido el Perú (Mamani y Aragon 2018). Aunque es un excelente portainjerto, su comportamiento es muy variable en el huerto por lo que su tolerancia media a la salinidad y a *P. cinnamomi* es cambiante, significativamente más bajo que la mayoría de los portainjertos clonales (Hunter 2018).

## **2.2. PUDRICIÓN RADICULAR EN EL PALTO POR *P. cinnamomi***

### **2.2.1. Características del sistema radicular del palto**

El sistema radical del palto es superficial y suberizado. Su densidad depende de la temperatura y humedad en el suelo (Gregoriou 1980, citado por Mamani 2017). Este sistema está compuesto por gran cantidad de raicillas que se han ido ramificando, asumiendo posiciones laterales dividiéndose continuamente, así existen raíces primarias y secundarias distribuidas en mayor volumen en los 45 primeros centímetros del suelo. Sólo las raíces nuevas de color blanco son activas en la absorción de nutrientes y agua, pero están expuestas a condiciones bióticas y abióticas adversas que merman el rendimiento del cultivo. Debido a estas características el sistema radical es relativamente ineficiente, con baja frecuencia de pelos radiculares y conductividad hidráulica baja (Villablanca 1994).

### **2.2.2. Género *Phytophthora***

De Bary (1876) describe al género con la especie *P. infestans* como especie tipo. Su nombre significa “el destructor de plantas”. Se le reconoció como causante de la pudrición tardía en la papa en Europa en el año 1840. Antes fue descrito como *Peronospora infestans* y *Botrytis infestans* (Montagne).

En muchas plantas se ha descrito a *Phytophthora* como causante de enfermedades asociadas a pudriciones radiculares, plántulas, tubérculos, tallos cortos, cormos y otros órganos cercanos al suelo. En ese sentido, algunas especies de este género tienen un amplio rango de hospederos mientras que otras son muy específicas, aunque el síntoma siempre está asociado a una pudrición (Agrios 1985).

Por otro lado, independientemente de su especificidad, este patógeno puede afectar a la planta en cualquier estado de su desarrollo induciendo marchitez generalizada, clorosis, pérdida de vigor, y clorosis hasta llegar a la muerte del árbol (Pérez 2008,

Tamayo 2007, Huaman *et al.* 2015). En el caso del palto, la especie que lo ataca es *P. cinnamomi* Rands.

### **2.2.3. El patógeno *P. cinnamomi* Rands**

*P. cinnamomi* es aislado por Rands (1922) en Sumatra en canchales de canela. Se le describe como habitante del suelo y ataca a más de 850 hospedantes desarrollándose en las raíces y base del tallo. Toker (1929) lo reporta por primera vez en el palto en Estados Unidos; mientras que en el Perú se reportaron 50 mil árboles enfermos en 1950 (Mora *et al.*, 2007). Su importancia radica en que no causa la muerte rápida de la planta por lo que su detección es compleja hasta que va lentamente afectando el crecimiento del palto, incluso aquellos árboles que están en producción en los cuales disminuye el rendimiento en forma paulatina y merma la calidad de la fruta. Con todo ello la rentabilidad del cultivo disminuye (Mejía y Ramos 2003).

### **2.2.4. Taxonomía de *P. cinnamomi***

Según Barr (1992), Patterson y Sogin (1992), Hawksworth (1994), la clasificación filogenética del chromista basada en relaciones evolutivas se presenta a continuación:

Reino: *Chromista*

Phylum: *Heterokontophyta*

Clase: *Oomycetes*

Orden: *Peronosporales*

Familia: *Pythiaceae*

Género: *Phytophthora*

Especie: *P. cinnamomi*

### **2.2.5. Descripción morfológica de *P. cinnamomi***

*P. cinnamomi* presenta, según Waterhouse y Waterson (1966), un micelio tortuoso con hifas de un espesor de 8  $\mu\text{m}$ , estas hifas están agrupadas en racimos esféricos de hasta 42  $\mu\text{m}$ . Presenta esporangios elipsoides u ovoides engrosadas en el ápice que se forman solamente en solución acuosa en el suelo. También presenta clamidosporas esféricas de pared gruesa.

### **2.2.6. Estructuras de propagación, resistencia e infección de *P. cinnamomi***

Las estructuras propagativas que produce *P. cinnamomi* son las oosporas, clamidosporas y zoosporas, que están además asociadas a su sobrevivencia y desarrollo de la enfermedad en las plantas. En el esporangio se forman las zoosporas que luego son liberadas y se trasladan en un medio acuoso en el suelo mediante flagelo, atraídas por quimiotaxis por sustancias que libera la raíz del vegetal. Una vez estas estructuras se alojan en la planta, se enquistan y germinan entre 24 a 48 h produciendo un tubo germinativo que penetra a la raíz (Marais *et al.* 2002, Huaman *et al.* 2015).

El patógeno ingresa por la epidermis a través de una entrada intercelular, luego el micelio al desarrollarse invade el tejido radicular generando daño celular y pudrición. El micelio también puede infectar a otras plantas por contacto entre las raíces de estas por las puntas. En condiciones de sequía el oomyceto produce estructuras de resistencias denominadas clamidosporas. Las clamidosporas se forman dentro de la raíz y se liberan cuando la raíz muere. Si hay condiciones de baja temperatura en el suelo, de 6 a 12°C, se producen otras estructuras de resistencia denominadas oosporas (Huaman *et al.* 2015).

Tanto las oosporas como las clamidosporas son viables durante varios años en el suelo, hasta seis años esperando que condiciones propicias de humedad y temperatura para atacar a su hospedero. Ambas estructuras germinan y originan esporangios que luego producen zoosporas que son las estructuras infectivas (Marais *et al.* 2002).

En cuanto a las condiciones ambientales propicias, se conoce que en el desarrollo de los esporangios influye la humedad como principal factor del suelo; mientras que las bajas temperaturas favorecen la liberación de las zoosporas. *P. cinnamomi* sobrevive incluso en restos vegetales muertos en los que la fase saprofítica del patógeno puede incrementar la población del oomiceto. Este patógeno también puede sobrevivir en el suelo como zoosporas enquistadas y micelios, este micelio puede sobrevivir más de seis años en un suelo con humedad (Mc Donald 1978). Este patógeno es heterotálico y presenta oosporas de germinación lenta y muy raras (Huaman *et al.* 2015).

#### **2.2.7. Sintomatología de la infección de *P. cinnamomi* en palto**

Según Marais (2002) y Lara *et al.* (2011) la sintomatología causada por *P. cinnamomi* se puede resumir en la siguiente lista:

- Pudrición radicular
- Declinamiento progresivo del árbol
- Formación de nuevas hojas más pequeñas.
- Clorosis y marchitamiento de las hojas
- Defoliación.
- Raíces negras y quebradizas.

#### **2.2.8. Interacciones ambientales con el hospedante y el patógeno**

A diferencia de otras especies del mismo género, *P. cinnamomi* forma esporangios debido a un exceso de riego lo que facilita la diseminación de la enfermedad y cuya infección está en constante interacción con el ambiente donde son dos los factores primordiales, la temperatura y el suelo (Huaman *et al.* 2015).

a. Temperatura

Según Huamán *et al.* (2015), *P. cinnamomi* limita la formación de esporangios a un cierto rango de temperatura baja lo que limita su actividad patogénica a condiciones muy particulares de las estaciones del año, como el invierno, en el cual las bajas temperaturas reducen la actividad del oomiceto; mientras que, en verano, se presentan las mejores condiciones ambientales para el desarrollo del patógeno lo que coincide con la formación abundante de raicillas en esta época. Así la temperatura óptima para el desarrollo de *P. cinnamomi* se encuentra entre 21 a 30°C.

b. Interacción con el suelo

En presencia de humedad y materia orgánica en el suelo, *P. cinnamomi* puede sobrevivir al menos seis años y sus estructuras de conservación son diversas como micelio, esporangio, clamidosporas y oosporas. El pH también es importante debido a que el hongo desarrolla en mayor medida en condiciones ligeras de acidez hasta la neutralidad (Mircetich 1966, citado por Huamán *et al.* 2015).

## **2.3.MUERTE REGRESIVA EN EL PALTO POR *L. theobromae***

### **2.3.1. Taxonomía de *L. theobromae***

Según Barnett y Hunter (1999) y Rodríguez-Galvez (2017), la clasificación Taxonómica de *L. theobromae* L. es de la siguiente manera:

Clase: *Dothideomycetes*

Orden: *Botryosphaeraiales*

Familia: *Botryosphaeriaceae*

Género: *Lasiodiplodia*

Especie: *theobromae* L.



### **2.3.2. Incidencia de *L. theobromae***

Se han informado pérdidas asociadas con la pudrición del extremo del tallo de frutos de aguacate en todas las regiones productoras de aguacate del mundo (Wanjiku *et al.* 2020). Se ha reportado con una mayor prevalencia en las regiones tropicales y subtropicales, se considera una amenaza para varios cultivos (Salvatore *et al.* 2020). Alama *et al.* (2006) fueron los primeros en reportar la ocurrencia de muerte regresiva causada por *L. theobromae* en Perú, los autores identificaron esta especie basándose únicamente en caracteres morfológicos y confirmaron una incidencia del 82 por ciento en el campo; además en Perú, ha sido reportada recientemente causando pérdidas en otros cultivos como vid (Rodríguez-Gálvez *et al.* 2015), mango (Rodríguez-Gálvez *et al.* 2017) y arándano (Rodríguez-Gálvez *et al.* 2020).

### **2.3.3. Sintomatología de la muerte regresiva por *L. theobromae* en el palto**

Los síntomas iniciales de la enfermedad en las ramas son lesiones irregulares, bronceadas y empapadas de agua, que se agrandan y fusionan, cubriendo áreas más grandes (5 cm) de las ramas. Las lesiones presentan abundantes pequeñas manchas negras (picnidios) y también polvo blanco a medida que avanzaba el tiempo. El xilema de las ramas se vuelve marrón oscuro. En etapas posteriores de la enfermedad, las ramas se secan (Qiu *et al.* 2020).

## **2.4.RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y EL CULTIVO DEL PALTO**

### **2.4.1. Promoción del crecimiento vegetal por rizobacterias**

Las interacciones beneficiosas entre microbios y plantas en la rizosfera son determinantes sobre la salud de las plantas y la fertilidad del suelo (Jeffries *et al.* 2003). Es la rizósfera la zona de actividad biológica alrededor de la raíz en la que se encuentra una diversidad de microorganismos como las bacterias, que se caracterizan por su actividad promotora del crecimiento vegetal; de esta manera, el uso de ello en los diferentes agroecosistemas es una alternativa. Para el beneficio de las plantas algunos de estos microorganismos vienen utilizándose como inoculantes debido a su actividad promotora y protección ante fitopatógenos y condiciones adversas ambientales (Orozco *et al.* 2010).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal son bacterias del suelo de vida libre que colonizan agresivamente la rizosfera/raíces de las plantas y mejoran el crecimiento y el rendimiento de los cultivos cuando se aplican (Kumar *et al.* 2014). El efecto promotor del crecimiento vegetal (PGP) se explica principalmente porque estimulan directamente el crecimiento por alguna de las siguientes formas: (a) producción de reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas como el ácido indolacético (IAA), citoquininas y giberelinas (Marques *et al.*, 2010); (b) mejoramiento de la fijación asimbiótica de N<sub>2</sub> (Khan 2005); (c) solubilización del fosfato inorgánico y mineralización de fosfato orgánico y/u otros nutrientes (Jeon *et al.* 2003); (d) efecto antagónico contra microorganismos fitopatógenos mediante la producción de sideróforos, enzimas y/o compuestos fungicidas, la síntesis de antibióticos, y la competencia con microorganismos perjudiciales (Lucy *et al.* 2004).

Dentro de la diversidad de bacterias con actividad sobre el crecimiento vegetal destacan: *Pseudomonas* y *Bacillus*, que por su capacidad metabólica amplia para utilizar diversos sustratos liberados por el vegetal y su versatilidad metabólica han sido identificadas como agentes promotores del crecimiento vegetal e interactuar con otras poblaciones microbianas de la rizosfera atenuando patógenos y en sinergismo con los benéficos (Kapulnik 2002).

#### **2.4.2. Efecto promotor del crecimiento vegetal del género *Pseudomonas***

Las *Pseudomonas* spp. son las bacterias más numerosas que se han cultivado y cosmopolitas. Tienen la capacidad de formar esporas de resistencia y colonizan diversos sustratos. Muchas de estas especies se han reportado por su actividad antagonista, tanto *in vitro* como *in vivo* (Orberá *et al.* 2014).

Según Peix *et al.* (2018) citados por el Manual of Systematic Bacteriology, la clasificación taxonómica de las *Pseudomonas* es:

Dominio: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacterias*

Clase: *Gammaproteobacterias*

Orden: *Pseudomonadales*

Familia: *Pseudomonadaceae*

Género: *Pseudomonas*

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

Las bacterias del género *Pseudomonas* sintetizan elementos como antibióticos, compuestos volátiles y enzimas, las que son responsables de su marcada actividad como controlador biológico y competir agresivamente con otros microorganismos. Es capaz de colonizar la raíz y adaptarse a condiciones ambientales adversas por lo que resaltan sus estudios como antagonista y promotor del crecimiento vegetal (Weller 2007, Walsh *et al.* 2001, De-Bashan *et al.* 2007, Bashan *et al.* 2013).

Entre las sustancias producidas destacan los antibióticos en particular la fenazina que produce *Pseudomonas* y se ha estudiado como protector contra *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* que es patógeno en el cultivo del trigo. La interacción con el patógeno se da por las sustancias que libera la planta y son empleadas como alimento tanto para el patógeno como el promotor, esta competencia y limitación alimenticia obliga a *Pseudomonas* a producir más antibióticos que terminan por desplazar al patógeno (Hernández-Salmeron *et al.* 2018).

En ese sentido, ha comenzado a analizarse las vías de la síntesis de los antibióticos por bacterias rizosféricas. Por ejemplo, se conoce la que los genes implicados en la síntesis de antibióticos en *Pseudomonas* están agrupados, como en el caso de *Pseudomonas fluorescens* en la que la síntesis de oomicina A está regulada por 8 genes. La regulación de la síntesis de antibióticos está determinada por las condiciones ambientales, la concentración del antibiótico sintetizado y por otros procesos metabólicos relacionados (Cook *et al.* 1995, citado por Mamani 2017).

#### **2.4.3. Efecto promotor del crecimiento vegetal del género *Bacillus***

Las bacterias del género *Bacillus* spp. funcionan como promotores mediante diversos mecanismos que ya se han mencionado en la literatura científica y comprenden la producción de antibióticos, solubilización de fosfatos, enzimas, producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal y fijación biológica de nitrógeno (Zúñiga 2009). Además, *Bacillus* spp. es un microorganismo prometedor debido a

su propiedad inherente de producir esporas y por su resistencia a condiciones extremas (Shafi *et al.* 2017).

Sin embargo, entre los múltiples efectos relacionados a la promoción del crecimiento de *Bacillus* spp. destaca su efecto antagonista; así podemos mencionar a *B. subtilis* SQR9 aislado de la rizósfera de pepino que mostró un fuerte antagonismo contra *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (Cao *et al.* 2011). Por otro lado, Akarm *et al.* (2013) demostraron que la cepa de *B. thuringiensis* puede proteger las plantas de tomate contra el marchitamiento por *Fusarium*.

Aunque el género *Bacillus* se encuentra bien adaptados a la rizosfera de muchas plantas, relativamente pocos agentes de biocontrol pertenecientes a *Bacillus* spp. se utilizan para controlar enfermedades en los cultivos, como en el caso de la sandía por ejemplo (Raza *et al.* 2016; Zhao *et al.* 2018). Por lo tanto, aún se necesitan más estudios para explorar los agentes de control biológico pertenecientes al género *Bacillus* específico en cada cultivo para fortalecer la gama de armas disponibles para el control biológico de las enfermedades, con el efecto adicional que ya tiene sobre la mejora del crecimiento vegetal.

Respecto a los mecanismos de control biológico de *Bacillus* spp., se puede mencionar la producción de un amplio espectro de antibióticos, la síntesis de enzimas extracelulares, la competencia por nutrientes y nichos, y la inducción de resistencia sistémica en plantas contra patógenos (Chowdhury *et al.* 2013, Santoyo *et al.* 2012); sin embargo, investigaciones previas han demostrado que la capacidad de colonización de raíces es un requisito previo para la actividad de los agentes de control biológico (Mendis *et al.* 2018) y al parecer las bacterias de este género tienen tal capacidad (Zhang *et al.* 2011).

Adicionalmente, está bien documentado que *Bacillus* spp. produce compuestos orgánicos volátiles (Kim *et al.* 2015). Estos poseen un bajo peso molecular por lo que se evaporan fácilmente a temperatura y presión normales (Gotor-Vila *et al.* 2017) y se ha informado acerca de estos que pueden inhibir el crecimiento y la germinación de esporas de varios hongos patógenos de plantas (Tahir *et al.* 2017); además también pueden mejorar el crecimiento de las plantas e inducir resistencia en las plantas contra los patógenos (Gao *et al.* 2017, Ryu *et al.* 2004).

#### **2.4.4. Promoción del crecimiento en palto por microorganismos**

Las bacterias que habitan en las raíces de los árboles han sido escasamente investigadas. Estas poblaciones microbianas pueden incluir promotores del crecimiento vegetal y agentes de control biológico (Besset-Manzoni *et al.* 2018). Por lo tanto, es relevante la búsqueda de rizobacterias que puedan ser utilizadas en el cultivo del palto para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas para reducir el uso de fertilizantes y pesticidas químicos para mejorar de manera sostenible el crecimiento y la salud del aguacate.

A pesar de la importancia del palto en todo el mundo, existen pocos estudios sobre la biología de su rizosfera. Cárzola *et al.* (2007) informaron que cuatro cepas de *B. subtilis* se asociaron con la actividad antifúngica y mostraron una aparente acción enzimática y antibiótica contra hongos fitopatógenos, mientras que Guevara Avendaño *et al.* (2018) identificaron cepas de *Bacillus* con capacidad para controlar los hongos fitopatógenos *Fusarium euwallaceae* y *Graphium* sp.

Méndez-Bravo *et al.* (2018), en su investigación describieron los efectos de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Arthrobacter* aislados de la rizósfera del palto contra *P. cinnamomi* a través de la producción de compuestos orgánicos volátiles. Por otro lado, Tzec-Iterián *et al.* (2020), revelan la diversidad de bacterias de la rizósfera del palto y destaca el potencial de un aislado único para lograr el biocontrol de *Scirtothrips perseae* (Tzec-Interián *et al.* 2020).

Sobre la absorción de nutrientes en el palto como en otras especies dependerá de su necesidad metabólica y está determinada por interacciones complejas a nivel la interfase planta-suelo (Sotomayor *et al.* 2019); así el aumento de la absorción de nutrientes de las plantas después de la aplicación de microorganismos como las micorrizas nativas se ha demostrado que aumenta la biomasa y la absorción de fósforo en las plantas de palto (Viera *et al.* 2017, Tiessen *et al.* 2018); también que el hongo *Trichoderma* promueve el crecimiento de las plantas (Zhang *et al.* 2016), así como aumenta la absorción de elementos minerales (Mehetre & Mukherjee, 2015, Rui *et al.* 2018; Sotomayor *et al.* 2019).

Respecto a la salinidad, Barra *et al.* (2017), demostraron el efecto favorable de la inoculación bacteriana en palto en condiciones de vivero bajo escasez de agua y estrés salino, e identificó consorcios que potencialmente podrían usarse como biofertilizantes de aguacate.

## **2.5. ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BACTERIAS PGR SOBRE *P. cinnamomi* y *L. theobromae***

Son diversos los factores implicados en la producción del palto, entre ellos factores nutricionales, climáticos y sanitarios. En especial el factor sanitario recibe especial atención debido al daño potencial que puede causar e incrementar el costo de producción. Las mayores dificultades de supervivencia de los plantones de este cultivo se manifiestan durante los primeros años y en el invernadero particularmente, así como durante los meses primeros posteriores al trasplante en campo definitivo; y el mayor causante de la muerte de las plantas de palto lo constituyen las enfermedades fungosas (Barrientos *et al.* 2015), en el caso específico del palto el ataque de *P. cinnamomi* al sistema radicular, y *L. theobromae* también sobre la zona de inserción del injerto.

La base natural del control biológico de plagas y enfermedades está basada en las interacciones negativas: comensalismo, depredación y parasitismo, entre las poblaciones microbianas del suelo constituyen (Atlas y Bartha 2002). Esta estrategia cuando se aplica sobre los patógenos de las plantas ha permitido incrementar la productividad como en el cultivo del trigo en el que se ha obtenido de 33 por ciento de incremento del rendimiento aplicando *Pseudomonas* que inhiben al hongo *Gaeumannomyces graminis* (Mamani 2017); a pesar de experiencias como esta en muchos países sigue siendo una amenaza importante para la seguridad alimentaria el impacto negativo de fitopatógenos asociados al género *Phytophthora* , cuyo control se dificulta debido a su mutabilidad espaciotemporal y genotípica. La estrategia entonces en esta investigación implica el uso de las rizobacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. La especie *B. subtilis* se puede utilizar a través de la producción extracelular de antibióticos, lipopéptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas, como las quitinasas y las proteasas (Orberá *et al.* 2014).

La “tristeza del palto” producida por *P. cinnamomi* restringe el desarrollo del árbol, disminuye la producción y la calidad del fruto, afectando de manera directa la rentabilidad (Mora *et al.* 2007), pero su uso reduce su efectividad. Por estas razones se emplean los microorganismos del suelo con actividad antifúngica, entre ellos las bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus* (De Bashan *et al.* 2007, Raaijmakers *et al.* 2002). Por otro lado, *L. theobromae* afecta duramente al cultivo de palto en cualquier estado de desarrollo, causando infecciones en la zona de inserción patrón-injerto en plantas jóvenes (Segura *et al.* 2015).

Como alternativa al uso de químicos para el control de enfermedades en los cultivos, algunas investigaciones se han centrado en la importancia del uso de microorganismos para el manejo de los problemas fitosanitarios (Etebu y Osborn 2012, Jena 2012). Dentro de la diversidad de bacterias con actividad biocontroladora y promotora del crecimiento vegetal destacan: *Pseudomonas* y *Bacillus*.



Los resultados actuales revelan el potencial de las rizobacterias que existen naturalmente en los suelos para suprimir los efectos de las enfermedades causadas por *P. cinnamomi* (Colavolpe *et al.* 2020; Virgen *et al.* 2020). Se ha demostrado que las cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* son eficaces como biofertilizantes y agentes de biocontrol en la agricultura. El uso de estas bacterias ha demostrado ser eficaz para suprimir los microbios patógenos, fomentar los efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas y facilitar la accesibilidad y asimilación de los nutrientes (Mamani y Aragon, 2018, Syed-Ab-Rahman *et al.* 2020).

## **2.6. ACCIÓN DE LAS BACTERIAS-MICORRIZAS SOBRE LA INFECCIÓN POR *P. cinnamomi***

La palta es una de las frutas tropicales más notorias del mundo por su alto valor nutritivo y sabor agradable (Hurtado *et al.* 2018). El cultivo de palto se ve afectado por diversos problemas merman su rendimiento y, por tanto, menores ingresos para los productores (Ramírez 2018), debido a problemas de mal manejo del suelo y del recurso hídrico que deriva en la enfermedad conocida como pudrición radicular (Ramírez-Gil *et al.* 2017).

La pudrición de la raíz causada por *P. cinnamomi*, es la enfermedad más destructiva del palto en todo el mundo (Hardham y Blackman 2018). La sintomatología primaria se muestra en la raíz, que se torna marrón oscuro, quebradiza, de fácil desprendimiento del súber y pérdida de selectividad a las sales y patógenos vasculares. Los síntomas secundarios inician con un amarillamiento de las hojas, defoliación progresiva y decaimiento general, semejante al estrés hídrico, pese a tener el suelo en condiciones óptimas de humedad (Kurbetli *et al.* 2020).

Existen métodos de control disponibles que pueden reducir la gravedad de esta enfermedad (Ramírez y Morales 2020); sin embargo, la tendencia en la actualidad es a incorporar nuevas tecnologías, que disminuya el uso de agroquímicos a fin de obtener productos más sanos y, a la vez, abrir mercados más exigentes (Sumida *et al.* 2020). En este sentido, las rizobacterias y micorrizas constituyen una fuente importante de

microorganismos potencialmente beneficiosos con actividad promotora del crecimiento de las plantas y efectos antagonistas contra los fitopatógenos (Méndez *et al.* 2018, Shu *et al.* 2017, Cazorla *et al.* 2007).

Los hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA) forman el componente principal de las comunidades microbianas rizosféricas (Mickan *et al.* 2019). Estos microorganismos forman simbiosis con las plantas y son importantes para su nutrición y desarrollo, también ofrecen ventajas adicionales tales como control biológico de fitopatógenos, lo que ha generado gran interés por implementar su producción masiva y uso comercial (Gómez *et al.* 2017).

Las micorrizas aumentan la resistencia de la planta a la agresión de patógenos (Eisenman *et al.* 2020), en especial, los que afectan la raíz, cuando ocurre un establecimiento previo de los hongos al del patógeno, reducen la incidencia debido a que el daño producido es a menudo compensado por aumento en el sistema radical y la absorción de nutrientes favorecida por el micelio externo del hongo (Kadam *et al.* 2020).

Los resultados actuales revelan el potencial de las rizobacterias que existe naturalmente en los suelos para suprimir los efectos de las enfermedades causadas por *P. cinnamomi* (Colavolpe *et al.* 2020; Virgen *et al.* 2020). Se ha demostrado que las cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* son eficaces como biofertilizantes y agentes de biocontrol en la agricultura. El uso de estas bacterias ha demostrado ser eficaz para suprimir los microbios patógenos, fomentar los efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas y facilitar la accesibilidad y asimilación de los nutrientes (Mamani y Aragon 2018, Syed-Ab-Rahman *et al.* 2018). Aunque existen reportes de la actividad antipatogénica de micorrizas y bacterias, así como de la interacción bacteria-micorrizas (Bourles *et al.* 2020, Reyes-Tena *et al.* 2017), no hay reportes sobre su co-inoculación para el tratamiento de pudriciones radiculares en el palto.

## 2.7. ACCIÓN DE LAS BACTERIAS-MICORRIZAS SOBRE EL ESTRÉS SALINO

Para los recursos ambientales, la peor amenaza es la salinización de los suelos y afecta entre el 7 a 10 % de la extensión continental (Upadhyay *et al.* 2011). Cuando la concentración de iones interfiere en el crecimiento de especies de interés agrícola y alcanza una conductividad eléctrica  $>4$  dS m<sup>-1</sup> (aproximadamente 36 mM de NaCl), entonces un suelo es considerado salino (Bui 2013). Las sales presentes en el suelo derivan del material pedogénico (meteorización) o antrópico (agua de irrigación o fertilización) y se incrementa cuando el riego es insuficiente para lixiviar los iones en el perfil del suelo o cuando la tasa de evaporación es alta (Bui 2013, Parida & Das 2005, Shrivastava & Kumar 2014).

La producción agrícola en diversos cultivos se ve disminuida por la salinidad porque afecta el balance ecológico del área cultivada y las propiedades físicas y químicas del suelo (Upadhyay *et al.* 2011, Shrivastava & Kumar 2014). Bajos niveles de salinidad  $< 4$  dS m<sup>-1</sup> provocan estrés fisiológico porque sus iones, originan toxicidad, estrés osmótico, oxidativo y carencia de nutrientes (N, Ca, K, P, Fe, Zn) que restringen la absorción de nutrientes del suelo, así como también afecta a la fotosíntesis reduciendo el área foliar, la conductancia estomática y el contenido de clorofila. El desarrollo reproductivo de los cultivos, así como la germinación y crecimiento vegetativo se ven afectados debido a la salinidad de los suelos (Parida & Das 2005, Bui 2013, Shrivastava & Kumar 2014, Pompeiano *et al.* 2014).

En este contexto, el palto, se ha reconocido como uno de los frutales más sensible a la salinidad (Bernstein *et al.* 2004, Mickelbart *et al.* 2007), debido a que los árboles de palto cuando son regados con agua con contenido de cloruro y sodio en niveles que otros cultivos toleran con normalidad presentan daño en las hojas y disminuye su crecimiento y productividad (Bernstein *et al.* 2004). En el mundo en zonas áridas y semi áridas donde se cultiva el palto sucede esta problemática (Schaffer *et al.* 2013), lo que ha llevado a

investigar diversas herramientas para hacer frente al problema de la salinidad como la selección de portainjertos tolerantes a las sales (Crowley *et al.* 2003).

La salinidad del suelo entonces genera un efecto depresor sobre el crecimiento vegetal y algunos microorganismos pueden atenuar el estrés que ello genera (Odoh *et al.* 2020), en el caso del género *Bacillus*, diversos autores indican que *B. subtilis* reduce el nivel de estrés oxidativo y osmótico (Lastochkina *et al.* 2017, Ibarra *et al.* 2021, Ferreira *et al.* 2018). Del mismo modo el género *Pseudomonas* ha mostrado reducir el nivel de estrés por salinidad en plantas cultivadas disminuyendo la actividad peroxidasa e incrementando la toma de nutrientes y mejorando el crecimiento vegetal en condiciones de salinidad a altas concentraciones (Costa *et al.* 2020, Srivastava y Srivastava 2020, Chu *et al.* 2019).

Por otro lado, las micorrizas arbusculares establecen simbiosis con la mayoría de las plantas agrícolas y mejoran el crecimiento en condiciones de estrés del suelo, modulan el estrés de salinidad por la colonización de raíces modificando los sistemas enzimáticos antioxidantes que reducen el daño oxidativo y sostienen el crecimiento (Santander *et al.* 2020, Cardona *et al.* 2017, Silva 2019). Las simbiosis con micorrizas arbusculares aumenta la síntesis de prolina y las actividades de superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa y disminuyeron la síntesis de compuestos fenólicos relacionadas al estrés por salinidad (Santander *et al.* 2019).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

Con la finalidad de responder a los múltiples objetivos planteados, los materiales y métodos se agrupan a continuación por ensayos o bloques, dentro de cada cual se describe el proceso pertinente.

#### **3.1. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL ASOCIADAS AL CULTIVO DEL PALTO**

##### **3.1.1. Toma de muestras**

El muestreo se realizó en campos de palto localizados en Virú a una altitud de 75 m.s.n.m., latitud 08°32'22'' y longitud 78°40'57'', dichos campos reportaron problemas de pudrición radicular pero no disminuyeron su rendimiento. En cada campo muestreado, se seleccionaron 5 árboles. De cada árbol se colectó 250 g de volumen de suelo rizosférico de los cuatro puntos cardinales de la proyección de su copa (Figura 1). Cada árbol muestreado fue una submuestra. Las submuestras se depositaron en bolsas separadas cerradas herméticamente, las que fueron etiquetadas como: A, B, C, D y E, luego transportadas en frío (uso de empaques Gel Pack), para mantener su temperatura y humedad, al Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología para ejecutar el aislamiento microbiano. Además, se hizo una mezcla de las submuestras y fue enviado para su caracterización fisicoquímica al laboratorio de suelos de la Universidad Nacional Agraria La Molina.



a. árbol en floración b. suelo rizosférico

**Figura 1. Muestreo de árboles de palto**

### **3.1.2. Recuento y aislamiento de rizobacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus***

Se analizó la microflora de la rizosfera en condiciones de asepsia. Se colocó 1g de suelo de cada muestra en tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada en agitación continua. En el caso de *Bacillus* estos tubos fueron sometidos a 80°C en baño María durante 60 minutos para garantizar la presencia de las esporas termorresistentes de esta especie. Luego se realizaron 7 diluciones seriadas:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ , posteriormente, se utilizaron las últimas diluciones para ser sembradas en tubos con caldo asparagina (conteo de *Pseudomonas*) o placas con medio extracto de glucosa y triptona TGE (conteo de *Bacillus*). Los tubos y placas sembradas fueron incubadas a 28 °C durante cuatro días, para determinar la riqueza de estas especies mediante el recuento (Martínez 2010). Los resultados se reportan en células por mililitro. A partir de la última dilución sembrada se aislaron colonias puras en placas de agar cetrimida y TGE respectivamente.

Adicionalmente, el recuento de las probables *Pseudomonas* se hizo por el método de enumeraciones por número más probable (NMP) que consta de baterías de 3 tubos por dilución. Se pipeteó 1 ml del frasco de  $10^{-1}$  de cada muestra y se dispensó en un tubo del caldo Asparagina ( $10^{-7}$ ) de concentración simple por triplicado. Los tubos fueron incubados a 28°C por 48 horas. Pasadas 48 horas se examinaron los tubos de ensayo bajo la luz ultravioleta en un cuarto en oscuridad. La producción de pigmentación verde fluorescente constituyó una prueba presuntiva positiva. Con la ayuda del asa de Kolle, se sembró el contenido del tubo sobre la superficie del agar cetrimida y se evaluó el crecimiento característico de las colonias. Los resultados se expresaron en NMP/g de suelo seco.

### **3.1.3. Conservación de las bacterias aisladas por congelación a – 80 °C**

Las cepas aisladas se conservaron por duplicado mediante criopreservación a – 80 °C. Las probables *Pseudomonas* y *Bacillus* se sembraron en caldo nutritivo, se incubaron por 24 horas en un agitador de tubos a 150 rpm y a 28°C de temperatura. Se colocó glicerol estéril (crioprotector al 20 por ciento) en proporción 1:2 con el

inóculo en tubos eppendorfs debidamente rotulados. Se homogenizó la mezcla con un vortex, se selló con parafilm y se guardó en la congeladora a -80 °C.

#### **3.1.4. Determinación de la actividad solubilizadora de fosfatos**

Para la determinación del índice de solubilización de fosfato en medio sólido según *Lara et al.* (2011), las cepas aisladas y cultivadas en caldo nutritivo durante 48 horas e incubadas a 28°C, se sembraron por triplicado, mediante la técnica de puntura superficial en agar National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) con 1 gL<sup>-1</sup> P inorgánico, como fosfato tricálcico. Para alcanzar las concentraciones requeridas se agregaron 5,0 g de fosfato tricálcico. Para determinar la eficiencia relativa de solubilización de los aislamientos sobre el medio NBRIP, en el que las colonias que desarrollan actividad solubilizadora se detectaron mediante la formación de halos de transparencia y/o la acidificación del medio alrededor de ellas. Con los valores obtenidos a las 120 horas de incubación a 28° C, se calculó el índice de solubilización, de fosfato según las fórmulas mencionadas por García y Álvarez (2012).

$$\text{Índice de solubilización} = \frac{\text{diámetro de solubilización} + \text{colonia}}{\text{diámetro de la colonia}} \times 100$$

#### **3.1.5. Determinación de la síntesis de sideróforos**

Se realizó una suspensión bacteriana de cada una de las cepas en estudio en caldo nutritivo incubado durante 48 horas a 28°C a una concentración de 10<sup>8</sup> cel/ml. Se tomaron alícuotas de 10µL de la suspensión, y se sembraron por triplicado sobre una placa de Petri con agar cromo azurol S (CAS) a razón de tres microgotas por caja. Las placas fueron incubadas durante 48 h a 28±2 °C.



### **3.1.6. Identificación molecular de las rizobacterias por el gen 16S ADNr**

Se cultivaron overnight las 26 cepas aisladas, en caldo nutritivo a 150 rpm e incubadas a 28°C hasta que se alcanzó la fase logarítmica del crecimiento. Se tomó aproximadamente 2 ml del caldo de cultivo overnight, y se colocó en microtubos de 2 ml centrifugándose las muestras durante 2 minutos a 12000g descartándose luego cuidadosamente el sobrenadante. Para la obtención del ADN genómico se utilizó el Kit de extracción AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep (Axygen) y se procedió de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los microtubos conteniendo las muestras de ADN se guardaron en refrigeración a -20°C para su posterior análisis y posteriormente secuenciado por MacroGen Inc. (Seoul, Korea). La identificación molecular de las cepas se realizó mediante la amplificación del gen 16S ADNr. El análisis de la similitud entre las secuencias de los nucleótidos obtenidos y los depositados en la base de datos del Gen Bank usando el análisis BLAST para determinar su identidad taxonómica.

### **3.1.7. Análisis filogenético de las rizobacterias identificadas en la rizosfera de *P. americana***

Para la limpieza de secuencias y alineamiento con secuencias de cepas tipo, se emplearon los programas ChromasLite y BioEdit. Los árboles filogenéticos del ARNr 16S fueron deducidos usando the neighbour-joining analysis (Saitou, N.J. & Nei, 1987). Este análisis involucró adicionalmente 5 secuencias de nucleótidos a las secuencias de las bacterias aisladas. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (2018).

### **3.1.8. Actividad promotora de crecimiento vegetal de cepas aisladas de la rizosfera**

En macetas de plástico de 4 litros de volumen se agregó sustrato Premix ® N°8 (pH: 5.5, CE: 0.75 dS/m, P: 25 ppm y K: 100 ppm) esterilizado en autoclave, y se sembraron semillas de palto de la var. Zutano de aproximadamente 50 g de peso, donadas por la empresa Avo Hass Perú, previamente esterilizadas en hipoclorito de sodio al 10% durante 10 min y luego remojadas durante 24 horas en caldo bacteriano proveniente de cada cepa seleccionada (P1, P3, P4, P6, P10, P11, P12, BAC L, BAC M, BAC F) crecida durante 48 horas en caldo nutritivo ( $10^8$  UFC/mL) e incubada a 28°C, para

ello se emplearon bolsas estériles para contener las semillas y el caldo en proporción de 50 ml por semilla. Las semillas una vez germinadas luego de 10 días fueron trasplantadas en el sustrato y condiciones antes indicadas y se dejaron crecer en un cuarto de cultivo con una temperatura media de 20°C, humedad del 60 por ciento, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad hasta obtener los plantones, al final de seis semanas fueron evaluadas las características de crecimiento. Las plantas fueron regadas con agua de clase C2-S1 estéril, según el análisis de agua, lo que quiere decir según su peligro de sodio, que puede usarse para el riego sin peligro de destrucción de su estructura.

Se evaluó la altura de planta (cm) mediante una wincha. Se contabilizó el número de hojas. Se determinó el peso fresco de hojas (g), peso fresco de tallo (g), peso fresco de raíz (g) mediante el pesado en una balanza calibrada con dos dígitos de precisión. También se determinó el peso seco de raíz (g), peso seco de tallo (g), peso seco de hojas (g) sometiendo el material fresco dentro de un sobre de papel Kraft lo suficientemente grande según la cantidad de biomasa respectiva a una estufa a 70°C durante 3 días hasta que el peso fue constante (Leal *et al.* 2014, Zapata y Leal 2018). La clorofila fue determinada mediante el quipo espectral compacto **SPAD-502 Plus** en hojas maduras (Ruiz 2021). Para determinar el área foliar se utilizó la metodología propuesta por Chávez (2012) mediante la relación entre el área y el peso de un patrón de papel bond, se procedió a cortar 1 dm<sup>2</sup> del papel y pesarlo y de igual manera a dibujar cada una de las hojas sobre el papel y pesarlo para calcular el área foliar. Para determinar el área foliar se halló mediante la siguiente fórmula:

$$AFP = PSTHP \times AFSH (1 \text{ dm}^2) / PSH (1 \text{ dm}^2)$$

Dónde:

AFP = Área foliar del plantón.

PSTHP = Peso de las siluetas de todas las hojas del plantón.

AFSH = Área foliar de 1 dm<sup>2</sup> de la silueta de una hoja.

PSH = Peso de 1 dm<sup>2</sup> de la silueta de una hoja.

### **3.1.9. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistic Package for Social Sciences (SPSS) de la compañía IBM versión 24. Los datos obtenidos en cada experimento se sometieron al análisis de varianza mediante la prueba F y se compararon los promedios de todos los tratamientos en caso de significancia mediante la prueba de Duncan, para determinar diferencias entre cepas. Se consideró significativa la probabilidad de error alfa menor de 5 por ciento.

## **3.2.EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BACTERIAS PGR AISLADAS DE LA RIZOSFERA DEL PALTO SOBRE *P. cinnamomi* y *L. theobromae***

### **3.2.1. Aislamiento de *Pseudomonas* y *Bacillus***

Este procedimiento se realizó en conjunto con el recuento establecido en el numeral 3.1.2. Se tomaron y tamizaron cinco muestras de suelo rizosférico de *P. americana* a una profundidad de 20 cm. De cada muestra, se pesaron 10g de suelo, se diluyeron y agitaron en 90 ml de agua peptonada durante 15 min a 150 rpm, respectivamente. Se realizaron diluciones sucesivas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$  y se inocularon 0,1 ml en placas de Petri con medio de cultivo Cetrimide (*Pseudomonas*) o Caldo de extracto de glucosa y tripton TGE (*Bacillus*) (Martínez 2010) incubado por 48 horas a 28°C.

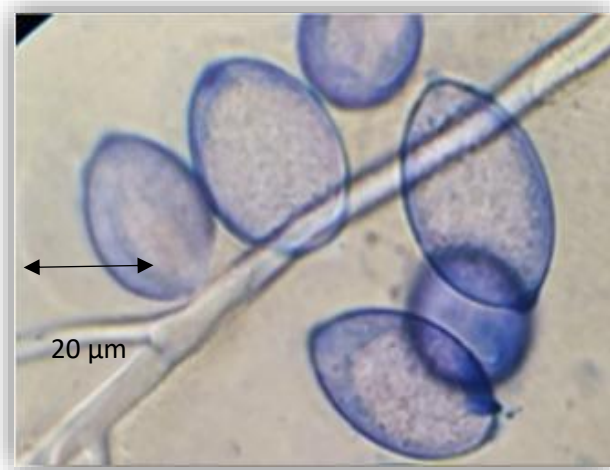
En el caso de las *Pseudomonas* probables, de la diversidad de los microorganismos que crecieron en agar cetrimida se seleccionó un grupo representativo con características morfológicas diferentes y se procedió al aislamiento de cepas mediante siembras sucesivas. La caracterización de cepas de *Pseudomonas* se realizó en el medio cetrimida a las 48 horas de crecimiento.

En *Bacillus*, la diversidad de los microorganismos que crecieron en el medio de cultivo TGE se seleccionó de manera representativa un grupo de características morfológicas diferentes y se aisló en el mismo medio los posibles *Bacillus*.

De cada aislamiento, se seleccionó una colonia, la que fue estriada en agar nutritivo para asegurar la pureza de cada aislamiento y se guardó a 4°C para los siguientes ensayos.

### 3.2.2. Propagación de *P. cinnamomi*

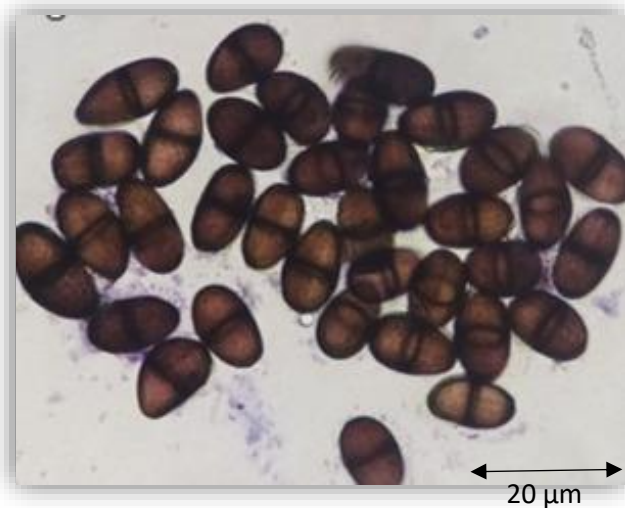
La cepa utilizada (PIB-03) fue proporcionada por el Laboratorio Agrícola Biaster SAC (Figura 2). La propagación del micelio se realizó a partir de la placa Petri que contuvo el cultivo madre, realizando los repiques necesarios para la obtención del patógeno, para ello se sembraron discos de agar de 8 mm conteniendo micelio de la placa madre sobre agar harina de maíz (CMA) (Mamani, 2017). La propagación de zoosporas se realizó en pétalos de clavel, los cuales fueron desinfectados previamente en hipoclorito de sodio al 1 por ciento por un periodo de 60 segundos, luego enjuagados en abundante agua estéril. Los pétalos estériles en cantidad de 1 gramo fueron puestos en un matraz estéril de 250 mL con 100 mL de agua mineral estéril, luego sobre los pétalos se colocaron discos de agar conteniendo *P. cinnamomi*, para luego dejar que colonice el patógeno los pétalos durante 72 horas a temperatura de cuarto aproximadamente 22°C y luego realizar la inoculación en el caso de macetas. La infección de plántulas con *P. cinnamomi* se efectuó aplicando 30 ml solución de zoosporas a una concentración de  $10^5$  zoosporas/ml por maceta (Molina *et al.* 2003).



**Figura 2.** Esporangios de *P. cinnamomi* PIB-03

### 3.2.3. Propagación de *L. theobromae*

La cepa utilizada fue proporcionada por el Laboratorio Agrícola Biaster SAC de Ica (Figura 3). Se realizó a partir de la placa Petri que contuvo el cultivo madre, realizando los repiques necesarios para la obtención y conservación del patógeno, para ello se sembraron discos de agar de 8 mm conteniendo micelio de la placa madre sobre Agar papa dextrosa (PDA) incubados durante 72 horas a 28°C (Segura-Contreras 2015).



**Figura 3. Conidias de *L. theobromae* LTB-05**

### 3.2.4. Actividad antagónica *in vitro* de *Pseudomonas spp.* y *Bacillus spp.* sobre *P. cinnamomi*

Mediante la técnica de enfrentamiento dual, se inocularon 20  $\mu$ L de inóculo bacteriano de las cepas crecidas por 48 horas en caldo nutritivo a 28°C con una densidad poblacional de  $10^8$  cel/ml sobre placas de agar harina de maíz en las que previamente había crecido el hongo durante cuatro días, en tres puntos por placa, donde cada punto constituyó una repetición.

Se midió el porcentaje de inhibición del crecimiento a las 72 horas, que se calculó utilizando la siguiente fórmula (Orberá *et al.* 2014):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(R-r)}{R} \times 100$$

r: Es el radio de la colonia fúngica opuesta a la colonia bacteriana.

R: es el radio máximo de la colonia fúngica alejada de la colonia bacteriana.

### **3.2.5. Actividad antagónica *in vitro* de *Pseudomonas spp.* y *Bacillus spp.* sobre *L. theobromae***

Mediante la técnica de enfrentamiento dual, se inocularon 20 µL de inóculo bacteriano de las cepas crecidas por 48 horas en caldo nutritivo a 28°C con una densidad poblacional de 10<sup>8</sup> cel/mL sobre tres puntos equidistantes en placas de agar papa dextrosa (PDA) y un disco de micelio del hongo de 8mm en la parte central e incubaron durante cuatro días a 20°C, el ensayo se hizo con tres repeticiones. Se midió el porcentaje de inhibición del crecimiento a las 72 horas, que se calculó utilizando la fórmula propuesta por Orberá *et al.* (2014).

### **3.2.6. Actividad antagónica *in vivo* de Bac F sobre *P. cinnamomi***

En macetas de plástico de 2 litros de volumen se agregó sustrato Premix ® N°8 (pH: 5.5, CE: 0.75 dS/m, P: 25 ppm y K: 100 ppm) y se sembraron semillas de palto de la var. Zutano de aproximadamente 50 g de peso, donadas por la empresa Avo Hass Perú, previamente esterilizadas en hipoclorito de sodio al 10 por ciento durante 10 min y luego remojadas durante 24 horas en caldo bacteriano proveniente de la cepa Bac F crecida durante 48 horas en caldo nutritivo (10<sup>8</sup> cel/mL) a 28°C, para remojar las semillas se emplearon bolsas estériles para contener las semillas y 50 ml del caldo bacteriano semilla. Las semillas una vez germinadas a los 10 días aproximadamente, se dejaron crecer por tres semanas en invernadero con una temperatura media de 20°C y humedad del 60 por ciento

hasta obtener las plántulas, luego se procedió a aplicar 50 mL de la cepa Bac F crecida en caldo nutritivo ( $10^8$  cel/mL) y una semana después se aplicó el inóculo de zoosporas del fitopatógeno, manteniendo el suelo húmedo constantemente. Los plantones fueron evaluados tres semanas después de la inoculación con *P. cinnamomi*, realizando aislamientos del hongo de raíces de cada planta para garantizar la infección. Se evaluaron según Gómez y Apaza (2015), parámetros de crecimiento de la raíz asociados al daño por el patógeno como peso, longitud, humedad, además se evaluó número de hojas y biomasa de la parte aérea. La severidad de la infección de *P. cinnamomi* en plantones de palto previamente inoculados con las cepas de *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*, fue determinada mediante una escala visual calibrada basada en síntomas externos (Ramírez y Morales 2020).

### **3.2.7. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistic Package for Social Sciences (SPSS) de la compañía IBM versión 24. Se consideró significativa la probabilidad de error alfa menor de 5 por ciento. Los datos obtenidos en cada experimento se sometieron al análisis de varianza mediante la prueba F y se compraron los tratamientos en caso de significancia mediante la prueba de Duncan, para determinar diferencias entre cepas al 95 por ciento de confiabilidad.

## **3.3.EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CO-INOCULACIÓN BACTERIA-MICORRIZA SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTONES DE PALTO VAR. ZUTANO BAJO CONDICIONES DE INFECCIÓN CON *P. cinnamomi***

### **3.3.1. Ensayo de co-inoculación bacteria/micorriza**

Se ensayaron dos factores: Micorrizas (sin micorrizas, micorrizas de costa y micorrizas de selva) y Bacterias PGP con actividad antagónica *in vitro* sobre *P. cinnamomi* (sin bacterias, *B. subtilis* Bac F, *P. putida* P3), en tres niveles cada factor con un total de seis réplicas cada tratamiento.

### **3.3.2. Inoculación de micorrizas**

Primero se inocularon las micorrizas arbusculares, se emplearon dos tipos de micorrizas procedentes de: Suelo salino de costa (*Glomus intrarradices*) y de suelo de selva (Consortio), y se inocularon a una dosis de 2000 esporas por maceta por planta.

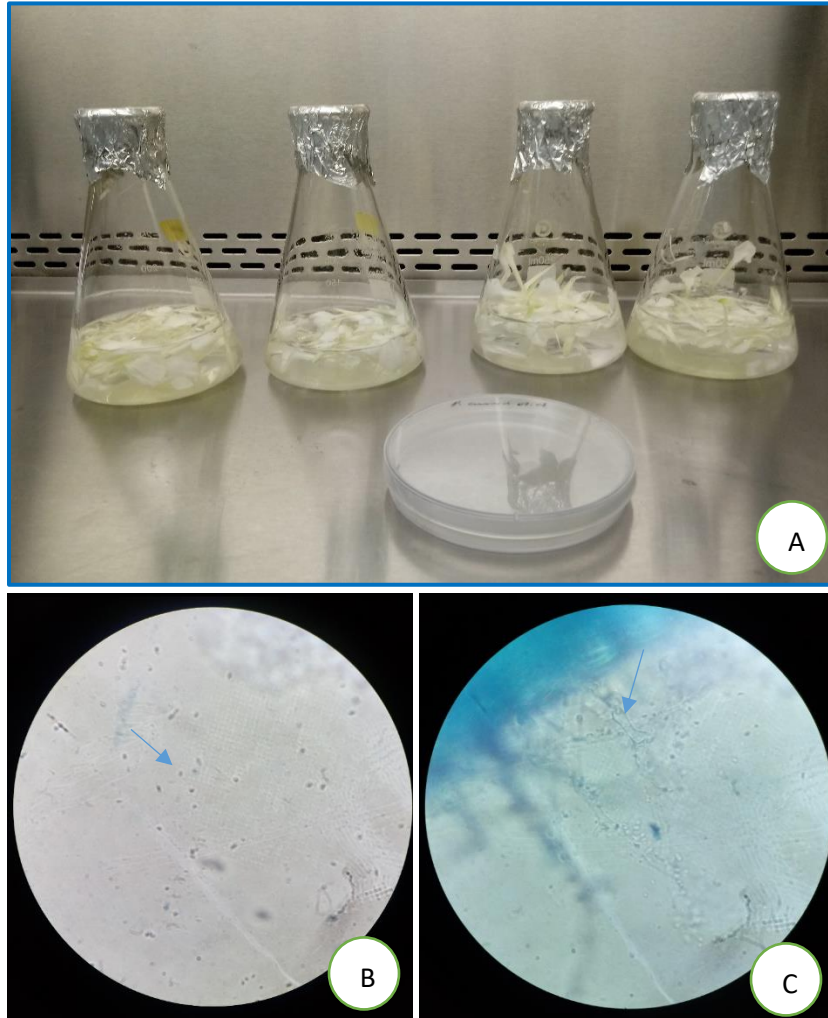
### **3.3.3. Propagación e inoculación de *P. cinnamomi***

Se realizó en pétalos de clavel, los cuales fueron desinfectados previamente en hipoclorito de sodio al 1 por ciento por un periodo de 60 segundos, luego enjuagados en abundante agua estéril. Los pétalos fueron puestos en un matraz estéril de 250 mL con 100 mL de agua mineral estéril, luego sobre los pétalos se colocaron discos de agar conteniendo *P. cinnamomi*, para luego dejar que colonice el patógeno los pétalos durante 72 horas a 22°C y luego realizar la inoculación (Figura 4). La infección de plántulas con *P. cinnamomi* se efectuó aplicando 30 ml solución de zoosporas a una concentración de  $10^5$  zoosporas/ml.

### **3.3.4. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistic Package for Social Sciences (SPSS) de la compañía IBM versión 24. Los datos obtenidos en cada experimento se sometieron al análisis de varianza de tipo factorial en el que se determinó los efectos principales e interacciones de los factores micorrizas y bacterias mediante la prueba F y se compraron los tratamientos en caso de significancia mediante la prueba de Duncan, para determinar diferencias entre cepas. Se consideró significativa la probabilidad de error alfa menor de 5 por ciento.





**Figura 4. A. Inóculo de *P. cinnamomi* en agua mineral y pétalos de clavel. B. Zoosporas (1000x). C. Micelio y esporangios sobre pétalo de clavel**

### **3.4.EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. americana* VAR. ZUTANO BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO**

#### **3.4.1. Selección de bacterias PGP resistentes a altas concentraciones osmóticas**

Se seleccionaron siete aislamientos de bacterias Gram positivas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, procedentes de la rizosfera de *P. americana*, debido a que presentaron alguna característica promotora de crecimiento (solubilización de fosfatos, síntesis de sideróforos y actividad antagonista contra *P. cinnamomi* y/o *L. theobromae*) en ensayos antes descritos. Se sembraron en condiciones de salinidad en agar e incubaron a 28°C, luego de tres días de crecimiento se seleccionaron aquellas que no mermaron su crecimiento en concentraciones crecientes de salinidad en agar nutritivo con 7.5 y 15 g·l<sup>-1</sup> de cloruro de sodio, respectivamente.

#### **3.4.2. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la resistencia al estrés salino en *P. americana* var. Zutano**

Se establecieron nueve tratamientos a partir de dos factores: rizobacterias promotoras del crecimiento (*B. subtilis*, *P. plecoglossicida* y Sin bacterias) y concentraciones de cloruro de sodio (agua de riego sin cloruro sódico, agua de riego con 0,75 g·L<sup>-1</sup> de cloruro sódico y agua de riego con 1,5 g·L<sup>-1</sup> de cloruro sódico). El ensayo se mantuvo durante 60 días con una frecuencia de riego de tres veces por semana y una dosis de 500 ml por planta aproximadamente.

#### **3.4.3. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistic Package for Social Sciences (SPSS) de la compañía IBM versión 24. Los datos obtenidos en cada experimento se sometieron al análisis de varianza mediante la prueba F y se compraron los tratamientos en caso de significancia mediante la prueba de Duncan, para determinar diferencias entre cepas. Se consideró significativa la probabilidad de error alfa menor de 5 por ciento.

### **3.5.EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE MICORRIZAS ARBUSCULARES SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. americana* VAR. ZUTANO BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO**

#### **3.5.1. Selección de micorrizas arbusculares**

Se emplearon las cepas de la colección pertenecientes a uno de los proyectos de investigación del Laboratorio de Biotecnología y Ecología Microbiana de la Universidad Nacional Agraria La Molina, estas cepas fueron aisladas de suelos salinos y ácidos procedentes de la costa y selva del Perú respectivamente. Las micorrizas fueron propagadas en *Brachiaria decumbens* como planta trampa y se prepararon inóculos de 1780 propágulos y 3780 esporas por 100 g aproximadamente. Se aplicaron 5 ml de inóculo preparado, respectivamente.

Las dos micorrizas que se utilizaron provienen de dos ecosistemas completamente diferentes, se trataron de consorcios micorrizicos nativos que se colectaron:

- a. Micorrizas arbusculares de selva: de los campos nativos y sin cultivo, abandonadas por pastoreo intensivo y con restos de cultivo de braquiaria, en la localidad de la ciudad de Pucallpa en Perú (13°36'31.8"S 76°09'02.7"W), de características ácidas, el suelo presentó un pH de 4.61, conductividad eléctrica (CE) de 0.11 dS.m<sup>-1</sup>, materia orgánica (MO) de 2.30 por ciento, con 12.1 mg kg<sup>-1</sup> de N inorgánico y 14.0 mg kg<sup>-1</sup> de P, con textura Franco Arenoso.
- b. Micorrizas arbusculares de costa: proveniente de los Humedales de la ciudad de Pisco en Perú (8°34'01.0"S 74°55'02.1"W) de características salinas sin cultivo, con la presencia exclusiva de grama salada, cuyo suelo presentó un pH de 7.3, conductividad eléctrica (CE) de 89.70 dS.m<sup>-1</sup>, materia orgánica (MO) de 2.76 por ciento, con 7.7 mg.kg<sup>-1</sup> de N inorgánico y 7.7 mg.kg<sup>-1</sup> de P, con textura arenosa.

### **3.5.2. Efecto de la inoculación con micorrizas arbusculares sobre la resistencia al estrés salino en *P. americana* var. Zutano**

Se establecieron siete tratamientos a partir de dos factores: micorrizas (a partir de aislamientos de suelos de costa y selva del Perú) y concentraciones de cloruro de sodio (agua de riego sin cloruro sódico, agua de riego con 0,75 g·L<sup>-1</sup> de cloruro sódico y agua de riego con 1,5 g·L<sup>-1</sup> de cloruro sódico). El ensayo se mantuvo durante 60 días con una frecuencia de riego de tres veces por semana y una dosis de 500 ml por planta.

### **3.5.3. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistic Package for Social Sciences (SPSS) de la compañía IBM versión 24. Los datos obtenidos en cada experimento se sometieron al análisis de varianza mediante la prueba F y se compraron los tratamientos en caso de significancia mediante la prueba de Duncan, para determinar diferencias entre cepas. Se consideró significativa la probabilidad de error alfa menor de 5 por ciento.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL ASOCIADAS AL CULTIVO DEL PALTO

#### 4.1.1. Recuento de *Pseudomonas* y *Bacillus*

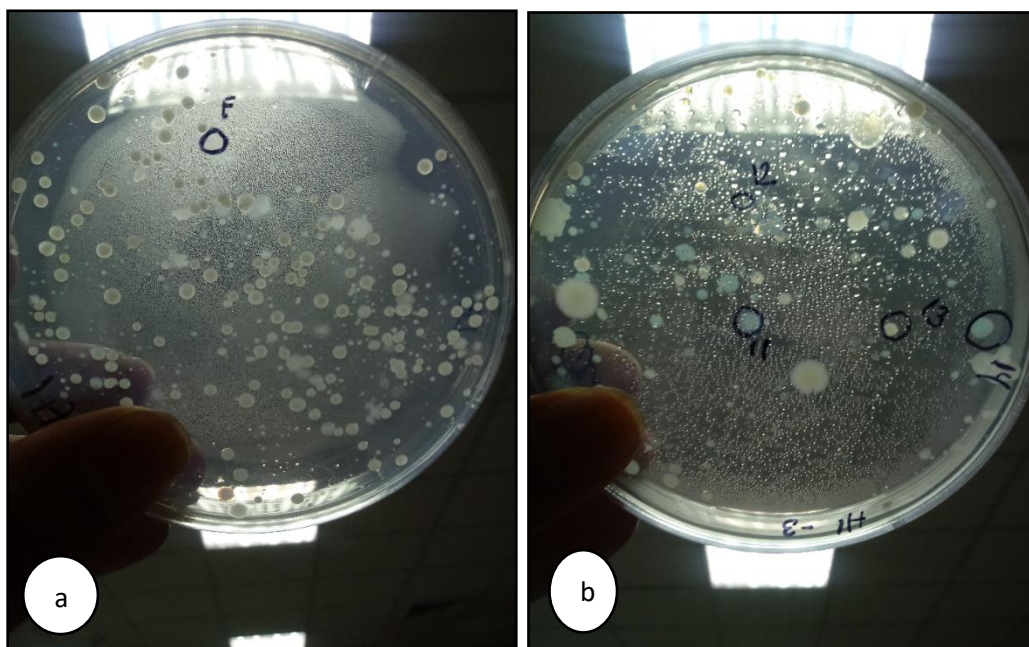
En el caso de *Pseudomonas*, los resultados se expresaron en NMP/g de suelo seco y el número de probables *Bacillus* (Tabla 1) en células/ml.

**Tabla 1. Recuento de bacterias aisladas de la rizosfera de palto**

Árbol	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>
A	11 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
B	11 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>5</sup>
C	24 x 10 <sup>4</sup>	3 x 10 <sup>5</sup>
D	24 x 10 <sup>4</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
E	11 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>

#### 4.1.2. Aislamiento de *Pseudomonas* y *Bacillus*

Para las probables *Pseudomonas*, de la diversidad de microorganismos que crecieron en agar cetrimida se seleccionó un grupo representativo con características morfológicas diferentes; mientras que para *Bacillus*, de la diversidad de microorganismos crecidos en el medio TGE se seleccionó un grupo representativo con características morfológicas diferentes, en ambos casos como se muestran las colonias crecidas y seleccionadas en la Figura 5.



a. *Bacillus* en TGE b. *Pseudomonas* en agar cetrimide

**Figura 5. Colonias crecidas en medios selectivos para el aislamiento**

#### 4.1.3. Conservación de las bacterias aisladas por congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

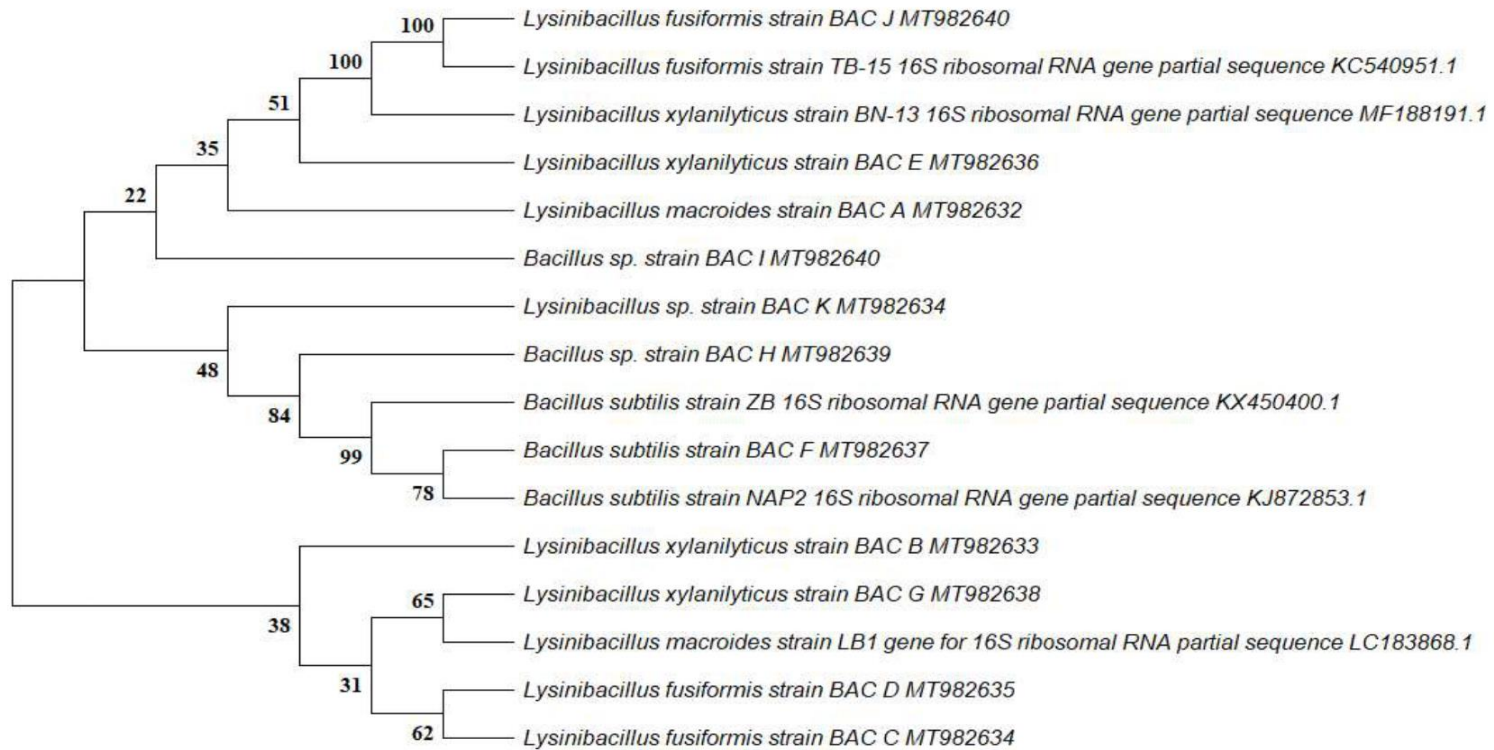
Se aislaron 26 cepas y se conservaron por duplicado mediante criopreservación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en la congeladora.

#### 4.1.4. Identificación molecular de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* asociadas a la rizósfera de palto

Las 26 cepas identificadas, presentaron bandas entre 1197 y 1863 pb en la amplificación del gen 16S ADNr. El análisis de la similitud entre las secuencias de los nucleótidos obtenidos y los depositados en la base de datos del GenBank usando el análisis BLAST, mostró que los aislamientos pertenecen a las familias *Pseudomonaceae* y *Bacillaceae*, y están relacionados con los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Lysinibacillus*, respectivamente. Entre la diversidad de PGPR destacan un amplio número de especies agrupadas en los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* (Berg 2009, Adhikari *et al.* 2013, Kamou *et al.* 2015) (Tabla 2, Figura 6 y 7).

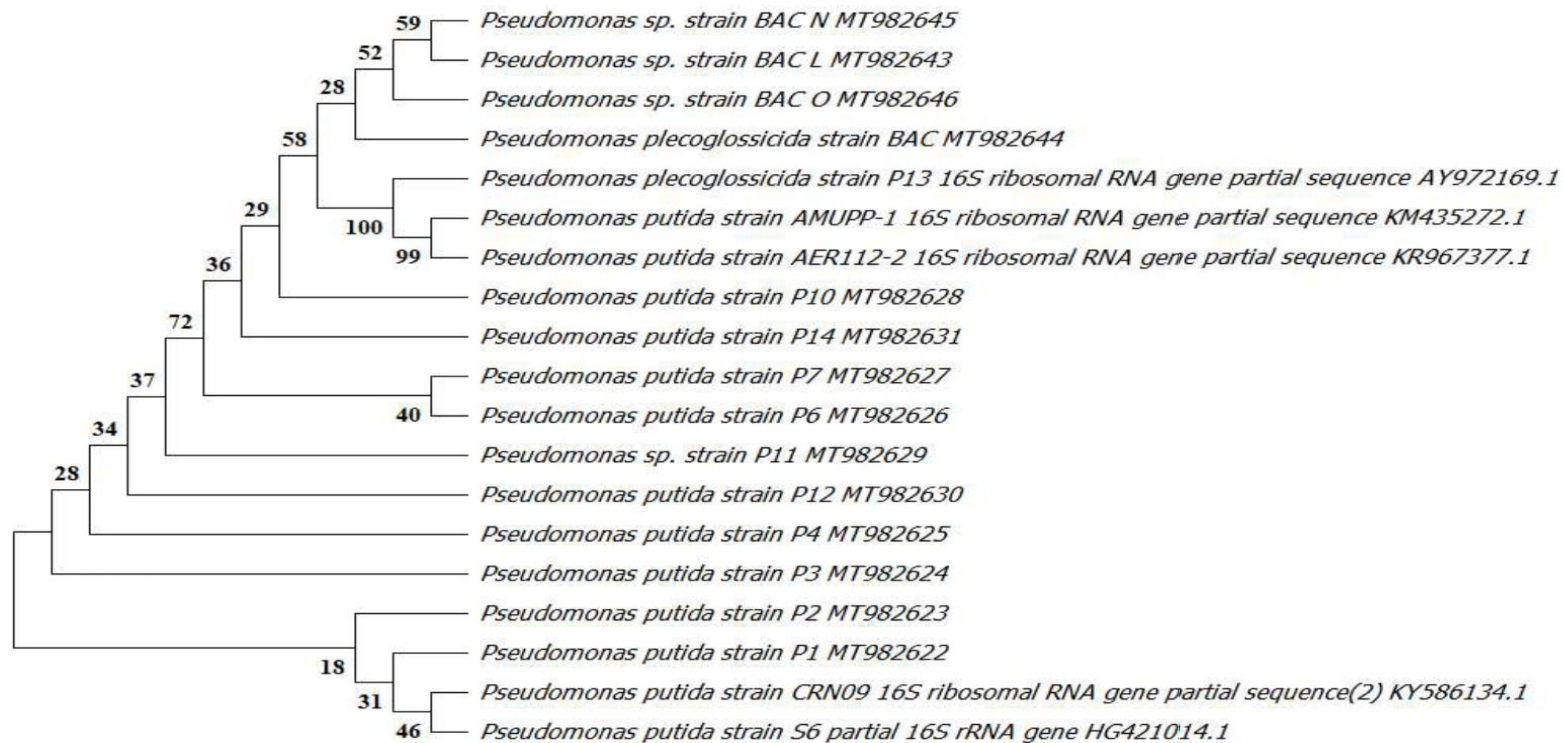
**Tabla 2. Identificación molecular de rizobacterias aisladas de *Persea americana***

Aislamiento	Identidad (BLAST NCBI)	Similitud (%)
P1	<i>Pseudomonas putida</i>	99
P2	<i>Pseudomonas putida</i>	99
P3	<i>Pseudomonas putida</i>	99
P4	<i>Pseudomonas putida</i>	99
P6	<i>Pseudomonas putida</i>	99
P7	<i>Pseudomonas putida</i>	99
P10	<i>Pseudomonas putida</i>	99
P11	<i>Pseudomonas sp.</i>	99
P12	<i>Pseudomonas putida</i>	99
P13	<i>Bacillus sp.</i>	99
P14	<i>Pseudomonas putida</i>	99
BAC A	<i>Lysinibacillus macroides</i>	99
BAC B	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	99
BAC C	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99
BAC D	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99
BAC E	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	99
BAC F	<i>Bacillus subtilis</i>	99
BAC G	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	99
BAC H	<i>Bacillus sp.</i>	99
BAC I	<i>Bacillus sp.</i>	99
BAC J	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99
BAC K	<i>Lysinibacillus sp.</i>	98
BAC L	<i>Pseudomonas sp.</i>	99
BAC M	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99
BAC N	<i>Pseudomonas sp.</i>	99
BAC O	<i>Pseudomonas sp.</i>	99



**Figura 6. Árbol filogenético construido según el Maximum Likelihood Method basado en la relación entre las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas de *Bacillus* aisladas de la rizosfera de la *P. americana* y especies relacionadas con *Bacillus*. Secuencias del gen ARNr 16S de la cepa de *B. subtilis* fue elegida arbitrariamente como secuencia externa al grupo**





**Figura 7.** Árbol filogenético construido según el Maximum Likelihood Method basado en la relación entre las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas de *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera de la *Perea americana* y especies relacionadas con *Pseudomonas*. Secuencias del gen ARNr 16S de la cepa de *P. putida* fue elegida arbitrariamente como secuencia externa al grupo

Existe una limitada literatura científica respecto a la rizosfera del palto, a pesar incluso de su importancia mundial y nacional. Los microorganismos del suelo pueden emplearse para el desarrollo de productos contra fitopatógenos de *P. americana*, como *P. cinnamomi* (Yang *et al.* 2001) y *Rosellinia necatrix* (Pliego *et al.* 2007), así como productos promotores del crecimiento del vegetal que permitan no sólo el manejo del patógeno sino también mejorar su capacidad adaptogénica frente a agentes estresores (Gil *et al.* 2014).

Se encontraron bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, que se reporta como promotor del crecimiento de *P. americana* (Yang *et al.* 2001; Pliego *et al.* 2007) que los mencionan además como los antagonistas más abundantes en las raíces del palto. En otros casos estas bacterias cuando son de procedencia endofítica o ajena a la zona del cultivo no han tenido el mismo resultado, probablemente este sería un punto importante a tener en cuenta al momento de seleccionar en una cepa foránea (Gutiérrez 2019).

También se encontraron bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, con conocida capacidad PGP como mencionan Carzola *et al.* (2007), que tienen acción enzimática y antibiótica contra hongos fitopatógenos, así también Guevara-Avenidaño *et al.* (2018) demostraron su capacidad para controlar a *Fusarium euwallaceae* y *Graphium* sp. También Méndez-Bravo *et al.* (2018) describieron los efectos de *Bacillus* contra *P. cinnamomi* a través de la producción de compuestos orgánicos volátiles.

En la costa central de Perú, en la zona de Casma, Mamani (2017), reportó mayor población de *Pseudomonas spp.* cuyos aislados de suelo muestran mayor efecto controlador sobre *P. cinnamomi* y como principal característica PGP es su inducción de mayor desarrollo radicular y también como reportaron López *et al.* (2007) su capacidad para incrementar el contenido de biomasa seca (en *Phaseolus vulgaris*), una característica comúnmente atribuida a varias rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) de cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*.

Sobre estos aislados identificados como *Bacillus* y *Pseudomonas* y con reportes previos de su actividad promotora se describe en los siguientes numerales un conjunto de ensayos para caracterizar y cuantificar sus propiedades sobre el palto.

#### 4.1.5. Actividades promotoras del crecimiento vegetal *in vitro* de bacterias rizosféricas de *P. americana* var. Zutano

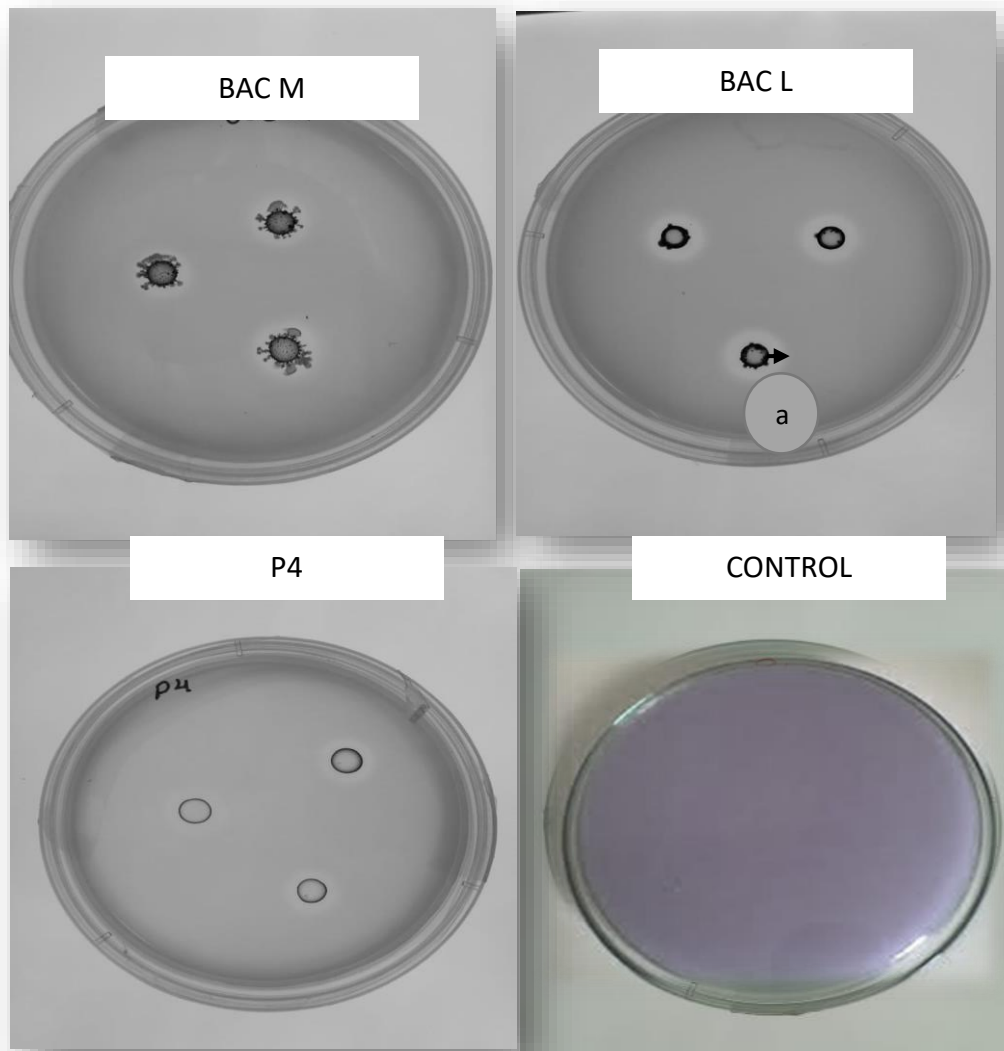
##### a. Determinación cualitativa de la capacidad solubilizadora de fosfatos

De 26 cepas aisladas, 12 cepas presentaron capacidad solubilizadora de fosfatos (46.15 por ciento); mientras que las 14 cepas restantes no presentaron halo de solubilización como indicador de actividad solubilizadora de fosfatos (P6, P7, P13, P14, BAC C, BAC K, BAC B, BAC A, BAC E, BAC F, BAC G, BAC H, BAC J y BAC D). De las 12 cepas con actividad solubilizadora de fosfatos, 4 cepas presentaron una eficiencia del 100 por ciento, 4 cepas eficiencias entre 100 por ciento y 200 por ciento y los 3 restantes eficiencias mayores al 200 por ciento, de las cuales una llegó incluso a 300 por ciento de halo de eficiencia, como se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 8.

**Tabla 3. Comparación de la eficiencia solubilizadora de fosfato tricálcico**

Cepa	Eficiencia de solubilización (%)
BAC I	100 a
P10	100 a
P12	100 a
P3	100 a
BAC N	117 a
BAC O	117 a
P11	183 b
P2	183 b
P1	200 bc
P4	233 cd
BAC M	266 de
BAC L	300 e

\*letras iguales corresponden a promedios estadísticamente iguales al 95 por ciento de confiabilidad según la Prueba de Duncan.

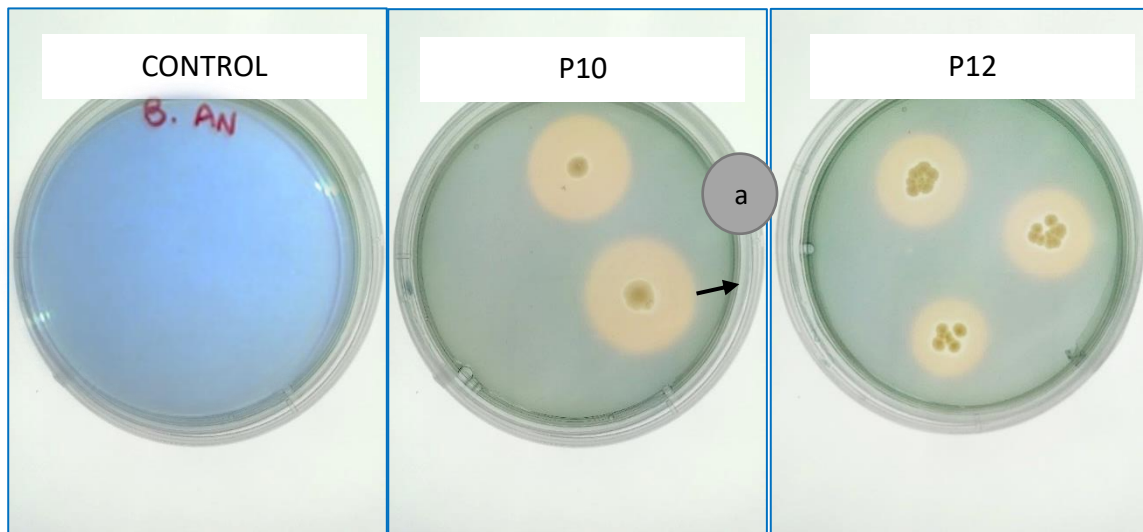


**Figura 8. Halo de cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato aisladas de la rizosfera de *P. americana* var. Zutano**

a. La flecha indica el halo desde la base de la colonia hasta el borde de pérdida de la coloración del medio original.

## b. Determinación cualitativa de la síntesis de sideróforos

De las 26 cepas ensayadas sólo dos dieron positivo a la prueba (Figura 9). Los resultados positivos se indican por el viraje de color de azul a amarillo alrededor del crecimiento bacteriano.



**Figura 9. Viraje de color de azul a amarillo alrededor del crecimiento bacteriano para las cepas P10 y P12**

a. La flecha indica el halo desde la base de la colonia hasta el borde de pérdida de la coloración del medio original.

**c. Efecto promotor de crecimiento vegetal *in vivo* de bacterias rizosféricas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* asociadas a *P. americana* var.**

**Zutano**

Se inocularon plántulas de palto de la variedad Zutano con las cepas seleccionadas en los numerales anteriores respecto a su capacidad biocontroladora y/o promotora del crecimiento vegetal *in vitro* con la finalidad de determinar su efecto estimulante sobre el palto (Figura 10 y 11); así fueron seleccionadas 10 bacterias de los 26 aislamientos iniciales (Tabla 4). Se empleó un diseño completo randomizado (DCR).

**Tabla 4. Rizobacterias de *P. americana* seleccionadas por su actividad antagónica**

Código interno	Identidad
P1	<i>Pseudomonas putida</i>
P3	<i>Pseudomonas putida</i>
P4	<i>Pseudomonas putida</i>
P6	<i>Pseudomonas putida</i>
P10	<i>Pseudomonas putida</i>
P11	<i>Pseudomonas sp.</i>
P12	<i>Pseudomonas putida</i>
BAC L	<i>Pseudomonas sp.</i>
BAC M	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>
BAC F	<i>Bacillus subtilis</i>



**Figura 10. Plántulas de *P. americana* var. Zutano inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**



**Figura 11. Plántulas de palto var. Zutano inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**



Se evaluó la altura de planta (cm), número de hojas, peso fresco de hojas (g), peso fresco de tallo (g), peso fresco de raíz (g), peso seco de raíz (g), peso seco de tallo (g), peso seco de hojas (g), clorofila (SPAD) y área foliar (cm<sup>2</sup>); en todos los casos se encontró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) mediante el análisis de variancia y el test de Duncan y los resultados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 5. Características agronómicas evaluadas en plántulas de *P. americana* var. *Zutano* tratadas con rizobacterias**

Tratamiento	Altura		Nº de hojas		Peso fresco de hojas		Peso fresco de tallo		Peso fresco de raíz		Peso seco de hojas		Peso seco de tallo		Peso seco de raíz		Contenido de clorofila		Área foliar	
Control	33.6	ab	7.1	abc	12.34	bcde	8.9	a	12.2	abc	2.5	de	1.4	a	1.9	ab	45.5	e	287.4	de
P1	39	abc	8.7	cd	9.1	abcd	8.3	a	11.5	ab	2.7	de	2.7	c	2.6	cd	42.9	de	311.8	de
P3	39.3	abc	8	bcd	9	abcd	8.4	a	10.2	a	2.2	bcd	1.9	ab	1.6	a	35.7	bc	256.5	bcd
P4	42	c	6.8	ab	8.2	abc	8	a	8.6	a	1.6	a	1.7	a	1.4	a	37.8	bcd	191.8	a
P6	40.5	bc	8	bcd	13.3	cde	9.5	a	17.6	cd	2.8	e	2	ab	2.4	bc	35.1	b	322.5	e
P10	37.7	abc	6	a	5.9	a	7	a	7.2	a	1.8	ab	1.8	a	1.7	ab	28.7	a	207.1	ab
P11	34.3	ab	6	a	8.4	abc	6.7	a	9	a	2.4	cde	1.8	a	1.9	ab	35.4	b	281.2	cde
P12	32.5	a	7	abc	7.8	ab	6.4	a	11.5	ab	2	abc	1.5	a	1.9	ab	39.9	bcd	231.2	abc
BacF	39.6	bc	9	d	16.5	e	13.4	b	20.8	d	4.3	g	3.2	c	3.3	d	41.9	de	507.6	g
BacL	36.2	abc	6.5	ab	14.5	e	8.3	a	16.4	bcd	2.6	de	1.9	ab	2.8	cd	40.8	cde	308.5	de
BacM	35	ab	8	bcd	13.5	de	13.1	b	11.8	ab	3.8	f	2.6	bc	2.8	cd	35.4	b	444.1	f

Los resultados se muestran en la Tabla 5 y en las Figuras 8 y 9, donde se puede apreciar que la altura de planta se ve mejorada respecto al control (33.6 cm) por el tratamiento P4 (42 cm) perteneciente a la especie *P. putida*. El contenido de clorofila medido en unidades SPAD resultó variante en los diversos tratamientos siendo el control y la cepa BAC F los que mayores contenidos presentaron, en otros tratamientos el contenido de clorofila disminuyó respecto al control lo que puede darnos indicios de efectos aún no muy claros respecto a la acción de las bacterias promotoras sobre esta característica. En algunos casos incluso por ejemplo considerado a la fertilización sintética supera a la inoculación con microorganismos promotores (Díaz *et al.* 2018).

En todos los demás casos, la cepa BAC F (*B. subtilis*) resultó superior en la mejora del crecimiento de las plantas sobre el tratamiento control sin inoculación, a saber; la biomasa aérea fresca (29.9 g BAC F > 21.24 g Control), peso fresco de hojas (16.5 g BAC F > 12.34 g Control), peso fresco de tallo (13.4 g BAC F > 8.9 g Control), peso fresco de raíz (20.8 g BAC F > 12.22 g Control), biomasa aérea seca (7.5 g BAC F > 3.9 g Control), peso seco de hojas (4.3 g BAC F > 2.5 g Control), peso seco de tallo (3.2 g BAC F > 1.4 g Control), peso seco de raíz (3.3 g BAC F > 1.9 g Control) e incrementó sustancialmente el área foliar (507.6 cm<sup>2</sup> BAC F > 287.4 cm<sup>2</sup> Control).

En la Tabla 6, se reportan los análisis de macronutrientes, en donde destacan los tratamientos bacterianos que permiten la acumulación de NPK pero que en el caso de elementos menores dentro de este grupo (Ca, Mg, S) las bacterias promotoras de crecimiento tienden a disminuir los niveles en el vegetal, probablemente porque son empleados por estos en la rizosfera como elementos importantes dentro de su metabolismo, lo que los pone en menor disponibilidad para el vegetal; aun así, este efecto tampoco es claro, la literatura reporta aumentos como disminución de estos elementos producto del tratamiento con microorganismos (Sahin *et al.* 2015, Karakurt y Aslantas 2010). La cepa BAC F presentó cierta estabilidad sobre la absorción de macronutrientes siendo igual al control o a la bacteria que permitió una mayor acumulación de nutrientes para cada caso.

**Tabla 6. Análisis de macronutrientes en plántulas de *P. americana* var. Zutano tratadas con rizobacterias**

TRATAMIENTO	N (mg/100g)	P (mg/100g)	K (mg/100g)	Ca (mg/100g)	Mg (mg/100g)	S (mg/100g)
P10	241.0 d	20.00 bc	160.0 ab	41.67 a	44.00 a	11.67 abc
P1	210.0 abcd	20.33 c	216.3 c	73.67 bc	66.33 abc	17.67 bcd
CONTROL	232.0 cd	20.00 bc	188.0 bc	93.00 c	79.67 c	16.33 bcd
BACL	201.7 abcd	16.33 abc	151.3 ab	73.00 bc	58.33 abc	20.00 d
BACF	224.0 bcd	15.67 ab	149.7 ab	77.00 bc	74.00 bc	18.67 cd
BACM	196.0 abcd	19.00 bc	179.0 abc	54.00 ab	56.33 abc	15.33 abcd
P 2	212.7 bcd	16.67 abc	159.7 ab	64.00 ab	49.00 ab	15.33 abcd
P12	162.3 a	16.00 abc	150.3 ab	56.67 ab	46.67 a	16.67 bcd
P3	176.3 ab	17.00 abc	137.7 ab	58.67 ab	46.00 a	11.33 ab
P4	213.0 bcd	19.00 bc	142.0 ab	60.67 ab	46.00 a	17.00 bcd
P6	190.3 abc	13.67 a	133.7 a	62.67 ab	55.00 abc	9.00 a

Nota: los análisis de nutrientes fueron evaluados a los 60 días después de la siembra

## **4.2.EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BACTERIAS PGR AISLADAS DE LA RIZOSFERA DEL PALTO SOBRE *P. cinnamomi* y *L. theobromae***

### **4.2.1. Actividad antagónica *in vitro* de *Pseudomonas spp.* y *Bacillus spp.* sobre *P. cinnamomi***

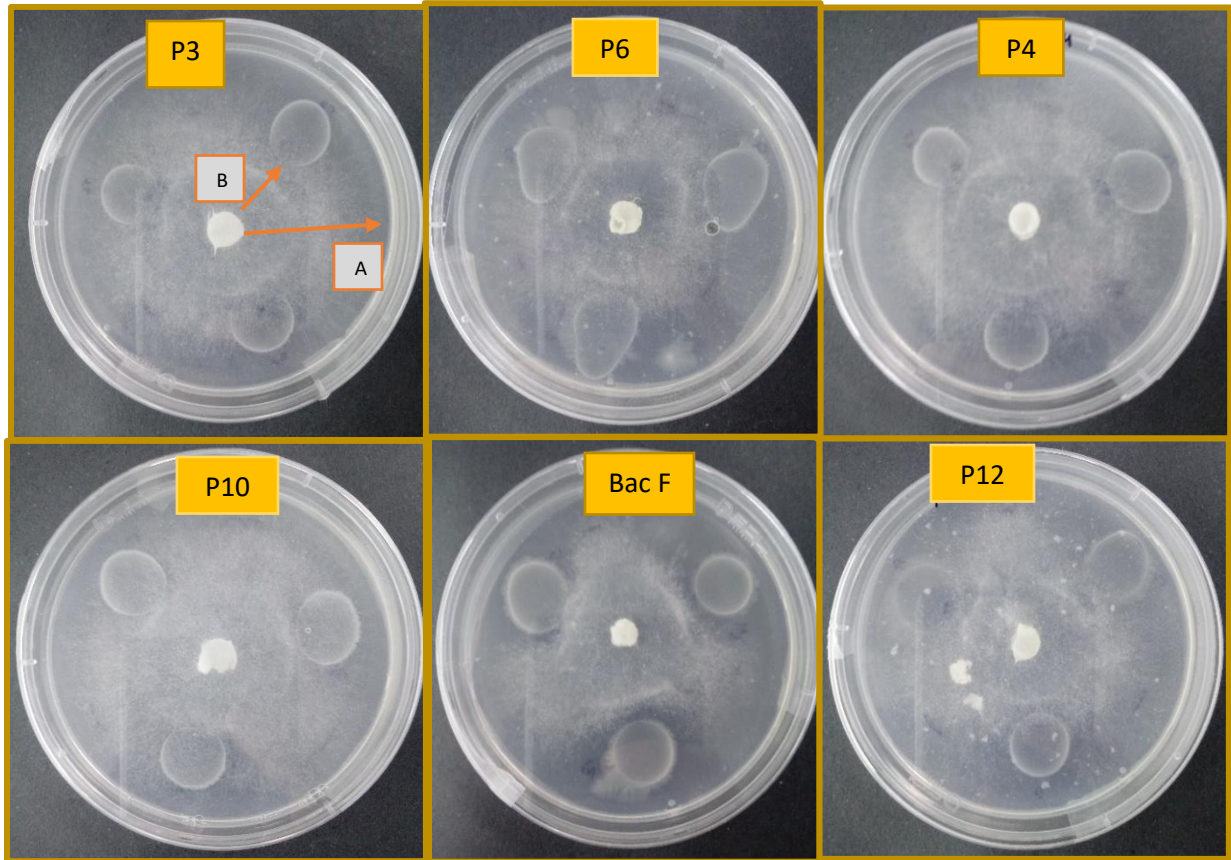
Se muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento a las 72 horas (Figura 12, Figura 13, Tabla 7). Como se aprecia de las 26 cepas aisladas, solo 18 presentaron esta actividad, lo que corresponde al 69.23 por ciento. Existe una amplia variabilidad que muestra porcentajes de inhibición desde el 18 por ciento hasta el 47 por ciento. Sobresalen las cepas que luego fueron identificadas como *Pseudomonas* con un mayor porcentaje con más del 45 por ciento del halo de inhibición (P4, P6 y P3), que como se menciona en la literatura científica producen sustancias fungicidas y compiten por el hierro con los hongos patógenos o lo vuelven inaccesible para este por lo que su control es eficiente. Sin embargo, luego de siete días el hongo colonizó casi todas las placas a excepción de Bac F cuya identidad corresponde a *B. subtilis* (Figura 13 y 14).

Este porcentaje de inhibición expresa el cociente del radio máximo de la colonia fúngica alejada de la colonia bacteriana entre el radio de la colonia fúngica enfrentada a la colonia bacteriana, por lo que representa la medida en que es capaz de reprimir el crecimiento del hongo (Figura 14 y 15). De esta manera porcentajes cercanos al 50% son un indicador de eficiencia considerable.

**Tabla 7. Porcentaje de inhibición de *P. cinnamomi* por bacterias aisladas de la rizosfera de palto**

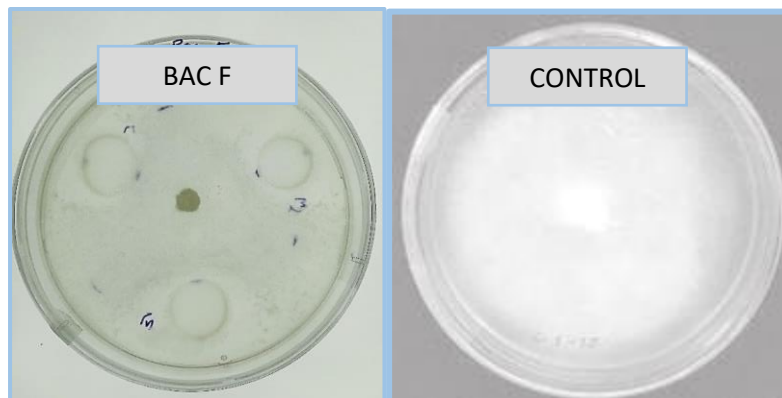
Cepa	Porcentaje de inhibición	
BacA	18.67	a
BacC	23.00	ab
Bacd	25.67	abc
BacM	26.00	abc
P14	31.33	abcd
BacJ	31.67	abcde
P7	33.33	abcde
BacL	36.00	bcde
P2	37.00	bcde
P13	39.00	cde
P1	39.67	cde
P11	40.67	cde
P12	41.00	cde
P10	43.00	de
BacF	45.00	de
P4	45.67	de
P6	46.00	de
P3	47.00	e

Para una confiabilidad al 95 por ciento y con un p-valor de 0.01 entre cepas.



**Figura 12. Halos de inhibición de bacterias rizosféricas de palto sobre *P. cinnamomi***

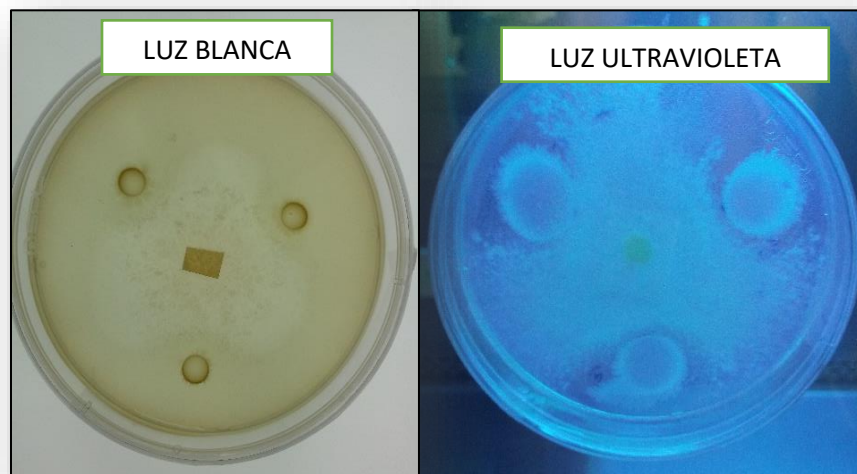
Nota: vista a los 3 días luego de inoculadas las bacterias sobre el hongo. A. Crecimiento del hongo sin interferencia de la bacteria. B. Crecimiento del hongo impedido por la bacteria, el cociente entre ambos expresa el porcentaje.



**Figura 13. *B. subtilis* enfrentado a *P. cynamommi* respecto al control**

Nota: vista a los 10 días luego de inoculada la bacteria sobre el hongo

La prueba de antagonismo también se realizó en agar jugo V8, las cepas bacterianas no crecieron lo suficiente como sí lo hicieron en agar maíz, de tal manera que sólo obtuvo un halo bien definido la cepa BAC F (*B. subtilis*), cuyo porcentaje de inhibición fue de 33.33 por ciento. Las cepas P10 (*P. putida*) y BAC L (*P. sp.*) muestran que sobre ellas no creció el micelio pero sí alrededor sin existir una muestra clara de antagonismo al no detener el crecimiento del micelio en un halo definido (Figura 16).



**Figura 14. *B. subtilis* enfrentado a *P. cinamommi***

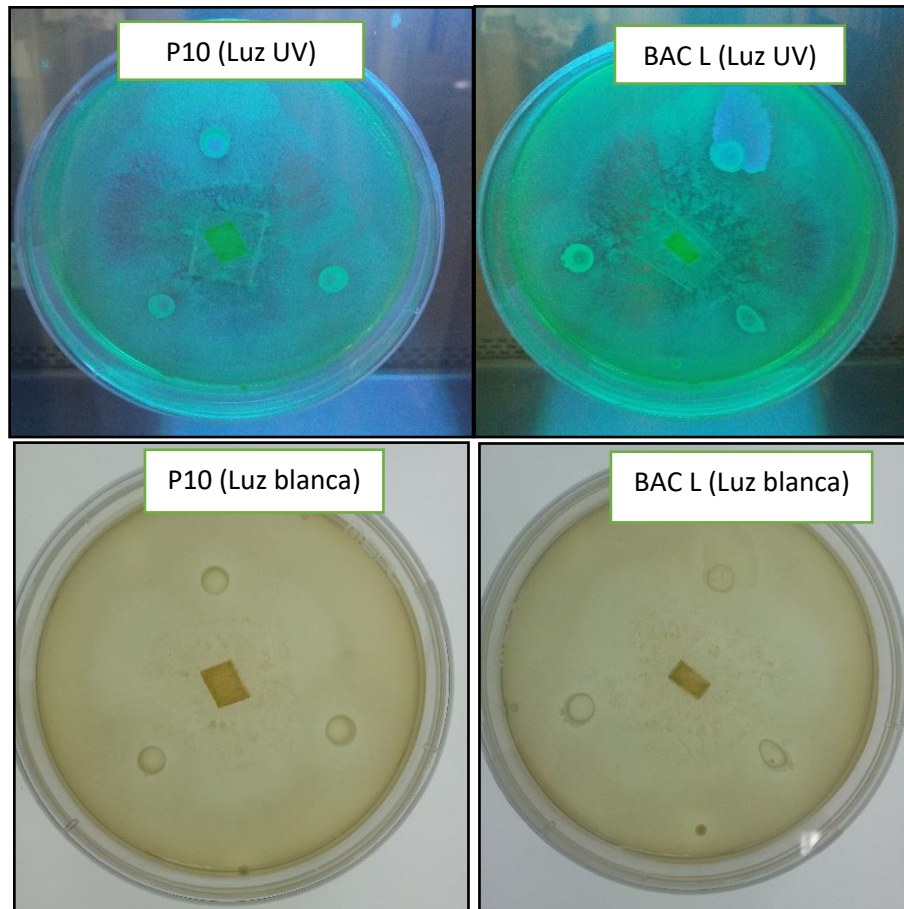
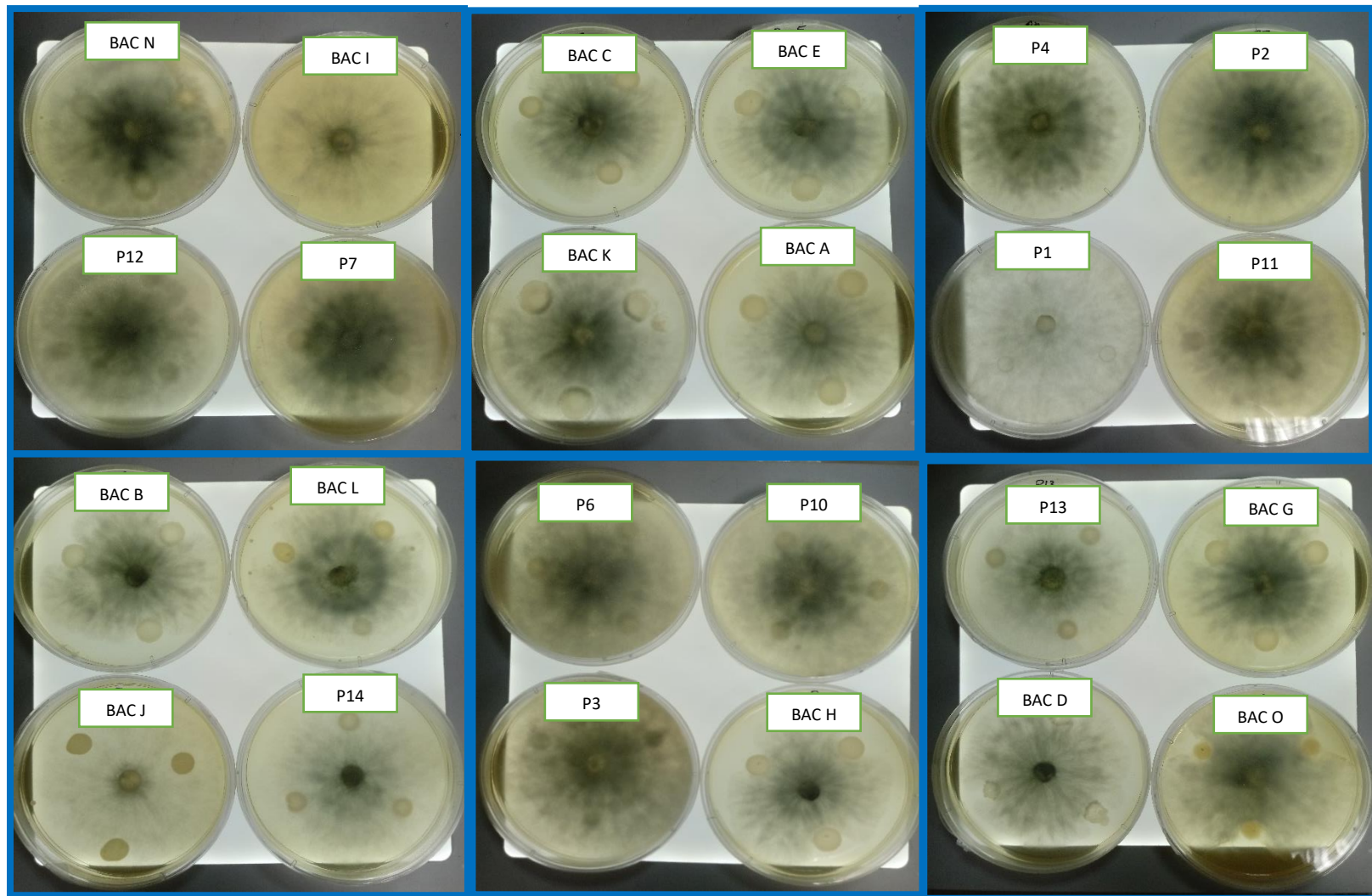


Figura 15. Halos de inhibición de bacterias rizosféricas de palto sobre *P. cinnamomi*

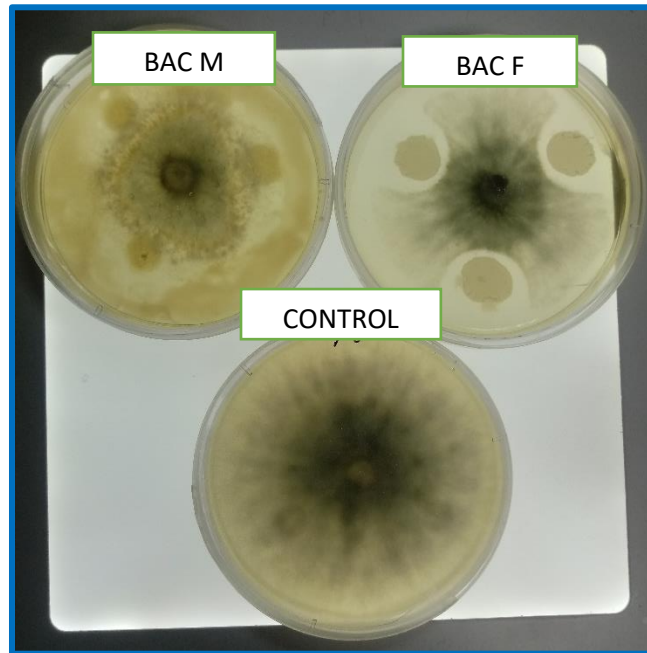
#### 4.2.2. Actividad antagónica *in vitro* de *Pseudomonas spp.* y *Bacillus spp.* sobre *L. theobromae*

De las 26 cepas aisladas sólo una mostró actividad, con un porcentaje de inhibición de 33.33 por ciento para *B. subtilis* (Bac F). La cepa BAC M (*P. plecoglossicida*) mostró detener el crecimiento del micelio también pero el efecto fue momentáneo pues a los 7 días se evaluaron ambas cepas y el hongo terminó por invadir a BAC M no así a BAC F que persiste en su actividad antagónica y toma una coloración rojiza (Figura 17 y 18).





**Figura 16. Bacterias rizosféricas de palto sobre *L. theobromae* sin efecto antagónico a los 3 días**



**Figura 17. Bacterias rizosféricas de palto sobre *L. theobromae* con efecto antagónico a los 3 días**



**Figura 18. *B. subtilis* aislado de la rizosfera de palto sobre *L. theobromae* con efecto antagónico a los 7 días**

En el Perú, el palto se ha establecido debido a sus excelentes condiciones en la costa, la selva y valles interandinos. Esta es una ventaja competitiva con el resto de los países productores puesto que permite colocar fruta al extranjero durante varios meses del año (Franciosi 1991). Sin embargo, este frutal es muy susceptible al ataque de *L. theobromae*, agente causal de la enfermedad denominada muerte regresiva que produce lesiones o canchales en las ramas con presencia de exudaciones blanquecinas y muerte descendente de ramas causando grandes pérdidas a los productores (Alama y Rodríguez 2006).

*L. theobromae* es un patógeno facultativo que infecta a las plantas penetrando a través de heridas y de tejidos en descomposición. Es frecuente la aparición del oomiceto en regiones tropicales y subtropicales, y en estas regiones se le ha mostrado como agente causal de enfermedades en 280 especies de plantas vasculares, entre las cuales destacan palto, algodón, cacao, café, caña de azúcar, caucho, mango, maní, pino, tabaco, etc. (Segura-Contreras *et al.* 2015). *L. theobromae*, se clasifica dentro de los Ascomycetos en el orden Botryosphaerales y en la familia Botryosphaeriaceae (Schoch *et al.* 2006; Slippers *et al.* 2013); presenta un estado sexual (teleomorfo), poco común conocido como *Botryosphaeria rhodina* (Phillips *et al.* 2008).

*Lasiodiplodia* se caracteriza por la presencia de picnidios y por estrías y picnidios que se aprecian en las conidias maduras. Las colonias cultivadas en medio de cultivo son densas con un micelio aéreo de color blanco inicialmente que luego se torna gris-olivo al cabo de 7 días y luego negro (García-Estrada *et al.* 2014). La temperatura para el crecimiento de *L. theobromae* está entre 28°C y 40°C, siendo la temperatura óptima 28°C (Picos *et al.* 2015). El inóculo es inicialmente conformado por picnidios aglomerados en partes momificadas y colgantes en las plantas. También son dispersadas por el viento, insectos, implementos de trabajo y el viento (Reyes y Capriles de Reyes 2000) por lo que como se aprecia se está ante la presencia de un patógeno difícil de manejar por los medios convencionales por lo que la evidencia de un microorganismo antagónico hasta este momento es importante para el desarrollo de los puntos siguientes.

#### **4.2.3. Actividad antagónica in vivo de *B. subtilis* sobre *P. cinnamomi* a nivel de invernadero**

Para el presente estudio *in vivo* se eligió a *P. cinnamomi*, que causa mayor daño en el cultivo de palto, esta enfermedad no discrimina la edad de la planta y se eligió al antagonista *B. subtilis* debido a su mayor eficacia y estabilidad *in vitro*. Los síntomas secundarios inician con un amarillamiento de las hojas y defoliación progresiva, dicha sintomatología puede desaparecer momentáneamente y luego reaparecer de forma más pronunciada. Las hojas jóvenes brotan más pequeñas de color verde claro y a veces acucharadas mostrando signos de estrés hídrico y decaimiento a pesar de que el riego no sea deficitario.

Los síntomas primarios se muestran en la raíz (Figura 19), ellas toman una coloración marrón oscura, quebradiza, de fácil desprendimiento del súber y según la severidad comienzan a mostrar síntomas visibles en la parte aérea (Yalle 1962, Ceja *et al.* 2000, Lara *et al.* 2011). Según la escala visual propuesta por Ramírez y Morales (2020) el tratamiento en el que se inoculó *B. subtilis*, no mostró síntomas de clorosis y el daño en la raíz es menor al 10 por ciento (Tabla 9). Por otro lado, se evaluaron parámetros de crecimiento de la raíz y la planta asociados a la sintomatología y daño provocado por *P. cinnamomi*, siendo *B. subtilis* una bacteria capaz de mejorar la respuesta del vegetal hacia el patógeno (Tabla 8).

Se encontró que *B. subtilis* (BAC F) tiene efecto antagónico sobre *P. cinnamomi*, los parámetros de crecimiento evaluados: peso seco de raíz, longitud de raíz, longitud de raíz/peso seco de raíz, número de hojas, peso fresco aéreo y peso seco aéreo de aquellos plantones a los que se le inoculó con *B. subtilis* mostraron ser similares estadísticamente en ausencia del hongo patógeno (Tabla 8). Para comprobar la colonización de *B. subtilis* se hizo una observación al microscopio (Figura 20).

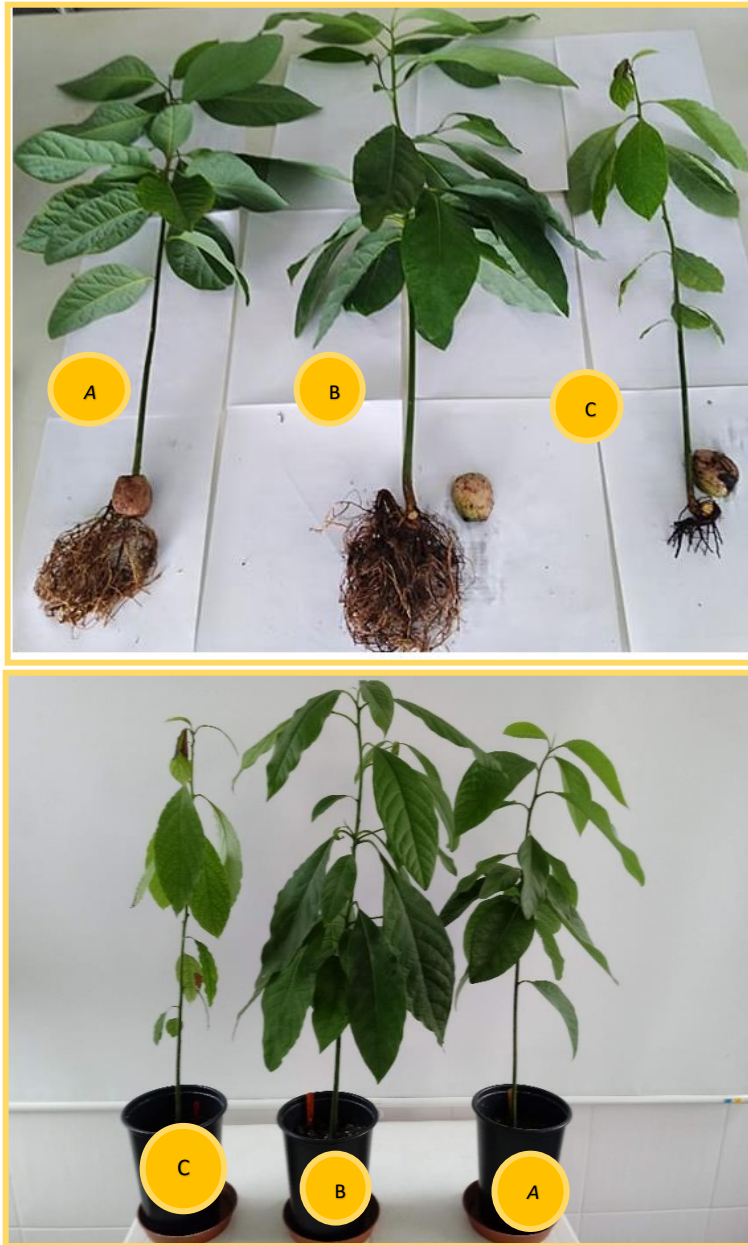
**Tabla 8. Parámetros de crecimiento evaluados en plántones de palto en respuesta a la infección por *P. cinnamomi***

Tratamiento	Peso fresco de raíz (g)	Peso seco de raíz (g)	Humedad relativa de la raíz (g)	Longitud de raíz (cm)	Longitud de raíz/peso seco de raíz	Número de hojas	Peso fresco aéreo (g)	Peso seco aéreo (g)
Control (sin inóculo)	21.9 c	4.60 b	17.3 b	27.2 b	5.97 ab	23.33 b	60.67 b	19.71 b
<i>P. cinnamomi</i>	10.41 a	2.11 a	8.29 a	14.8 a	7.63 b	19.00 a	39.71 a	13.64 a
<i>P. cinnamomi</i> + <i>B. subtilis</i>	15.08 b	4.57 b	10.5 a	21.4 ab	5.23 a	22.66 b	61.37 b	26.36 b

\*Las letras iguales junto a los valores indican que no existe diferencia estadística significativa (Duncan P=0.05)

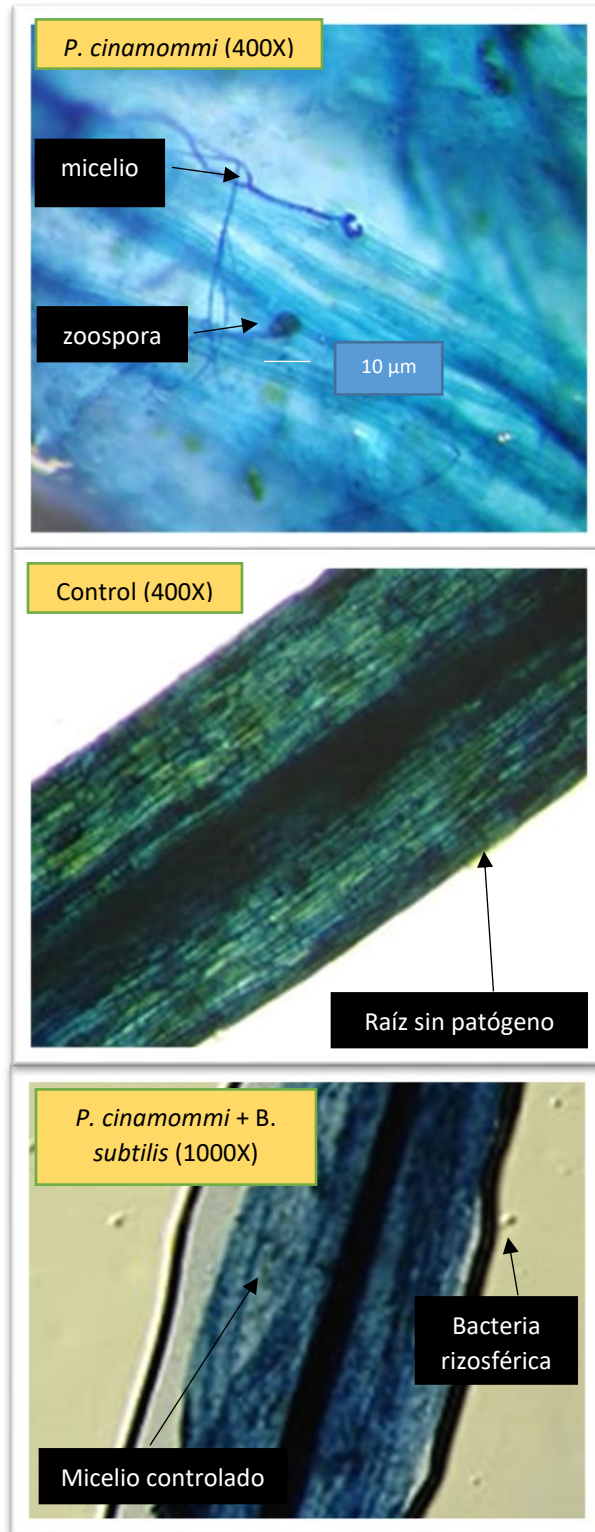
**Tabla 9. Escala de severidad de la enfermedad por *P. cinnamomi* en palto evaluado en condiciones de invernadero**

Tratamiento	Valor de la escala	Aparición del brote y síntomas de la enfermedad	Apariencia de raíces
Control (sin <i>P. cinnamomi</i> )	0	Plantas sanas con abundante follaje de color verde oscuro y brotes foliares en crecimiento activo. Sin síntomas de enfermedad	> 90% de raicillas viables.
<i>P. cinnamomi</i>	3	clorosis generalizada, marchitez y defoliación.	Raicillas enfermas > 70.1%.
<i>P. cinnamomi</i> + <i>B. subtilis</i>	0	Plantas sanas con abundante follaje de color verde oscuro y brotes foliares en crecimiento activo. Sin síntomas de enfermedad	> 90% de raicillas viables.



**Figura 19. Efecto antagónico de *B. subtilis* sobre *P. cinnamomi* en plantones de palto**

Nota: A. *B. subtilis* + *P. cinnamomi*, B. Control sin bacteria y sin patógeno, C. Sólo *P. cinnamomi*



**Fig. 20. Estructuras fúngicas en raíces teñidas con azul de tripan por tratamiento (1000X)**



Bender *et al.* (2012) señalan que ‘Zutano’ es un híbrido de Guatemalteco x Mexicano (con mayores rasgos Mexicanos), seleccionado en California por W. L. Ruitt en el año 1926. Es un vigoroso árbol con rojas lenticelas en los brotes, de fruto periforme y oval que pesa alrededor de 200 a 400 g y corta vida en el árbol cuando madura. Su exocarpo es brillante y liso, debajo de la pulpa acuosa se encuentra una semilla grande y cónica. Tiene mayor resistencia a las heladas (hasta los 3.3 °C) debido a su linaje mexicano, moderada susceptibilidad a la pudrición de la raíz causada por *P. cinnamomi*, y soportar condiciones salinas (Newett *et al.* 2002).

Los resultados de esta investigación evidenciaron efecto de *Bacillus* y *Pseudomonas* antagonistas de *P. cinnamomi* y *L. theobromae*, en la rizosfera de *P. americana* que crecen en zonas de cultivo en la costa norte del Perú. En otros estudios las inhibiciones de crecimiento informadas en palto son similares a los obtenidos aquí, que van desde 18 por ciento a 48 por ciento cuando se empleó *Pseudomonas* (Martínez 2010, Mamani 2017); respecto a *Bacillus* spp., se menciona que también tiene efecto antagonista *in vitro* sobre *P. cinnamomi* (Ramírez *et al.* 2015) y ha sido observado en otros cultivos como la papa, con mayor detalle, sobre *R. solanii* (Calvo *et al.* 2010), entre otros hongos fitopatógenos (Ongena *et al.* 2005).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la inhibición de hongos patógenos por *Bacillus* spp., incluyendo producción de antimicrobianos, secreción de enzimas hidrolíticas, competencia por nutrientes o una combinación de mecanismos (Silva *et al.* 2014, Ongena 1995); dado que puede estar involucrado más de un mecanismo se puede esperar entonces una respuesta compleja con una gama de efectos antagónicos para cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*.

*Bacillus* spp. puede presentar diferentes mecanismos de acción sobre los fitopatógenos, como la competencia (por espacio y nutrientes), la síntesis de compuestos volátiles y, principalmente, la síntesis de sustancias antimicrobianas (antibiosis) (Silva *et al.* 2014). Respecto a *B. subtilis*, se conoce que disminuye la susceptibilidad de la planta a los patógenos fúngicos al aumentar la resistencia del huésped asociada con la expresión diferencial de genes (Ongena 1995) y ha presentado antagonismo hacia *P. cinnamomi* en palto debido a la producción de sideróforos o antibióticos para la supresión de *P. cinnamomi*, como se muestra en esta investigación; adicionalmente también favorece el crecimiento de las plantas (Tabla 8), por mecanismos como la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y otros nutrientes (Ramírez *et al.* 2013).

Por otro lado, el género *Pseudomonas*, es conocido por la amplia gama de productos metabólicos bioactivos secundarios que produce, como agentes promotores del crecimiento de las plantas, lipopéptidos cíclicos y biosurfactantes con actividad antimicrobiana contra diversos patógenos de plantas, además de enzimas como las glucanasas que incrementa su potencial biológico antipatógeno. *P. putida* en particular, ha demostrado ser un poderoso biocontrolador (El-Sayed *et al.* 2018).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal utilizados para prevenir o disminuir efectos de enfermedades en plantas de interés comercial, es eficaz, ya que se logra ver una disminución de los síntomas causados por el patógeno (Tabla 8 y 9, Figura 20). Como lo han mostrado otros estudios con vistas a aislar cepas bacterianas que son capaces de inhibir el crecimiento de *P. cinamomi* o que están asociadas con su supresión y han mostrado resultados prometedores, donde de igual manera se han identificado *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., como posibles candidatos para el control biológico de la pudrición de la raíz causado por *Phytophthora* spp. (Méndez *et al.* 2018). A futuro esta técnica podría representar una alternativa más amigable con el ambiente que el uso de agroquímicos comerciales para el control de enfermedades y el desarrollo de plántones de palto en invernadero que garanticen el éxito una vez trasplantados en campo definitivo.

*Bacillus* y *Pseudomonas* han sido ampliamente documentadas para mejorar el crecimiento de las plantas en varios estudios, a través de su producción de sideróforos (Gupta *et al.* 2015), su producción o señalización de fitohormonas (Zamioudis *et al.* 2013), su capacidad para solubilizar fosfato y fijar nitrógeno (Singh *et al.* 2015) o sus actividades antimicrobianas (Sarbadhikary *et al.* 2017).

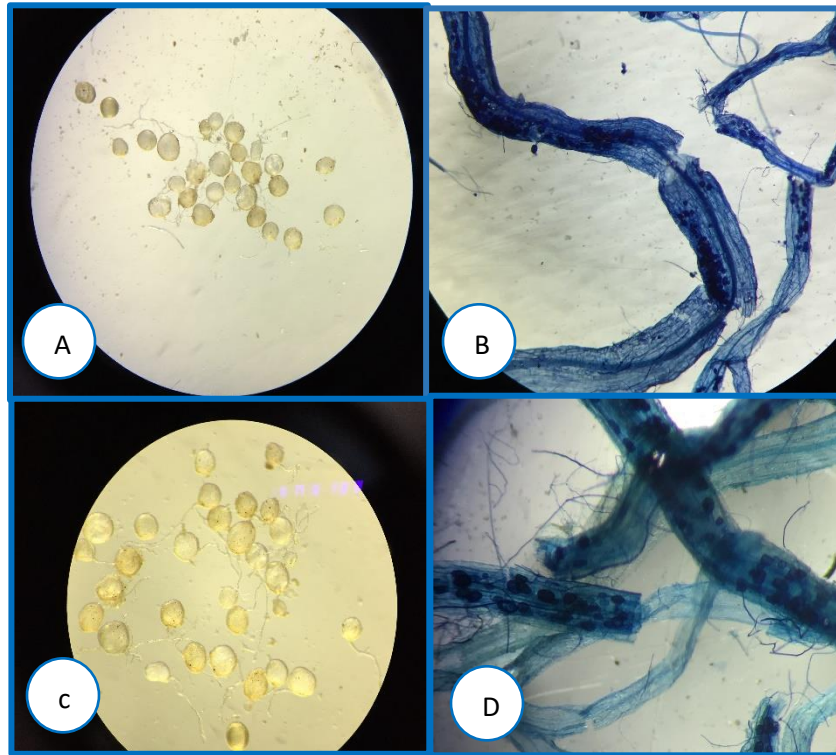
#### 4.3.EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CO-INOCULACIÓN BACTERIA-MICORRIZA SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTONES DE PALTO VAR. ZUTANO BAJO CONDICIONES DE INFECCIÓN CON *P. cinnamomi*

Aunque existen reportes de la actividad antipatogénica de micorrizas y bacterias, así como de la interacción bacteria-micorrizas no hay reportes sobre su co-inoculación para el tratamiento de pudriciones radiculares en los cultivos, en especial el palto. Por ello la presente investigación se planteó evaluar la estrategia de co-inoculación bacteria-micorriza en la resistencia a *P. cinnamomi* en palto del portainjerto var. Zutano.

Se ensayaron dos factores: Micorrizas (sin micorrizas, micorriza de costa y micorriza de selva) y Bacterias PGP con actividad antagónica *in vitro* sobre *P. cinnamomi* (sin bacterias, *B. subtilis* Bac F, *P. putida* P3), en tres niveles cada factor (Tabla 10) con un total de seis réplicas. Primero se inocularon las micorrizas arbusculares, se emplearon dos tipos de micorrizas procedentes de: Suelo salino de costa (*G. intrarradices*) y de suelo de selva (Consortio) (Figura 20), y se inocularon a una dosis de 2000 esporas por maceta.

**Tabla 10. Tratamientos según la combinación de los niveles de los factores micorrizas y bacterias ensayadas**

Micorrizas	Bacterias	CÓDIGO
Sin micorrizas	Sin bacterias	T1
Sin micorrizas	<i>Bacillus subtilis</i>	T2
Sin micorrizas	<i>Pseudomonas putida</i>	T3
Micorriza de costa	Sin bacterias	T4
Micorriza de costa	<i>Bacillus subtilis</i>	T5
Micorriza de costa	<i>Pseudomonas putida</i>	T6
Micorriza de selva	Sin bacterias	T7
Micorriza de selva	<i>Bacillus subtilis</i>	T8
Micorriza de selva	<i>Pseudomonas putida</i>	T9



**Figura 20. Raíces micorrizadas y esporas de micorrizas A y B. Micorriza de costa (*G. intrarradices*) C y D. Micorriza de selva (consorcio)**

#### **4.3.1. Efecto de la co-inoculación bacteria-micorrizas en parámetros de crecimiento de plántones de *P. americana* var. Zutano infectadas con *P. cinnamomi***

##### **Análisis de los efectos principales de los factores micorrizas y bacterias antagonistas**

Las micorrizas muestran actividad general sobre la longitud de la raíz del palto y la relación longitud de raíz por peso seco de raíz que muestra una mayor eficiencia radicular al generar mayor superficie de exploración respecto a la biomasa generada. Sobre otros parámetros de crecimiento no muestra actividad. Por otro lado, las bacterias *B. subtilis* y *P. putida* sí promueven el crecimiento vegetal afectando positivamente parámetros como la altura de planta, longitud de raíz, número de hojas, biomasa fresca y seca, así como la humedad de la raíz, en especial destaca *B. subtilis* (Tabla 12).

##### **Efecto de la co-inoculación bacteria-micorrizas**

La presencia de micorrizas disminuye la altura de plantas co-inoculadas con bacterias antagonistas *P. putida* y *B. subtilis* (Figura 23). Existe un efecto sinérgico positivo entre las micorrizas de selva y *B. subtilis* sobre la mejora de la longitud de raíz (Figura 25); lo mismo se aprecia cuando se inoculan en conjunto micorrizas de costa y *B. subtilis* sobre el número de hojas. La biomasa acumulada fresca y seca es otra característica que no se ve favorecida por la co-inoculación bacteria y micorrizas, *P. putida* muestra mayor actividad en la ganancia de biomasa aérea; mientras que *B. subtilis* en ausencia de micorrizas tiene amplia actividad sobre el crecimiento de los plántones de palto en especial la acumulación de biomasa (Figura 24) (Tabla 13).

Respecto al daño por *P. cinnamomi*, los parámetros indirectos como peso fresco y seco son indicadores de vigor y morfología de raíz asociados al daño del patógeno en cuyo caso la presencia de *P. putida* y *B. subtilis* incrementan la biomasa radicular fresca y seca independientemente de la asociación con micorrizas arbusculares. De igual manera, el cociente longitud de raíz entre el peso seco de raíz indica mayor producción de raíces secundarias por acumulación de materia seca, por lo que mientras más alto es el cociente mayor es la atenuación del daño ante el patógeno, lo que se demostró con el uso conjunto de micorrizas de costa y *B. subtilis* que obtuvieron el mayor índice con 15.39 superando a los demás tratamientos; además según la escala de severidad cualitativa la presencia de bacterias promotoras de crecimiento y micorrizas muestran aminorar el daño; por lo que se concluye que la co-inoculación de bacterias promotoras y micorrizas arbusculares promueven el crecimiento en plántones de *P. americana* infectados con *P. cinnamomi* (Tabla 13).

La severidad de la infección de *P. cinnamomi* en plántones de palto previamente inoculados con las cepas de *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*, fue determinada mediante la escala visual propuesta por Ramírez y Morales (2020), basada en síntomas externos y validada con la cantidad de inóculo mediante análisis de regresión. Se aprecia que la severidad disminuye tras la aplicación de bacterias promotoras de crecimiento y es mucho menor en compañía de las micorrizas arbusculares por lo que una aplicación conjunta es beneficiosa para el palto en términos de progresión de la enfermedad.

**Tabla 11. Análisis multivariante factorial del efecto de la co-inoculación bacteria-micorrizas en parámetros de crecimiento de plántones de *P. americana* var. *Zutano* infectadas con *P. cinnamomi***

FUENTE	VARIABLE	SC	GL	CM	FC	P-VALOR
Micorrizas	Altura de planta (cm)	2331,20	2	1165,60	8,17	,001
	Longitud de raíz (cm)	844,13	2	422,06	22,76	,000
	Número de hojas	392,14	2	196,07	4,11	,023
	Biomasa aérea fresca (g)	1984,66	2	992,33	4,06	,024
	<b>Biomasa aérea seca (g)</b>	413,62	2	206,81	2,96	<b>,062</b>
	Biomasa radicular fresca (g)	347,30	2	173,65	3,28	,047
	<b>Biomasa radicular seca (g)</b>	75,35	2	37,67	2,73	<b>,076</b>
	Humedad de raíz (g)	114,96	2	57,48	4,20	,021
Longitud peso seco raíz (g)	192,92	2	96,46	15,35	,000	
Bacterias	Altura de planta (cm)	2177,29	2	1088,64	7,63	,001
	Longitud de raíz (cm)	1424,61	2	712,30	38,41	,000
	Número de hojas	1193,03	2	596,51	12,51	,000
	Biomasa aérea fresca (g)	13239,10	2	6619,55	27,08	,000
	Biomasa aérea seca (g)	3941,24	2	1970,62	28,24	,000
	Biomasa radicular fresca (g)	884,92	2	442,46	8,36	,001
	Biomasa radicular seca (g)	131,32	2	65,66	4,76	,013
	Humedad de raíz (g)	321,21	2	160,60	11,73	,000
Longitud peso seco raíz (g)	188,14	2	94,07	14,97	,000	
Micorrizas * Bacterias	Altura de planta (cm)	2481,13	4	620,28	4,35	,005
	Longitud de raíz (cm)	1093,01	4	273,25	14,73	,000
	Número de hojas	843,85	4	210,96	4,42	,004
	Biomasa aérea fresca (g)	8532,85	4	2133,21	8,72	,000
	<b>Biomasa aérea seca (g)</b>	1902,42	4	475,60	6,81	,000
	Biomasa radicular fresca (g)	1579,03	4	394,75	7,46	,000
	<b>Biomasa radicular seca (g)</b>	317,87	4	79,46	5,76	,001

<<Continuación>>

	Humedad de raíz (g)	458,78	4	114,697	8,38	,000
	Longitud peso seco raíz (g)	472,66	4	118,165	18,80	,000
	Altura de planta (cm)	6414,813	45	142,551		
	Longitud de raíz (cm)	834,320	45	18,540		
	Número de hojas	2145,333	45	47,674		
	Biomasa aerea fresca (g)	10998,885	45	244,420		
Error	Biomasa aerea seca (g)	3139,145	45	69,759		
	Biomasa radicular fresca (g)	2380,838	45	52,908		
	Biomasa radicular seca (g)	620,342	45	13,785		
	Humedad de raíz (g)	615,910	45	13,687		
	Longitud peso seco raíz (g)	282,745	45	6,283		
	Altura de planta (cm)	13404,45	53			
	Longitud de raíz (cm)	4196,09	53			
	Número de hojas	4574,37	53			
	Biomasa aerea fresca (g)	34755,50	53			
Total	Biomasa aerea seca (g)	9396,44	53			
	Biomasa radicular fresca (g)	5192,10	53			
	Biomasa radicular seca (g)	1144,89	53			
	Humedad de raíz (g)	1510,88	53			
	Longitud peso seco raíz (g)	1136,47	53			

\*características resaltadas en rojo indican valores no significativos o que no existe diferencias entre tratamientos para las características evaluadas al 95 por ciento de confiabilidad.



**Tabla 12. Efectos principales de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la resistencia a *P. cinnamomi* en plántulas de *P. americana* var. Zutano**

Efectos principales	Altura de planta (cm)	Longitud de raíz (cm)	Nº de hojas	Biomasa aérea fresca (g)	Biomasa aérea seca (g)	Biomasa radicular fresca	Biomasa radicular seca (g)	Humedad de raíz (g)	Longitud raíz /peso seco de raíz
Micorrizas de costa	50.98 a	23.65 b	19.55 a	49.62 a	22.96 a	13.56 a	5.20 a	8.35 a	6.87 b
Micorrizas de selva	55.68 a	16.28 a	25.89 b	59.39 ab	24.6 a	14.22 a	5.47 a	8.75 a	3.12 a
Sin micorrizas	66.66 b	14.53 a	24.33 b	64.19 b	29.48 a	19.23 b	7.83 a	11.62 b	2.65 a
<i>B. subtilis</i>	59.62 b	25.18 c	27.77 b	62.66 b	29.26 b	18.95 b	7.78 b	11.17 b	6.82 b
<i>P. aureginosa</i>	64.46 b	16.21 b	25.22 b	73.97 c	33.88 b	18.09 b	6.66 a	11.43 b	2.56 a
Sin bacteria	49.24 a	13.06 a	16.77 a	36.58 a	13.89 a	9.96 a	4.06 a	6.13 a	3.25 a

**Tabla 13. Efecto de la co-inoculación bacteria-micorrizas en parámetros de crecimiento de plantones de *P. americana* var. Zutano infectadas con *P. cinnamomi***

Tratamiento	altura de planta (cm)	Longitud de raíz (cm)	Nº de hojas	Biomasa aerea fresca (g)	Biomasa aerea seca (g)	Biomasa radicular fresca	Biomasa radicular seca (g)	Humedad de raíz (g)	longitud raíz /peso seco de raíz
Micorrizas de costa / <i>B. subtilis</i>	45.10 a	39.33 d	16.66 ab	31.57 a	16.59 ab	9.13 a	3.18 a	5.94 ab	15.39 b
Micorrizas de costa / <i>P. aueaginososa</i>	61.70 cd	18.76 c	24.66 bc	72.42 b	33.49 cd	21.09 b	7.92 a	13.16 d	2.34 a
Micorrizas de costa / sin bacteria	51.16 abc	12.86 ab	17.33 ab	44.88 a	18.82 ab	10.45 a	4.50 a	5.95 ab	2.89 a
Micorrizas de selva / <i>B. subtilis</i>	64.70 cd	18.03 bc	35.66 d	82.20 b	35.71 cd	15.05 ab	6.18 a	8.87 abcd	2.98 a
Micorrizas de selva / <i>P. aureaginososa</i>	57.20 bc	15.10 abc	24.00 bc	66.03 b	26.71 bc	16.00 ab	5.76 a	10.24 bcd	2.80 a
Micorrizas de selva /sin bacteria	45.13 ab	15.70 abc	18.00 ab	29.95 a	11.37 a	11.59 a	4.45 a	7.14 abc	3.57 a
Sin micorrizas / <i>B. subtilis</i>	74.06 d	18.20 bc	31.00 cd	74.21 b	35.48 cd	32.66 c	13.97 b	18.69 e	2.09 a
Sin micorrizas / <i>P. aureaginososa</i>	74.5 d	14.76 abc	27.00 c	83.47 b	41.45 d	17.19 ab	6.31 a	10.88 cd	2.56 a
Sin micorrizas / sin bacteria	51.43 abc	10.63 a	15.00 a	34.91 a	11.50 a	7.85 a	3.22 a	5.30 a	3.30

\*Promedios unidos por la misma letra son estadísticamente similares según la prueba de Duncan al 95% de confiabilidad.

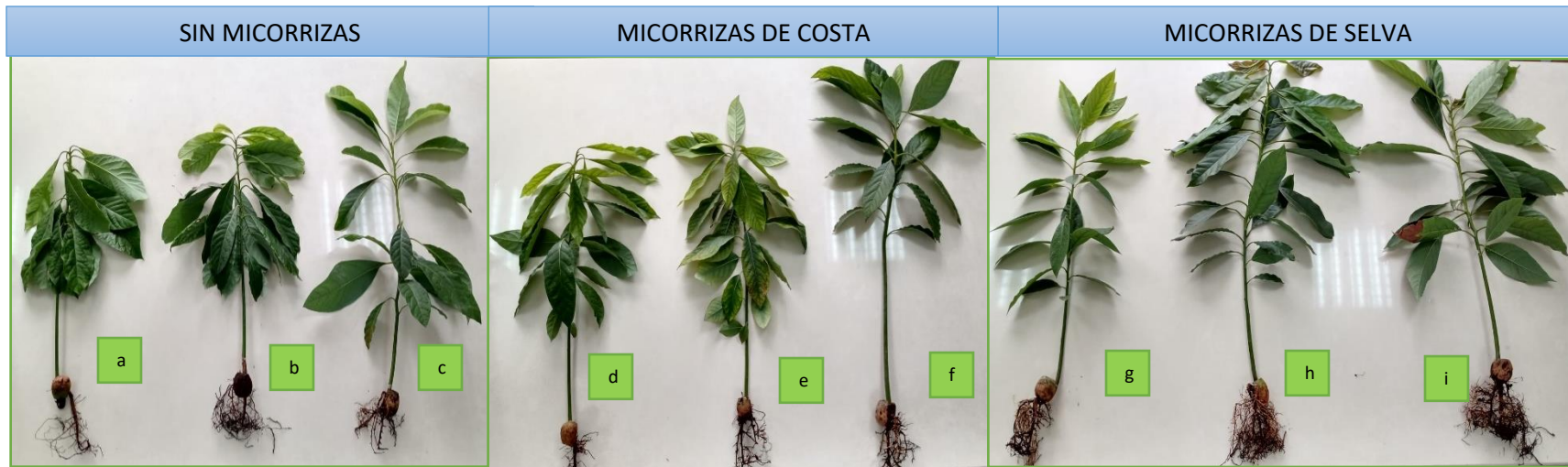
Según se aprecia en la Figura 21, La presencia de micorrizas mejora la apariencia de las plantas, volviéndolas más vigorosas a pesar de estar infectadas por *P. cinnamomi* y sin síntomas de decaimiento, entre ambos tipos inoculados, el consorcio de micorrizas de selva tiene influencia en la resistencia ante el patógeno y ante la presencia de las bacterias PGP ambas resultan con efecto estimulante a diferencia del tratamiento que no recibió bacterias benéficas. Sin embargo, la respuesta no fue muy uniforme entre plantas, por lo que la altura de planta no necesariamente corresponde en proporción directa con la biomasa seca y características de crecimiento de la raíz (Tabla 13).



a. Sin micorrizas + sin bacteria, b. sin micorrizas + *B. subtilis*, c. sin micorrizas + *P. putida*, d. Micorrizas de costa + sin bacteria, e. Micorrizas de costa + *B. subtilis*, f. Micorrizas de costa + *P. putida*, g. Micorrizas de costa + sin bacteria, h. Micorrizas de costa + *B. subtilis*, i. Micorrizas de costa + *P. putida*.

**Figura 21. Efecto de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la resistencia a *P. cinnamomi* en plántones de *P. americana* var. Zutano.**

La estructura radicular de los plantones de palto afectadas por *P. cinnamomi* se ve menos comprometida por el hongo (Figura 21) en presencia de las micorrizas y las bacterias PGP *B. subtilis* y *P. putida*.

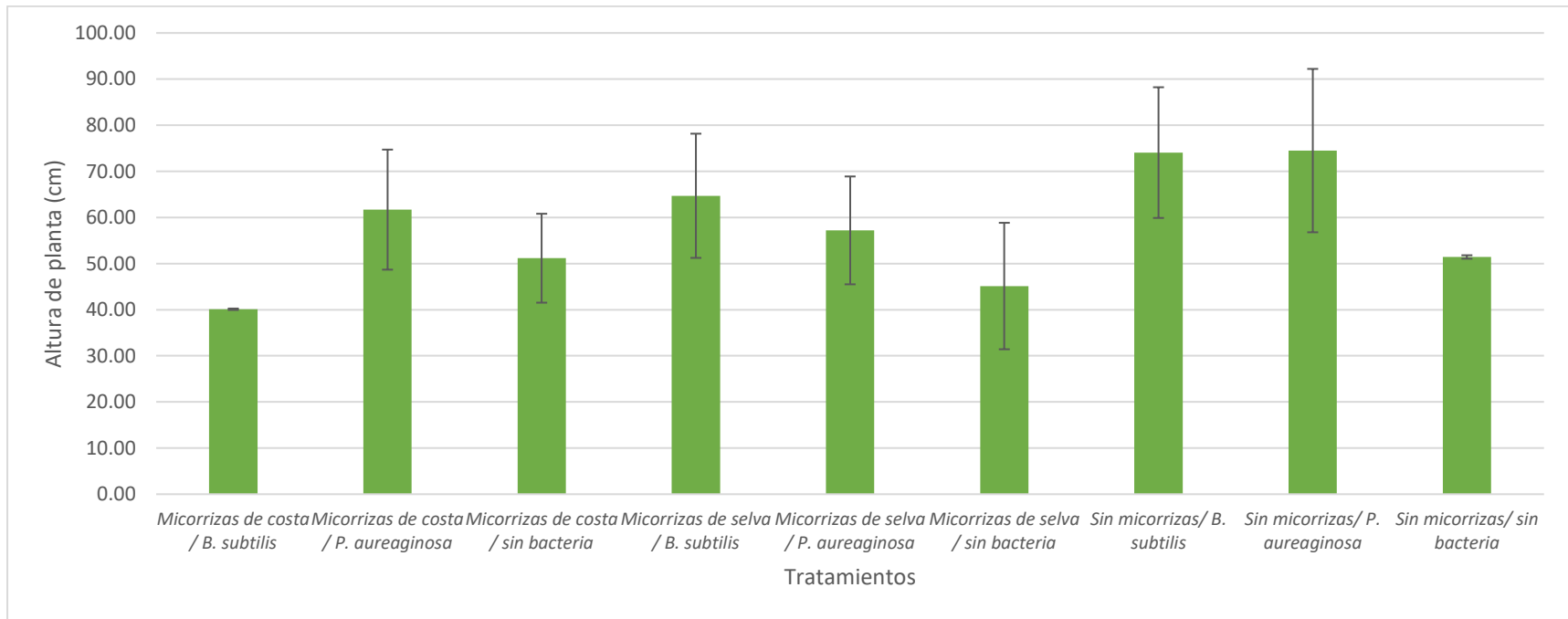


**a.** Sin micorrizas + sin bacteria, **b.** sin micorrizas + *B. subtilis*, **c.** sin micorrizas + *P. putida*, **d.** Micorrizas de costa + sin bacteria, **e.** Micorrizas de costa + *B. subtilis*, **f.** Micorrizas de costa + *P. putida*, **g.** Micorrizas de selva + sin bacteria, **h.** Micorrizas de selva + *B. subtilis*, **i.** Micorrizas de selva + *P. putida*.

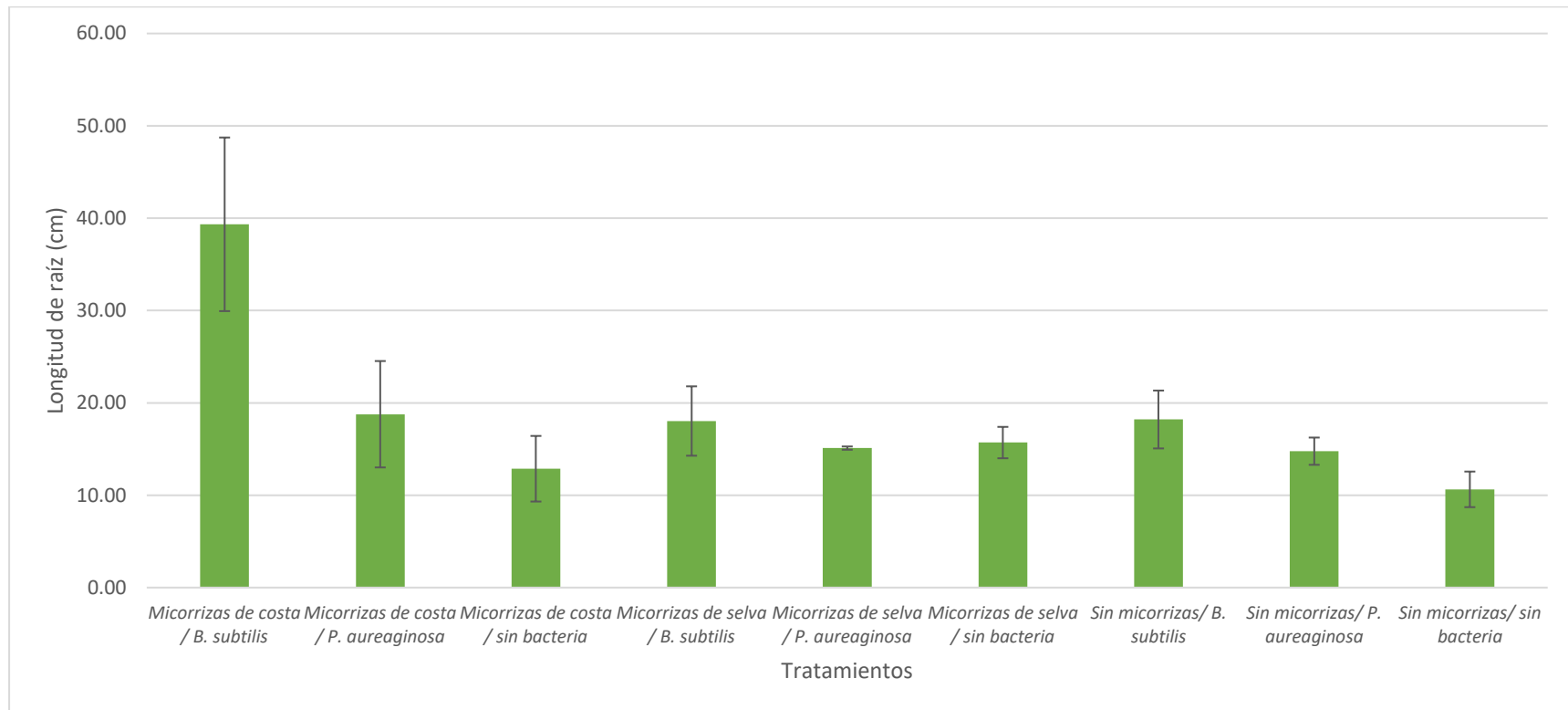
**Figura 22. Efecto de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la raíz de plantones de *P. americana* var. *Zutano*, infectados con *P. cinnamomi***

**Tabla 14. Severidad de la enfermedad por *Phytophthora cinnamomi* en palto por tratamientos**

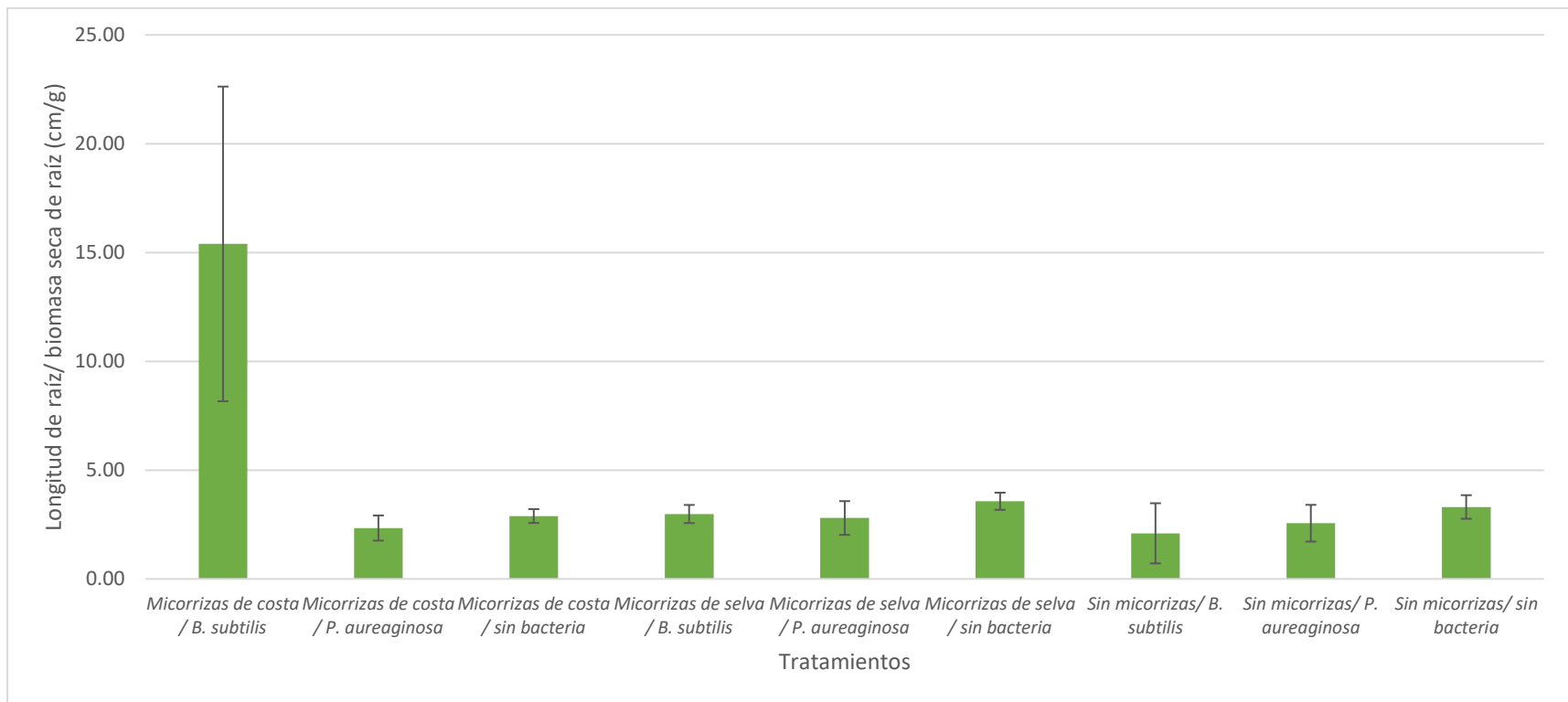
Tratamiento	Valor de la escala	Aparición del brote y síntoma de la enfermedad	Apariencia de raíces
GWI / <i>B. subtilis</i>	1	Síntomas visibles de la enfermedad. Amarillamiento generalizado de las hojas	Raicillas enfermas entre 10 y 15%
GWI / <i>P. putida</i>	1	Síntomas visibles de la enfermedad. Amarillamiento generalizado de las hojas	Raicillas enfermas entre 10 y 15%
GWI / sin bacteria	1	Síntomas visibles de la enfermedad. Amarillamiento generalizado de las hojas	Raicillas enfermas entre 10 y 15%
GFI / <i>B. subtilis</i>	1	Síntomas visibles de la enfermedad. Amarillamiento generalizado de las hojas	Raicillas enfermas entre 10 y 15%
GFI / <i>P. putida</i>	1	Síntomas visibles de la enfermedad. Amarillamiento generalizado de las hojas	Raicillas enfermas entre 10 y 15%
GFI /sin bacteria	3	clorosis generalizada, marchitez y defoliación	Raicillas enfermas > 70.1%.
Sin micorrizas / <i>B. subtilis</i>	2	Amarillamiento generalizado de las hojas, retraso en el crecimiento y marchitamiento leve	Raicillas enfermas entre 15,1 y 70%
Sin micorrizas / <i>P. putida</i>	2	Amarillamiento generalizado de las hojas, retraso en el crecimiento y marchitamiento leve	Raicillas enfermas entre 15,1 y 70%
Sin micorrizas / sin bacteria	3	clorosis generalizada, marchitez y defoliación	Raicillas enfermas > 70.1%.



**Figura 23. Efecto de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la altura de planta en plantones de *P. americana* var. Zutano, infectados con *P. cinnamomi***



**Figura 24. Efecto de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la longitud de raíz en plántulas de *P. americana* var. Zutano, infectadas con *P. cinnamomi***



**Figura 25. Efecto de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la longitud de raíz/biomasa seca de raíz de *P. americana* var. Zutano, infectados con *P. cinnamomi***



#### **4.3.2. Acumulación de macronutrientes en plantones co-inoculados con bacterias y micorrizas**

##### **Efectos principales de los factores micorrizas y bacterias**

Según el análisis de varianza de los efectos principales, las micorrizas no tienen efecto sobre la acumulación de macronutrientes; en cambio, las bacterias sí mejoran la acumulación de macronutrientes. *P. putida* mejora la acumulación de nitrógeno, potasio y azufre y *B. subtilis* incrementa la acumulación de calcio y magnesio (Tabla 15).

##### **Efectos de la co-inoculación de bacterias y micorrizas**

Se analizaron las hojas de las plantas infectadas con *P. cinnamomi* e inoculadas con bacterias y micorrizas. La acumulación de nitrógeno y azufre se ve favorecida por la inoculación de *P. putida* y donde su interacción con las micorrizas no es significativa. Por otro lado, si se aprecia interacción positiva entre las micorrizas de costa en especial comparado a las micorrizas de selva, con las bacterias antagonistas *B. subtilis* y *P. putida*, la primera incrementa la absorción de calcio y magnesio y la segunda incrementa el contenido de potasio (Tabla 16).

**Tabla 15. Efectos principales de las micorrizas y las bacterias PGP sobre la absorción de macronutrientes en plantones de *P. americana* var. Zutano, infectados con *P. cinnamomi***

Factores	N (mg/100g)		P (mg/100g)		K (mg/100g)		Ca (mg/100g)		Mg (mg/100g)		S (mg/100g)	
Micorrizas de costa	2.03	a	0.13	a	1.50	a	1.26	b	0.71	b	0.19	b
Micorrizas de selva	2.02	a	0.12	a	1.52	a	1.12	a	0.67	a	0.17	a
Sin micorrizas	2.30	b	0.14	a	1.46	a	1.30	c	0.74	c	0.23	c
<i>B. subtilis</i>	2.11	b	0.13	a	1.43	a	1.36	b	0.80	b	0.20	a
<i>P. putida</i>	2.26	c	0.13	a	1.61	b	1.34	b	0.70	b	0.21	b
Sin bacteria	2.00	a	0.13	a	1.45	a	0.99	a	0.61	a	0.19	a

**Tabla 16. Efecto de la co-inoculación bacteria-micorrizas sobre la absorción de macronutrientes en plántones de *P. americana* var. Zutano, infectados con *P. cinnamomi***

Micorriza	Bacteria	N (mg/100g)		P (mg/100g)		K (mg/100g)		Ca (mg/100g)		Mg (mg/100g)		S (mg/100g)	
Micorrizas de costa	<i>B. subtilis</i>	1.90	a	0.12	a	1.42	d	1.60	i	0.88	f	0.18	bc
	<i>P. putida</i>	2.18	f	0.14	a	1.77	i	1.26	f	0.69	c	0.21	d
	Sin bacteria	2.02	b	0.14	a	1.32	a	0.92	a	0.55	a	0.19	c
Micorrizas de selva	<i>B. subtilis</i>	2.04	c	0.13	a	1.37	b	1.08	c	0.70	c	0.19	c
	<i>P. putida</i>	2.13	e	0.12	a	1.65	h	1.19	e	0.65	b	0.16	a
	Sin bacteria	1.90	a	0.12	a	1.55	g	1.10	d	0.65	b	0.17	ab
Sin micorrizas	<i>B. subtilis</i>	2.38	g	0.14	a	1.51	f	1.39	g	0.83	e	0.22	d
	<i>P. putida</i>	2.46	h	0.14	a	1.40	c	1.56	h	0.75	d	0.26	e
	Sin bacteria	2.07	d	0.14	a	1.47	e	0.96	b	0.64	b	0.22	d

Sobre los parámetros de crecimiento en plántones del portainjerto de palto de la var. Zutano en condiciones de infección por *P. cinnamomi*, se evidenció efecto sinérgico positivo entre las micorrizas de costa y *B. subtilis* sobre la mejora de la longitud de raíz, de igual manera cuando se inoculan en conjunto micorrizas de selva y *B. subtilis* sobre el número de hojas. Las micorrizas mejoran la resistencia del vegetal al ataque de patógenos, de especial manera, los que infectan la raíz, cuando se inocularon previo de los hongos al del patógeno. En el caso de nematodos fitoparásitos se ha informado que los HMA reducen la incidencia debido a que el daño causado es a menudo compensado por aumento en el sistema radical y la absorción de nutrientes mejorada por el micelio exterior del hongo (Sánchez 1999).

Respecto a los mecanismos responsables del control, estos se han asociado con cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas micorrizadas, tales como aumento de lignificación de la pared celular lo que disminuye la penetración del patógeno, mejora de la nutrición de la planta micorrizada en particular aumento en la toma de K y P lo que vuelve a la planta menos susceptible al ataque del patógeno (Sánchez de Prager 2003). De esta manera, los HMA se convierten en una opción para el control de pudriciones radiculares a la vez que son el tipo de asociación más común en las especies de importancia agrícola por lo que tienen potencial para aumentar la resistencia a estreses bióticos y abióticos de manera natural (Sánchez de Prager 2003).

Tanto *P. putida* como *B. subtilis* en ausencia de micorrizas tiene amplia actividad sobre el crecimiento de los plántones de palto en especial la acumulación de biomasa. Respecto a la mejora en la toma de nutrientes, la acumulación de nitrógeno y azufre se ve favorecida por la inoculación de *P. putida* sin interacción con las micorrizas. Sánchez *et al.* 2006 son enfáticos al afirmar que las micorrizas constituyen la principal comunidad microbiana a nivel de la rizosfera debido a que establecen simbiosis de gran importancia para las plantas en cuanto a su nutrición y desarrollo; además de presentar otros beneficios tales como la remediación de metales pesados, recuperación de suelos degradados y control de fitopatógenos por lo que ha generado interés explotarlo de forma masiva para usos comerciales en agricultura.

Las micorrizas constituyen una de las más sobresalientes adaptaciones de la raíz para desarrollarse en el suelo debido a funciona como un órgano de absorción y translocación de nutrientes al establecer un puente entre la raíz y el suelo (Guerrero 1996).

Existe interacción positiva entre las micorrizas de costa en especial comparado a las micorrizas de selva, con las bacterias antagonistas *B. subtilis* y *P. putida*, en el incremento de la absorción de calcio, magnesio y potasio. Los hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA), se identifican porque generan estructuras denominadas arbuscúlos y vesículas a lo largo de su vida (Hernández Dorrego 2000). Da Silveira (2003), evaluó cómo influye la micorrización con las especies *Glomus clarum*, *G. etunicatum*, *G. manihotis*, *Acaulospora scrobiculata*, *Scutellospora heterogama*, *Gigaspora margarita* sobre la nutrición y el contenido de carbohidratos en plántones de palto de la variedad 'Carmen' (*Persea sp.*). Todas las especies de que evaluaron mostraron aumentar las cantidades de carbohidratos en la parte aérea de las plantas. Las especies *S. heterogama*, *G. etunicatum*, *G. clarum* y *A. scrobiculata*, que, en general han favorecido la elevación de los niveles de los elementos minerales en los plántones de aguacate, propiciaron, en consecuencia, un mayor desarrollo vegetativo. Las especies *G. margarita* y *G. manihotis* además de no afectar en los contenidos nutricionales, tampoco incrementaron el desarrollo vegetativo de los plántones.

Al ser el palto un frutal con marcada ausencia de pelos radicales, la simbiosis con micorrizas es de especial importancia (Salazar - García 2002). Dicha simbiosis demanda una serie de compuestos orgánicos de la planta que satisfacen los requerimientos nutricionales de las micorrizas creando así un sistema mutualista por lo que la tecnología de micorrización en el palto representa una estrategia dentro de un enfoque sustentable para sostener su producción (Alemán *et al.* 1997).

Con la finalidad de conseguir alimentos más inocuos y con menor impacto sobre el ambiente, en la actualidad, se busca incorporar tecnologías que disminuyan el uso de los agroquímicos; así como para su comercialización bajo el mismo enfoque en mercados cada vez más exigentes por lo que el uso de micorrizas debido a todos los beneficios ya mencionados que genera se convierte en una opción viable para el agricultor; por lo que su uso apropiado en especial en épocas tempranas como en la fase de vivero donde pueden inocularse con mayor eficiencia permiten lograr mejores resultados en el futuro cultivo (Herrera 2004).

Se menciona por ejemplo que al ser inoculadas las plantas a nivel de vivero se tienen como beneficios una mayor supervivencia al trasplante y por ende en el establecimiento de la plantación (Camprubí, et al., 2000). En especial este efecto es más notorio en suelos donde la diversidad y cantidad de micorrizas nativas son insuficientes para trasladar estos beneficios de manera natural, diversidad que por cierto se pierde también debido a prácticas agrícolas como fumigaciones y fertilización mineral (Sieverding 1991).

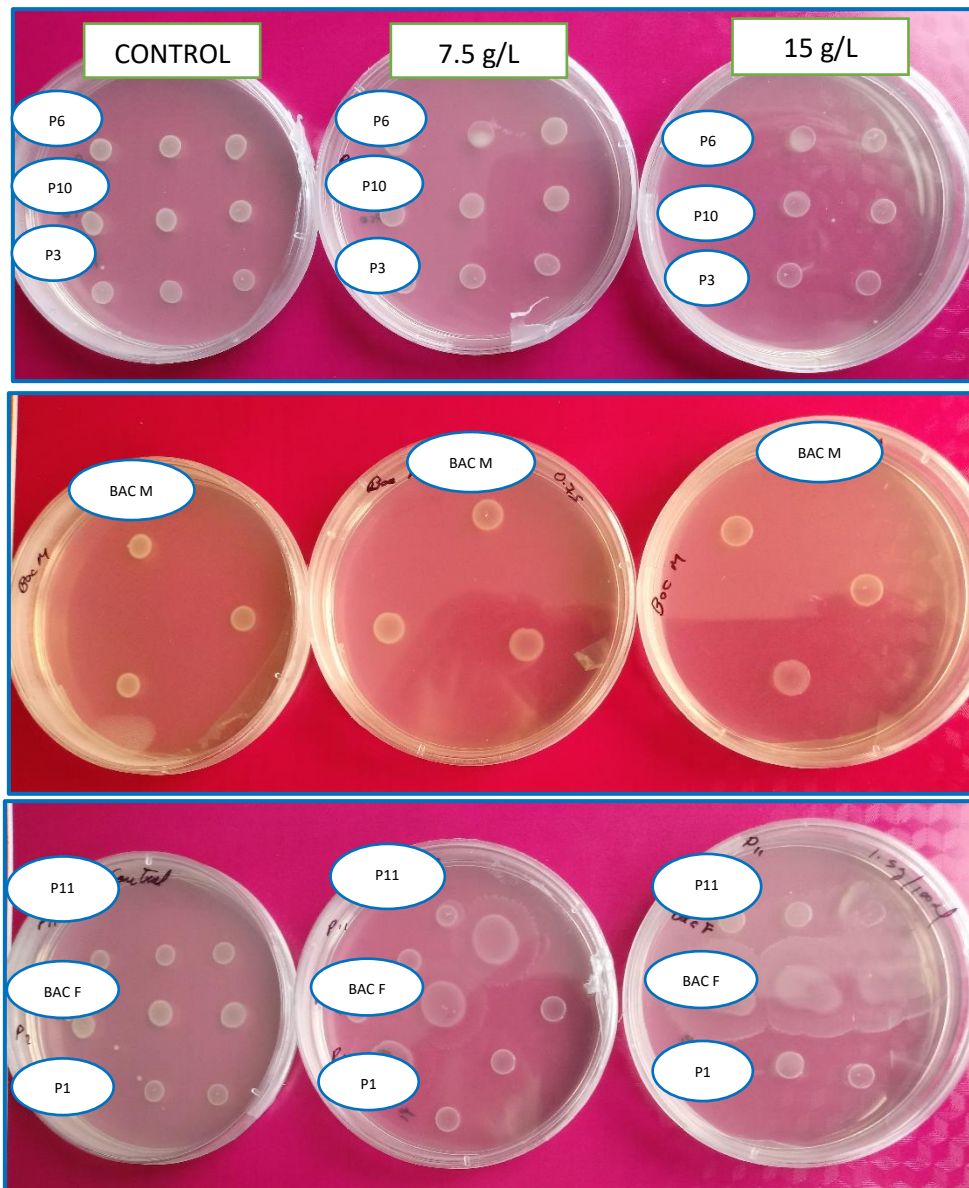
Camprubí *et al.* (2000), manifiestan que el uso de portainjertos de frutales micorrizados con un hongo previamente seleccionado, puede incorporar una ventaja que posibilite el trasplante con garantías de supervivencia y progreso del árbol en fase inicial cuando éste es más frágil. En vivero se han tenido los mayores efectos en la implementación de la micorriza como en la propagación de algunos frutales, los cuales en el caso del palto son apoyados por algunas experiencias (Menge *et al.* 1980). Menge *et al.* (1977), citados por Hernández (2004), por ejemplo, ensayaron sobre un sustrato inerte plantas micorrizadas que crecieron de manera más rápida y en comparación con aquellas plantas no micorrizadas fueron significativamente más grandes y robustas luego de 105 días de inoculadas y a los 130 días este crecimiento fue superior en 30 por ciento con la inoculación de micorrizas; así mismo se presentó 83 por ciento más de peso seco, 123 por ciento mayor peso de raíces y 258 por ciento más altas.

Entonces como demuestran algunos estudios, en la etapa de vivero se puede reducir la estancia de las plantas tanto frutales como forestales cuando se usan micorrizas por lo que representan una opción además económica con calidad ambiental (Salamanca y Cano 2005). Al ser entonces un factor biológico primordial en la estructura del suelo, las micorrizas representan un bioinsumo importante para tornar sostenible a la agricultura (Guerrero 1996).

#### **4.4.EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. americana* VAR. ZUTANO BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO**

##### **4.4.1. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre el crecimiento bacteriano de bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal aisladas del palto.**

Los aislamientos de bacterias Gram positivas, procedentes de la rizosfera de *P. americana*, fueron sembrados en agar nutritivo con 7.5 y 15 g·l<sup>-1</sup> de cloruro de sodio, respectivamente. De los 10 aislamientos que presentaron alguna característica promotora de crecimiento (Solubilización de fosfatos, síntesis de sideróforos y actividad antagonista contra *P. cinnamomi* y/o *L. theobromae*) sembrados en condiciones de salinidad en agar resultaron tolerantes las cepas Bac F y Bac M que no mermaron su crecimiento en concentraciones crecientes de salinidad (Figura 26).



**Figura. 26. Crecimiento de bacterias rizosféricas de palto en concentraciones crecientes de NaCl**



#### **4.4.2. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la resistencia al estrés salino en *P. americana* var. Zutano**

*B. subtilis* demostró incrementar la altura de planta (Tabla 17) y en general presentar mejor aspecto en cuanto a coloración y vigor (Figura 28), también aumentó la biomasa radicular seca (Tabla 17, Figura 27). Considerando la extensión de suelos salinos en la costa de Perú, y en particular el estrés por salinidad del suelo se convierte en el principal factor restrictivo para la producción agrícola. La presencia de *B. subtilis* en el sustrato de las plántulas modificó la tolerancia de estas al estrés inducido con NaCl (Figura 28). Se cree firmemente que estas respuestas se relacionan con la habilidad que tiene la bacteria (*B. subtilis*) de aumentar la síntesis de especies activas de oxígeno (Lastochkina *et al.* 2017, Ibarra *et al.* 2021, Ferreira *et al.* 2018). En conclusión, *P. plecoglossicida* y *B. subtilis* disminuyen la acumulación de los iones cloro y sodio; mientras que aumentan la acumulación de potasio en las hojas de palto y disminuyen los iones cloro y sodio mientras aumentan la acumulación de potasio en las raíces.

El estrés por salinidad, que forma parte de los diversos estreses ambientales, es el principal factor que restringe la agricultura por lo que aliviarlo al menos a nivel fisiológico, independientemente del manejo del suelo y sus condiciones físicoquímicas, como por ejemplo disminuir la producción de especies reactivas del oxígeno en el vegetal (Inés y Montagu 1995) que funcionan como señalizadores que inducen resistencia sistémica es considerado una opción atractiva. Cabe señalar que, la bacteria *B. subtilis*, que no es patógena, es capaz de generar las respuestas de resistencia sistémica asociadas normalmente a la presencia de un patógeno (Kuc 1990). La presencia de *B. subtilis* en el sustrato de las plántulas modifica la tolerancia de estas al estrés inducido con NaCl.

Según las investigaciones han demostrado, las bacterias PGPR pueden ayudar a la mitigación de los efectos adversos de la salinidad (Kumar *et al.* 2020) por mecanismos variados. Varias PGPRs poseen genes *acdS* que codifican la ACC desaminasa mejoran el crecimiento y desarrollo de las plantas al disminuir el etileno sintetizado debido a la salinidad, ya que las desaminasas reducen la producción de etileno mediante la conversión de ACC en  $\alpha$ -cetobutirato y amoníaco (Saleem *et al.* 2007). La ACCD hidroliza ACC (precursor de la biosíntesis de etileno en plantas superiores) en álcali y  $\alpha$ -cetobutirato para su uso como fuente de nitrógeno y mejora el crecimiento de las plantas en condiciones salinas (Ghosh *et al.* 2018). Como la ACC desaminasa actúa reduciendo los niveles de ACC dentro de la planta, la inhibición del crecimiento y desarrollo de la planta por el etileno (particularmente en tiempos de estrés, incluido el estrés por salinidad) disminuye, y estas plantas, en la mayoría de los casos parte, tienen raíces y brotes más largos y mayor biomasa (Glick 2014) como se obtuvo en la presente investigación (Tabla 16). También las PGPR producen IAA, que es absorbido por la planta y promueve la expansión y el alargamiento de las células vegetales. También pueden producir ácido abscísico (ABA) implicado en la economía hídrica de la planta y control estomático (Etesami *et al.* 2015).

**Tabla 17. Efectos principales de las bacterias PGP en plantones de *P. americana* var. Zutano en tres niveles de estrés salino**

Fuente	Altura de planta (cm)	Diámetro (mm)	Biomasa fresca aerea (g)	Biomasa seca aerea (g)	Biomasa radicular fresca (g)	Biomasa radicular seca (g)
<i>B. subtilis</i>	59.93 c	0.65 a	40.74 a	18.53 ab	17.65 a	13.06 b
<i>P. plecoglossicida</i>	53.32 a	0.59 a	35.78 a	16.48 a	21.27 b	9.97 a
Sin bacteria	54.68 b	0.59 a	41.80 a	19.38 b	25.01 c	13.46 b
0.75g/L NaCl	52.06 b	0.62 ab	26.09 b	15.98 b	20.43 b	13.92 b
1.5g/L NaCl	48.66 a	0.56 a	22.77 a	10.98 a	15.58 a	6.40 a
Sin NaCl	67.20 c	0.66 b	62.95 c	27.43 c	27.93 c	16.17 b

\*letras iguales indican promedios estadísticamente iguales a partir de la Prueba de Duncan al 95 por ciento de confiabilidad

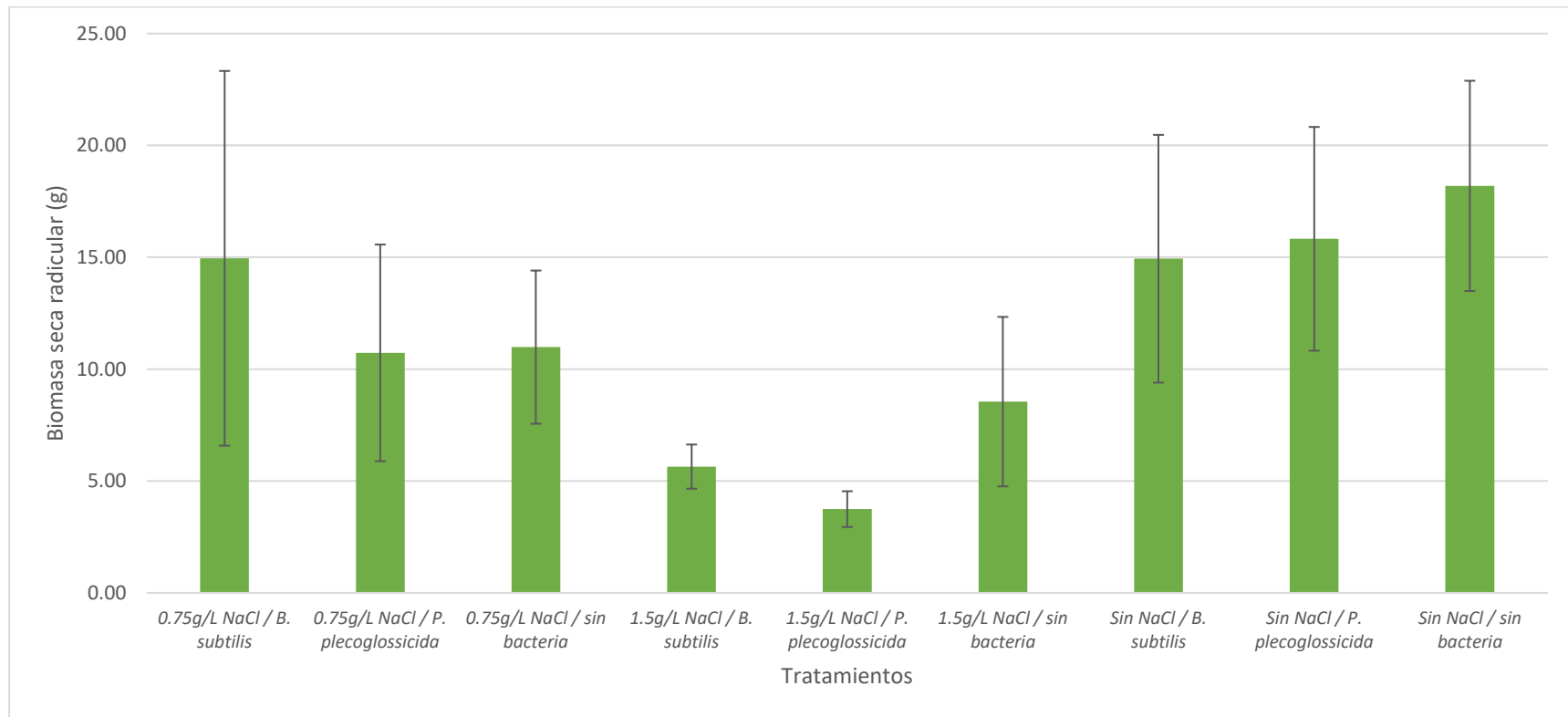
**Tabla 18. Análisis multivariante unifactorial del efecto de la inoculación de bacterias PGP en parámetros de crecimiento de plantones de *P. americana* var. Zutano inducidas a estrés por salinidad**

Fuente	Variable	SC	GL	CM	FC	P-VALOR
Tratamiento	Altura de planta (cm)	5237.42	8	654.67	7.41	0.000
	Diametro (mm)	0.14	8	0.01	1.52	0.177
	Biomasa fresca aerea (g)	21382.92	8	2672.86	24.31	0.000
	Biomasa seca aerea (g)	2694.68	8	336.83	25.99	0.000
	Biomasa radicular fresca (g)	5186.32	8	648.29	5.93	0.000
	Biomasa radicular seca (g)	1232.24	8	154.03	5.39	0.000
Error	Altura de planta (cm)	3970.96	45	88.24		
	Diametro (mm)	0.51	45	0.01		
	Biomasa fresca aerea (g)	4947.49	45	109.94		
	Biomasa seca aerea (g)	583.17	45	12.95		
	Biomasa radicular fresca (g)	4913.19	45	109.18		
	Biomasa radicular seca (g)	1285.68	45	28.57		
Total	Altura de planta (cm)	9208.38	53			
	Diametro (mm)	0.65	53			
	Biomasa fresca aerea (g)	26330.41	53			
	Biomasa seca aerea (g)	3277.85	53			
	Biomasa radicular fresca (g)	10099.52	53			
	Biomasa radicular seca (g)	2517.92	53			

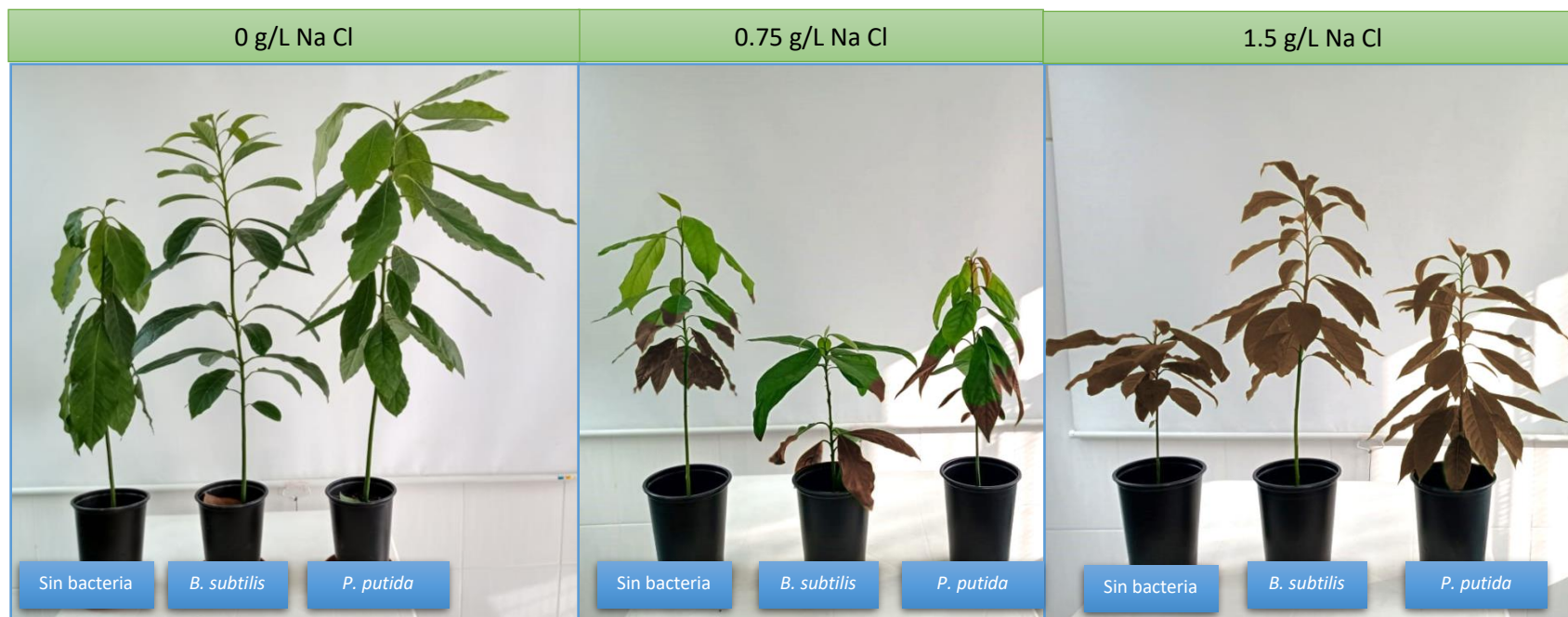
**Tabla 19. Análisis de varianza de parámetros de crecimiento de plantones de *P. americana* var. *Zutano* inoculadas con bacterias PGP e inducidos a estrés por salinidad**

Bacteria	Salinidad	Altura de planta (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Biomasa fresca aerea (g)	Biomasa seca aerea (g)	Biomasa radicular fresca (g)	Biomasa radicular seca (g)	Biomasa seca total (g)	Disminución de MST (%)*
<i>B. subtilis</i>	Sin NaCl	73.9 f	0.68 a	57.16 d	27.76 d	20.51 cd	16.33 cd	44.09 e	0.00
<i>B. subtilis</i>	0.75g/L NaCl	47.20 b	0.63 a	29.05 a	16.34 bc	17.16 bc	17.22 d	33.56 d	23.88
<i>B. subtilis</i>	1.5g/L NaCl	58.80 d	0.63 a	22.34 a	11.48 a	15.30 ab	5.64 a	17.12 a	61.17
<i>P. plecoglossicida</i>	Sin NaCl	64.51 e	0.65 a	68.63 f	26.12 d	27.54 e	13.99 bcd	40.11 d	0.00
<i>P. plecoglossicida</i>	0.75g/L NaCl	50.30 c	0.62 a	27.83 c	13.75 bc	24.17 de	12.18 bc	25.93 b	35.35
<i>P. plecoglossicida</i>	1.5g/L NaCl	45.15 b	0.51 a	18.91 a	9.56 a	12.12 a	3.74 a	13.3 a	66.84
Sin bacteria	Sin NaCl	63.20 e	0.63 a	63.07 e	28.41 d	35.76 f	18.19 d	46.6 d	0.00
Sin bacteria	0.75g/L NaCl	58.70 d	0.60 a	21.4 a	17.84 c	19.96 bcd	12.38 bc	30.22 bc	35.15
Sin bacteria	1.5g/L NaCl	42.15 a	0.54 a	27.06 bc	11.90 a	19.31 bcd	9.82 b	21.72 b	53.39

Letras iguales indican promedios estadísticamente iguales a partir de la Prueba de Duncan al 95% de confiabilidad. \*Expresa la disminución de la materia seca total (MST) expresada en porcentaje agrupada por cada especie bacteriana (*B. subtilis*, *P. plecoglossicida* y Sin bacteria) en la medida que aumenta se incrementa la concentración salina



**Figura 27. Efecto de la inoculación de bacterias PGP en la biomasa seca radicular de plátones de *P. americana* var. Zutano inducidos a estrés por salinidad**



**Figura 28.** Efecto de la inoculación de bacterias PGP en el crecimiento de plantones de *P. americana* var. *Zutano*, inducidos a estrés por salinidad

#### 4.4.3. Acumulación de iones en hojas de palto

En las hojas, en primer lugar *P. plecoglossicida* y luego *B. subtilis* disminuyen la acumulación de los iones cloro y sodio; mientras que aumentan la acumulación de potasio (Tablas 20 y 21, Figura 29). Por otro lado, en las raíces el orden se invierte siendo *B. subtilis* la bacteria que permite la disminución de los iones cloro y sodio y aumenta la acumulación de potasio, seguida de la bacteria *P. plecolossicida* con iguales efectos en comparación a los tratamientos donde no se inoculan bacterias y los niveles de salinidad aumentan (Tablas 22 y 23, Figura 30).

**Tabla 20. Efectos principales de las bacterias PGP en la acumulación de iones salinos en hojas de *P. americana* var. Zutano en tres niveles de estrés salino**

Factor		K	Na	Cl
Salinidad	Sin NaCl	1.11 a	0.009 a	0.34 a
	0.75 g NaCl	1.75 c	0.09 b	3.7 b
	1.5 g NaCl	1.53 b	0.25 c	5.66 c
Bacteria	<i>B. subtilis</i>	1.45 a	0.12 b	3.31 b
	<i>P. plecoglossicida</i>	1.49 b	0.07 a	3.02 a
	Sin bacteria	1.45 a	0.16 c	3.37 c



**Tabla 21. Acumulación de iones salinos en hojas de *P. americana* var. *Zutano* inoculadas con bacterias PGP e inducidos a estrés por salinidad**

Bacteria	Salinidad	K (mg/100g)	Na (mg/100g)	Cl (mg/100g)
<i>B. subtilis</i>	Sin NaCl	1.02 a	0.078 a	0.24 a
<i>B. subtilis</i>	0.75 g NaCl	1.70 g	0.089 b	3.66 e
<i>B. subtilis</i>	1.5 g NaCl	1.63 f	0.27 e	6.04 h
<i>P. plecoglossicida</i>	Sin NaCl	1.18 c	0.008 a	0.42 c
<i>P. plecoglossicida</i>	0.75 g NaCl	1.69 g	0.010 c	3.98 f
<i>P. plecoglossicida</i>	1.5 g NaCl	1.59 e	0.12 d	4.67 g
Sin bacteria	Sin NaCl	1.11 b	0.010 a	0.37 b
Sin bacteria	0.75 g NaCl	1.86 h	0.097 bc	3.48 d
Sin bacteria	1.5 g NaCl	1.38 d	0.37 f	6.28 i

Letras iguales en la misma columna indican promedios estadísticamente iguales a partir de la Prueba de Duncan al 95 por ciento de confiabilidad

#### 4.4.4. Acumulación de iones en raíces de palto

**Tabla 22. Efectos principales de las bacterias PGP en la acumulación de iones salinos en raíces de *P. americana* var. Zutano en tres niveles de estrés salino**

Factor		K	Na	Cl
Salinidad	Sin NaCl	1.21 c	0.04 a	0.87 a
	0.75 g NaCl	0.60 b	0.17 b	1.99 b
	1.5 g NaCl	0.41 a	0.23 c	2.23 c
Bacteria	<i>B. subtilis</i>	0.78 c	0.16 b	1.21 a
	<i>P. plecoglossicida</i>	0.77 b	0.12 a	1.61 b
	Sin bacteria	0.68 a	0.16 c	2.28 c

**Tabla 23. Acumulación de iones salinos en raíces de plántulas de *P. americana* var. Zutano inoculadas con bacterias PGP e inducidas a estrés por salinidad**

Bacteria	Salinidad	K (mg/100g)	Na (mg/100g)	Cl (mg/100g)
<i>B. subtilis</i>	Sin NaCl	1.26 h	0.05 a	0.85 b
<i>B. subtilis</i>	0.75 g NaCl	0.66 d	0.22 d	0.86 b
<i>B. subtilis</i>	1.5 g NaCl	0.41 b	0.21 d	1.93 e
<i>P. plecoglossicida</i>	Sin NaCl	1.21 g	0.04 a	0.82 a
<i>P. plecoglossicida</i>	0.75 g NaCl	0.71 e	0.15 b	1.76 d
<i>P. plecoglossicida</i>	1.5 g NaCl	0.38 a	0.18 c	2.25 f
Sin bacteria	Sin NaCl	1.15 f	0.04 a	0.95 c
Sin bacteria	1.5 g NaCl	0.45 c	0.30 e	2.52 g
Sin bacteria	0.75 g NaCl	0.44 c	0.14 b	3.37 h

Letras iguales en la misma columna indican promedios estadísticamente iguales a partir de la Prueba de Duncan al 95 por ciento de confiabilidad

Como se aprecia, las bacterias PGP de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* disminuyen el contenido de cloro y sodio en los tejidos vegetales en plantones de palto expuestos a condiciones de salinidad del suelo; mientras que incrementan el contenido de potasio asociado al manejo del agua por el vegetal en condiciones de salinidad. Este efecto sobre los iones relacionados a la salinidad en la fisiología vegetal ha sido demostrado en los últimos años por diversos autores, en especial sobre los géneros ensayados. Así lo señalan Fazal y Bano (2016) sobre el cultivo de maíz al remojar las semillas en una solución de *Pseudomonas* en un ensayo en el que logró disminuir hasta en 50 por ciento la absorción de Na en el vegetal. También Singh *et al.* (2020) demostraron que la aplicación de *P. geniculata* reduce la absorción de Na<sup>+</sup> y aumenta la absorción de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en raíces de maíz, indicativo del papel de las bacterias PGP en el mantenimiento del equilibrio iónico/homeostasis en las raíces de las plantas en condiciones de salinidad.

En el cultivo del palto, las experiencias son menos precisas respecto a los iones pero demuestran que la aplicación de consorcios bacterianos mejoran el crecimiento del palto en condiciones de salinidad así como reducen el daño fisiológico por la misma (Barra *et al.* 2017). En general, la inoculación con bacterias PGP no solo ayuda a aliviar los efectos tóxicos de la sal, sino que también aumenta el crecimiento de las plantas junto con la reducción de las pérdidas de cultivos debido a la salinidad y la sodicidad (Mokrani *et al.* 2020, Egamberdieva *et al.* 2019).

#### **4.5.EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE MICORRIZAS ARBUSCULARES SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. americana* VAR. ZUTANO BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO**

Se establecieron siete tratamientos a partir de dos factores: micorrizas (a partir de aislamientos de suelos de costa GWI y selva GFI del Perú) y concentraciones de cloruro de sodio (agua de riego sin cloruro sódico, agua de riego con 0,75 g·L<sup>-1</sup> de cloruro sódico y agua de riego con 1,5 g·L<sup>-1</sup> de cloruro sódico). El ensayo se mantuvo durante 60 días con una frecuencia de riego de tres veces por semana y una dosis de 500 ml por planta. Los tratamientos se detallan en la Tabla 24.

**Tabla 24. Descripción de los tratamientos con micorrizas arbusculares y niveles de salinidad**

MICORRIZA	NIVEL DE SALINIDAD
Micorriza de costa (GWI)	0.75 g/L NaCl
Micorriza de costa (GWI)	1.5 g/L NaCl
Micorriza de selva (GFI)	0.75 g/L NaCl
Micorriza de selva (GFI)	1.5 g/L NaCl
Sin micorriza	0.75 g/L NaCl
Sin micorriza	1.5 g/L NaCl
Sin micorriza	0 g/L NaCl

#### **4.5.1. Efecto de la inoculación con micorrizas arbusculares sobre la resistencia al estrés salino en *P. americana* var. Zutano**

Sobre los parámetros de crecimiento, la inoculación con micorrizas arbusculares incrementa la longitud de planta, la biomasa fresca aérea y biomasa seca radicular además de estabilizar otros parámetros de crecimiento en presencia de niveles crecientes de salinidad (Tabla 25, Figuras 29-31). La biomasa fresca o seca es la característica más afectada por la salinidad y donde más efecto han tenido las micorrizas arbusculares (Tabla 25).

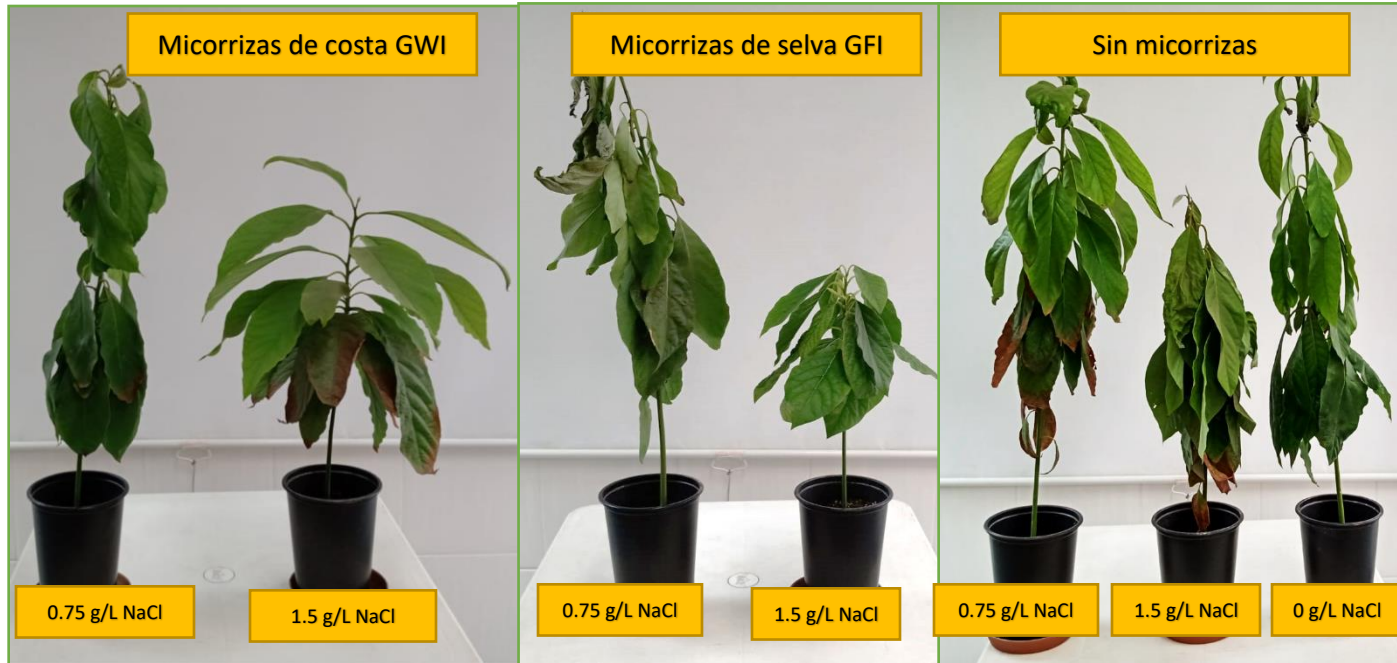
Respecto a la toma de iones salinos, en hojas, se aprecia una tendencia de que las micorrizas arbusculares incrementan la acumulación de los iones sodio, potasio y cloro en un nivel bajo de salinidad, probablemente porque mejoran la absorción de nutrientes, pero este aumento no es sustancial y terminan por disminuir en un mayor nivel de salinidad, aminorando el impacto de la salinidad entendido como la acumulación de estos iones por debajo del control donde no se aplicaron micorrizas (Tablas 26 y 27, Figura 31).

El efecto de las micorrizas arbusculares es más claro en las raíces. Respecto al ion sodio las micorrizas arbusculares originarias de un suelo salino de la costa peruana disminuyen su acumulación respecto al control (1.5 g NaCl sin micorrizas). Las micorrizas arbusculares originaria de la costa del Perú fueron más eficientes que las micorrizas originarias de la selva peruana en incrementar la acumulación de potasio respecto al control (1.5 g NaCl sin micorrizas). En el caso del ion cloro, las micorrizas originarias de la costa peruana disminuyen la acumulación del cloro comparado al control (1.5 g NaCl sin micorrizas) (Tablas 28 y 11, Figura 33).

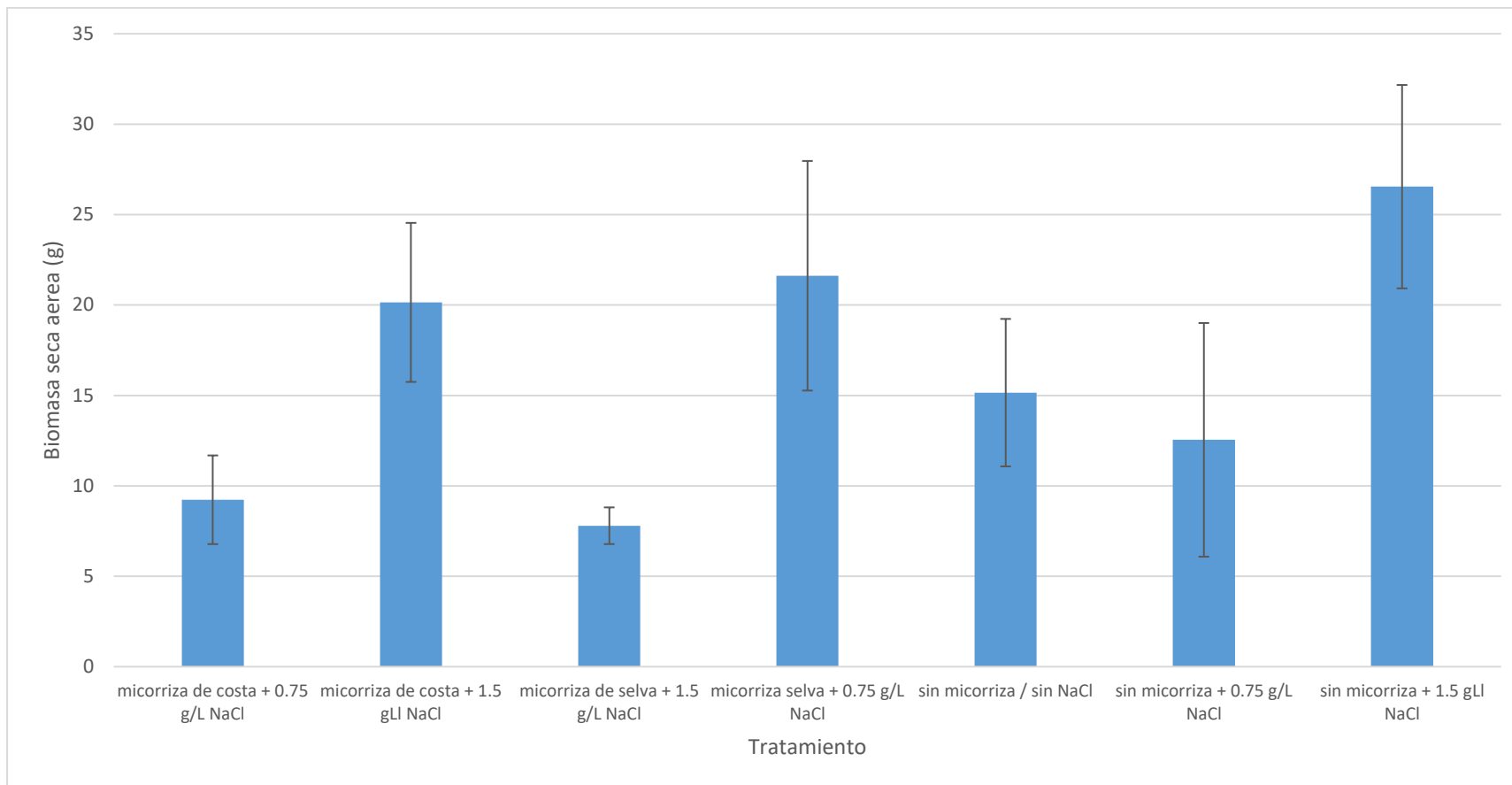
**Tabla 25. Efecto de la inoculación con micorrizas arbusculares sobre características agronómicas en plántones de *P. americana* var. Zutano, inducidos a estrés salino**

Micorriza	Salinidad	Longitud de planta (cm)	Biomasa fresca aérea (g)	Biomasa fresca radicular (g)	Biomasa seca aérea (g)	Biomasa seca radicular (g)	Biomasa seca total (g)	Incremento de MST (%)*
GFI	0.75g/l Na Cl	60.5 cd	40.03 cd	15.78 ab	20.14 cd	4.15 a	24.29 cd	14.19
GFI	1.5g/l Na Cl	48.87 ab	13.03 a	14.80 ab	7.79 a	3.24 a	11.3 a	-34.68
GWI	0.75g/l Na Cl	57.32 bc	36.00 c	19.92 bc	21.62 de	4.76 ab	26.38 d	24.02
GWI	1.5g/l Na Cl	44.9 a	13.99 a	13.21 a	9.23 a	3.80 a	13.03 a	-24.68
Sin micorrizas	Sin Na Cl	70.87 d	47.33 d	31.88 d	26.54 e	10.12 c	36.66 e	-
Sin micorrizas	0.75g/l Na Cl	64.10 cd	24.13 b	22.95 c	15.15 bc	6.12 b	21.27 c	0
Sin micorrizas	1.5g/l Na Cl	63.87 cd	19.55 ab	15.06 ab	12.54 ab	4.76 ab	17.3 b	0

Letras iguales indican promedios estadísticamente iguales a partir de la Prueba de Duncan al 95% de confiabilidad. GFI (selva). GWI (costa). \*Expresa el incremento de la materia seca total (MST) expresada en porcentaje agrupada por cada concentración salina (0.75 g/L Na Cl y 1.5 g/L Na Cl) por cada tipo de micorriza ensayada



**Figura 29. Efecto de la inoculación con micorrizas arbusculares en plántones de *P. americana* var. Zutano, inducidos a estrés salino**



**Figura 30. Efecto de la inoculación con micorrizas arbusculares sobre la acumulación de biomasa seca aérea en plantones de *P. americana* var. Zutano, inducidos a estrés salino**





A. micorriza de costa + 0.75 g/L NaCl B. micorriza de costa + 1.5 g/L NaCl, C. micorriza de selva + 0.75 g/L NaCl, D. micorriza selva + 1.5 g/L NaCl, E. sin micorriza + 0.75 g/L NaCl, F. sin micorriza + 1.5 g/L NaCl, G. sin micorriza / sin NaCl.

**Figura 31. Plantones de *P. americana* var. Zutano según tratamientos**

Cómo se aprecia en la Figura 31, el control absoluto sin salinidad ni micorrizas es una planta sana y vigorosa (G), los tratamientos con salinidad creciente (E y F) sin micorrizas conforme el nivel de salinidad, se secan y defolian causando la muerte del plantón. La inoculación con micorrizas es más efectiva a la concentración de 0.75 g/L de NaCl (A y C). Sin embargo, en los primeros días de tratamiento las plantas aún se mostraban vivas y en crecimiento sin llegar a defoliarse o marchitarse en su totalidad a diferencia de los controles.

#### 4.5.2. Acumulación de iones en hojas de palto

**Tabla 26. Efectos principales de las micorrizas arbusculares en la acumulación de iones salinos en hojas de *P. americana* var. Zutano bajo estrés por salinidad**

Factores	Niveles	Na (mg/100g)	K (mg/100g)	Cl (mg/100g)
Micorriza	Micorriza de selva GFI	0.71 a	1.67 b	3.97 b
	Sin micorrizas	1.22 b	1.55 a	3.51 a
	Micorriza de costa GWI	1.71 c	1.80 c	4.60 c
Salinidad	Sin Na Cl	0.08 a	1.20 a	0.50 a
	0.75 g NaCl	0.75 b	1.79 c	3.92 b
	1.5 g NaCl	2.06 c	1.68 b	5.14 c

**Tabla 27. Acumulación de iones salinos en hojas de plantones de *P. americana* var. Zutano inoculadas con micorrizas arbusculares bajo estrés por salinidad**

Micorriza	Salinidad	Na (mg/100g)	K (mg/100g)	Cl (mg/100g)
GFI	0.75 g NaCl	0.62 c	1.72 d	3.94 c
GFI	1.5 g NaCl	0.80 d	1.63 b	4.00 d
GWI	0.75 g NaCl	1.04 e	1.86 g	4.10 e
GWI	1.5 g NaCl	2.38 f	1.74 e	5.11 f
Sin micorriza	Sin NaCl	0.08 a	1.2 a	0.50 a
Sin micorriza	0.75 g NaCl	0.60 b	1.80 f	3.73 b
Sin micorriza	1.5 g NaCl	3.00 g	1.67 c	6.32 g

Letras iguales en la misma columna indican promedios estadísticamente iguales a partir de la Prueba de Duncan al 95 por ciento de confiabilidad

#### 4.5.3. Acumulación de iones en raíces de palto

**Tabla 28. Efectos principales de las micorrizas arbusculares en la acumulación de iones salinos en raíces de *P. americana* var. Zutano bajo estrés por salinidad**

Factores	Niveles	Na (mg/kg)	K (mg/kg)	Cl (mg/kg)
Micorriza	Micorriza de selva GFI	1.80 b	0.45 a	2.27 c
	Sin micorrizas	1.02 a	0.54 b	1.53 a
	Micorriza de costa GWI	1.10 a	0.46 a	1.69 b
Salinidad	Sin Na Cl	0.34 a	0.96 b	0.62 a
	0.75 g NaCl	1.28 b	0.43 a	1.42 b
	1.5 g NaCl	1.56 c	0.40 a	2.55 c

**Tabla 29. Acumulación de iones salinos en raíces de plantones de *P. americana* var. Zutano inoculadas con micorrizas arbusculares bajo estrés por salinidad**

Micorriza	Salinidad	Na (mg/kg)	K (mg/kg)	Cl (mg/kg)
GFI	0.75 g NaCl	1.60 e	0.48 d	1.65 d
GFI	1.5 g NaCl	2.00 f	0.42 c	2.89 g
GWI	0.75 g NaCl	0.87 b	0.43 c	1.12 b
GWI	1.5 g NaCl	1.34 c	0.50 e	2.27 e
Sin micorriza	Sin NaCl	0.34 a	0.96 f	0.62 a
Sin micorriza	0.75 g NaCl	1.38 d	0.40 b	1.49 c
Sin micorriza	1.5 g NaCl	1.34 c	0.28 a	2.49 f

Letras iguales en la misma columna indican promedios estadísticamente iguales a partir de la Prueba de Duncan al 95 por ciento de confiabilidad.

En conclusión, las micorrizas arbusculares disminuyen en condiciones de salinidad, el impacto de esta mejorando el crecimiento vegetal y disminuyendo la acumulación de iones cloro y sodio en hojas y raíces por debajo del control donde no se aplicaron micorrizas.

Sobre los parámetros de crecimiento, la inoculación con micorrizas arbusculares incrementa la longitud de planta, la biomasa fresca aérea y biomasa seca radicular además de estabilizar otros parámetros de crecimiento en presencia de niveles crecientes de salinidad (Tabla 25). La biomasa fresca o seca es la característica más afectada por la salinidad y donde más efecto han tenido las micorrizas arbusculares (Tabla 25). En general, algunos estudios en los últimos años han reportado que el uso de cepas de micorrizas nativas o no han sido efectivas como inóculo para potenciar el desarrollo de plántulas de palto (Viera *et al.* 2017, Shu *et al.* 2017; Carreón *et al.* 2014).

Respecto a la toma de iones salinos, en hojas, se aprecia una tendencia de que las micorrizas arbusculares incrementan la acumulación de los iones sodio, potasio y cloro en un nivel bajo de salinidad, probablemente porque mejoran la absorción de nutrientes, pero este aumento no es sustancial y terminan por disminuir en un mayor nivel de salinidad, aminorando el impacto de la salinidad entendido como la acumulación de estos iones por debajo del control donde no se aplicaron micorrizas (Tabla 28). El efecto de las micorrizas arbusculares es más claro en las raíces. Respecto al ion sodio las micorrizas arbusculares originarias de un suelo salino de la costa peruana disminuyen su acumulación respecto al control (1.5 g NaCl sin micorrizas). Las micorrizas arbusculares originaria de la costa del Perú (GWI) fueron más eficientes que las micorrizas originarias de la selva peruana (GFI) en incrementar la acumulación de potasio respecto al control (1.5 g NaCl sin micorrizas). En el caso del ion cloro, las micorrizas originarias de la costa peruana disminuyen la acumulación del cloro comparado al control (1.5 g NaCl sin micorrizas) (Tabla 29).

Se conoce que la alta concentración de Na interfiere negativamente con los transportadores ubicados en la membrana plasmática de la raíz, como los canales de iones selectivos de  $K^+$  (Maathuis, 2014). Como resultado, se reduce la absorción de algunos nutrientes minerales (N, P, K, Fe, Cu y Zn). La alta relación  $Na^+ / K^+$  interrumpe varios procesos enzimáticos y la síntesis de proteínas (Faust y Schubert 2016). Se ha demostrado que las MA y algunas PGPR mejoran la absorción de  $K^+$ , lo que ayuda a las plantas a mantener una relación más baja de  $Na^+ / K^+$  y un mejor equilibrio iónico favoreciendo el contenido de N, P, K, Cu, Fe y Zn, evitando así el daño a los procesos enzimáticos celulares normales (Sagar *et al.* 2021). Las MA pueden regular el movimiento del exceso de iones  $Na^+$  desde las células a través del antiportador de la membrana plasmática  $Na^+ / H^+$  mediante la modulación de genes SOS (sensibles a la sal), manteniendo así la homeostasis iónica (Tofighi *et al.* 2021). Por ejemplo, se ha demostrado que las MA asociadas con *Oryza sativa* regulan la expresión de genes que codifican transportadores, es decir, OsSOS1, OsNHX3, OsHKT2; 1 y OsHKT1, que participan en el mantenimiento de la homeostasis iónica, mejorando así la tolerancia de las plantas a la salinidad (Porcel *et al.* 2016), lo que concuerda con Sagar *et al.* (2021), que menciona que las micorrizas ayudan en la absorción eficiente de nutrientes minerales y agua por parte de las plantas así como mejora la absorción de nutrientes para mejorar la tolerancia de las plantas contra el estrés por salinidad, lo que puede ser un enfoque extremadamente útil para la agricultura sostenible.

## V. CONCLUSIONES

### 5.1. Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas al cultivo del palto

- La riqueza de rizobacterias pertenecientes al género *Bacillus* fue del orden  $1 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$  cel/ml, mientras que para *Pseudomonas* fue de  $24 \times 10^4$  a  $11 \times 10^5$  NMP/ml.
- Las bacterias aisladas de la rizosfera de palto asociadas a *Bacillus spp.* y *Pseudomonas spp.* mostraron una eficiencia solubilizadora de fosfato tricalcico que varía desde el 100 por ciento al 300 por ciento.
- Las bacterias aisladas de la rizosfera de palto pertenecientes a la especie *P. putida* (P10 y P12) mostraron capacidad de producción de sideróforos.
- Las rizobacterias aisladas de la rizosfera de palto asociadas a *Bacillus spp.* y *Pseudomonas spp.* poseen actividad promotora del crecimiento vegetal asociada al incremento de biomasa tanto fresca como seca destacando las especies *B. subtilis* y *P. putida*.
- Las rizobacterias aisladas de la rizosfera de palto fueron identificadas molecularmente y corresponden a las especies: *P. putida* (99 por ciento), *L. macroides* (99 por ciento), *L. xylanilyticus* ((99 por ciento), *L. fusiformis* (99 por ciento), *B. subtilis* (99 por ciento) y *P. plecoglossicida* (99 por ciento).

## **5.2.Evaluación de la actividad antagonica de bacterias PGR aisladas de la rizosfera del palto sobre *P. cinnamomi* y *L. theobromae***

- La cepa Bac F (*B. subtilis*) y de P3 (*Pseudomonas putida*), mostraron actividad antagonica *in vitro* sobre *P. cinnamomi* con un halo de inhibición del 45 por ciento y de 47 por ciento respectivamente; frente a *L. theobromae* fue de 33.33 por ciento para la Bac F, mientras que la P3 no mostró ningún efecto. A nivel de invernadero la cepa de *Bacillus* redujo la severidad de los síntomas ocasionados por el patógeno e incrementó significativamente la longitud y el peso seco de la raíz, además del número de hojas y peso seco de la parte aérea de la planta comparado con la planta inoculada solo con el patógeno, mostrando su capacidad promotora de crecimiento.

## **5.3.Evaluación del efecto de la co-inoculación bacteria-micorriza sobre el crecimiento de plántones de palto var. Zutano bajo condiciones de infección con *P. cinnamomi***

- Sobre los parámetros de crecimiento en plántones del portainjerto de palto de la var. Zutano en condiciones de infección por *P. cinnamomi*, se evidenció efecto sinérgico positivo entre las micorrizas de costa y *B. subtilis* sobre la mejora de la longitud de raíz, de igual manera cuando se inoculan en conjunto micorrizas de selva y *B. subtilis* sobre el número de hojas.
- Tanto *P. putida* como *B. subtilis* en ausencia de micorrizas tiene amplia actividad sobre el crecimiento de los plántones de palto en especial la acumulación de biomasa. Respecto a la mejora en la toma de nutrientes, la acumulación de nitrógeno y azufre se ve favorecida por la inoculación de *P. putida* sin interacción con las micorrizas.
- Existe interacción positiva entre las micorrizas de costa en especial comparado a las micorrizas de selva, con las bacterias antagonistas *B. subtilis* y *P. putida*, en el incremento de la absorción de calcio, magnesio y potasio.

**5.4.Evaluación del efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento de *P. americana* var. Zutano bajo condiciones de estrés salino**

- *P. plecoglossicida* y *B. subtilis* disminuyen la acumulación de los iones cloro y sodio; mientras que aumentan la acumulación de potasio en las hojas de palto y disminuyen los iones cloro y sodio mientras aumentan la acumulación de potasio en las raíces.

**5.5.Evaluación del efecto de la inoculación de micorrizas arbusculares sobre el crecimiento de *Persea americana* var. Zutano bajo condiciones de estrés salino**

- Las micorrizas arbusculares disminuyen en condiciones de salinidad, el impacto de esta mejorando el crecimiento vegetal y disminuyendo la acumulación de iones cloro y sodio en hojas y raíces por debajo del control donde no se aplicaron micorrizas.



## **VI. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda en general profundizar el estudio de microorganismos asociados al cultivo del palto, debido a que es un cultivo que se proyecta a crecer durante los próximos años y en virtud de ello demandará insumos como agua, fertilizantes y pesticidas que podrían generar un alto impacto sobre los ecosistemas agrícolas en desmedro de los recursos y la calidad acorde a las normas de exportación. El estudio de estos microorganismos debe apuntar al desarrollo de un paquete tecnológico agronómico que posibilite un cultivo sustentable para uno de los cultivos más importantes en Perú y el que probablemente domine el mercado durante varios años. Aparecerán nuevas plagas y enfermedades junto con el aumento de las áreas cultivadas, como ha sucedido ya en otras experiencias en la agroindustria peruana; así como se demandará nutrientes al suelo cuya carga no podrá ser soportada bajo el esquema tradicional agrícola y al igual como pasó con otros cultivos como el espárrago pueda dejarse de lado debido al incremento de sus costos y los daños colaterales del sistema tradicional agrícola en desacuerdo con el ambiente y su fauna microbiana, que bien entendida e inteligentemente empleada puede ser una tecnología clave en el desarrollo del Perú. Para ello y como recomendación adicional se debe profundizar en el escalamiento de estos bioinsumos para ponerlos a disposición de nuestros agricultores.

- Evaluar el efecto de *B. subtilis* en el control de *P. Cinnamomi* y *L. theobromae* en campos experimentales primero para validar los resultados obtenidos en la presente tesis y luego en campos comerciales y /o de agricultor. También evaluar el efecto de *P. putida* en condiciones de suelos salinos en campos campos experimentales primero y luego en campos comerciales y /o de agricultor, con la finalidad de cuantificar su aporte en la reducción del daño por sales. Además, determinar el efecto de co-inoculación para medir las interacciones entre los microorganismos rizosféricos del palto así también como con las micorrizas y su influencia en el crecimiento y desarrollo del palto.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akarm, W; Mahboob, A; Javed, A. 2013. *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *European Journal of Microbiology and Immunology*, **3**, 275– 280.

Agencia Agraria de Noticias (AGRARIA.PE). 2023. En Perú hay 51 mil hectáreas destinadas al cultivo de palta Hass, distribuidas aproximadamente entre 8 mil productores. Lima, Perú. <https://agraria.pe/noticias/en-peru-hay-51-mil-hectareas-destinadas-al-cultivo-de-palta--29046>

Alama, I; Maldonado, E; Rodríguez-Gálvez, E. 2006. *Lasiodiplodia theobromae* affect the cultivation of Palto (*Persea americana*) under the conditions of Piura, Peru. *Universalia*, **11**, 4–13.

Arteaga, W. 2016. Perspectivas globales para el mango y la palta peruana. *Revista Red Agrícola Perú* **34**. 60-61.

Barrientos, A; Muñoz, J; Reyes, M; Borys, W; Martínez, M. 2015. Taxonomía, cultivares y portainjertos. D. Téliz y A Mora (Ed.), *El aguacate y su manejo integral* (pp. 29-62). Montecillo, México, Colegio de Posgraduados.

Bashan, Y; Kamnev A; De-Bashan L. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol Fertil Soils*; **49**: 465-79.

Bayram, S; Tekintaş, FE; Aşkin, MA. 2014. Anatomical and histological researches on rootstock and scion compatibility in early period after grafting in avocado. *Derim*.

Bender, G. 2012. Avocado botany and commercial cultivars grown in California. In Avocado production in California a cultural handbook for growers. Publication The University of California, Cooperative Extension, San Diego County and The California Avocado Society, Supported by the California *Avocado Commission*. *Second edition*. p. 2-15.

Barra, PJ; Inostroza, NG; Mora, ML; Crowley, DE; Jorquera, MA. 2017. Bacterial consortia inoculation mitigates the water shortage and salt stress in an avocado (*Persea americana* Mill.) nursery. *Applied Soil Ecology*, *111*, 39-47.

Barnett, HL; Hunter BB. 1999. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society Press. United States of America. 218 p.p.

Bernstein, N; Meiri, A; Zilberstaine, M. 2004. Root growth of avocado is more sensitive to salinity than shoot growth. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129:188-192.

Beset-Manzoni, Y; Rieusset, L; Joly, P; Comte, G; Prigent-Combaret, C. 2018. Exploiting rhizosphere microbial cooperation for developing sustainable agriculture strategies. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(30), 29953-29970.

Bezuidenhout, NM; Du Toit, ES; Robbertse, PJ. 2016. Finding the best polliniser for ‘Hass’ avocado and the effect of honeybees as pollinators. *Afr. Avocado Grow. Assoc. Yearb*, *39*, 70-75.

Bhore, SJ; Ochoa, DS; Al Houssari, A; Zelaya, AL; Yang, R; Chen, Z; Eltantawy, E. 2021. The Avocado (*Persea americana* Mill.): A Review and Sustainability Perspectives.

Bourles, A; Guentas, L; Charvis, C; Gensous, S; Majorel, C; Crossay, T; Amir, H. 2020. Co-inoculation with a bacterium and arbuscular mycorrhizal fungi improves root colonization, plant mineral nutrition, and plant growth of a *Cyperaceae* plant in an ultramafic soil. *Mycorrhiza*, *30*(1), 121-131.

Bui, EN. 2013. Soil salinity: A neglected factor in plant ecology and biogeography. *Journal of Arid Environments*, *92*, 14-25.

Cao, Y; Zhang, ZH; Ling, N. 2011. *Bacillus subtilis* SQR9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils*, **47**, 495– 506.

Carreón Abud, Y; Aguirre Paleo, S; Gavito, ME; Mendoza Solís, DJ; Juárez Chávez, R; Martínez Trujillo, M; Trejo Aguilar, D. 2014. Arbuscular mycorrhizal inoculation in avocado rootstocks cv Hass in nurseries of Michoacan, Mexico. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, **5**(5), 847-857.

Cardona, WA; Gutiérrez, JS; Monsalve, OI; Bonilla, CR. 2017. Salinity effect on the vegetative growth of Andean blackberry plants (*Rubus glaucus* Benth.) inoculated and non-inoculated with mycorrhizal fungi. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, **11**(2), 253-266.

Castro, M; Fassio, C. 2015. Innovación, desarrollo y transferencia de tecnología de plantines clonales de palto em Chile. In: Congreso mundial de la palta, 8. Lima. *Actas*, p.34-36.

Cazorla, FM; Romero, D; Pérez-García, A; Lugtenberg, BJ; Vicente, AD; Bloemberg, G. (2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of applied microbiology*, **103**(5), 1950-1959.

Chávez, J. 2012. Manual de laboratorio de fisiología vegetal. Editado por la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. 71 p.

Chowdhury, SP; Dietel, K; Rändler, M. 2013. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS ONE*, **8**(7), e68818.

Chu, TN; Tran, BT; Hoang, MT. 2019. Plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* PS01 induces salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC research notes*, **12**(1), 1-7.

Colavolpe, MB; Silva, MD; Maguire, VG; Costa, A; Videira e Castro, I; Ruiz, OA. 2020. Antagonistic compounds from controversial bacteria with suppressing effects on the diseases caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53(1-2), 70-81.

Costa-Gutierrez, SB; Lami, MJ; Caram-Di Santo, MC; Zenoff, AM; Vincent, PA; Molina-Henares, MA; De Cristóbal, RE. 2020. Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: Role of ept A. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(10), 4577-4592.

De-Bashan, E; Holguin, G; Glick, R; Bashan, R. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macro-fauna, control biológico, planta- 66 microorganismo. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. Chapter 8. Published by: Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. pp. 170-224.

Diario Gestión. 2014. Palta Hass: Alistan 2,000 nuevas hectáreas de cultivos con una inversión de US\$ 50 millones. Consultado el 25 de ago. 2019. Disponible en <https://gestion.pe/economia/palta-hass-alistan-2-000-nuevas-hectareas-inversion-us-50-millones-256181>

Díaz-Franco, A., Aguado-Santacruz, A., Rosas-Quijano, R., Vázquez-Ovando, A., & Gálvez-López, D. (2018). Cepas microbianas con potencial para sustituir la fertilización inorgánica de sorgo dulce (*Sorghum bicolor*). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(3), 405-416.

Eisenman, HC; Greer, EM; McGrail, CW. 2020. The role of melanins in melanotic fungi for pathogenesis and environmental survival. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(10), 4247-4257.

- Etesami, H; Alikhani, HA; Mirseyed Hosseini, H. 2015. Indole-3-acetic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: bacterial traits required in rhizosphere, rhizoplane and/or endophytic competence by beneficial bacteria. *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*, 183-258.
- Elahi, E; Weijun, C; Zhang, H; Nazeer, M. 2019. Agricultural intensification and damages to human health in relation to agrochemicals: Application of artificial intelligence. *Land use policy*, 83, 461-474.
- Egamberdieva, D; Wirth, S; Bellingrath-Kimura, SD; Mishra, J; Arora, NK. 2019. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in microbiology*, 10, 2791.
- Etebu, E; Osborn, A. 2012. Review of Indicators of Healthy Agricultural Soils with Pea Footrot Disease Suppression Potentials. *Sustainable Agriculture Research*, vol. 1, no. 2. pp. 10-35. ISSN 1044-0046.
- Fazal, A; Bano, A. 2016. Role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), biochar, and chemical fertilizer under salinity stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(17), 1985-1993.
- Faust, F; Schubert, S. 2016. Protein synthesis is the most sensitive process when potassium is substituted by sodium in the nutrition of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 237-247.
- Ferreira, NC; Mazzuchelli, RD; Pacheco, AC; Araujo, FF; Antunes, JE; Araujo, SD. 2018. *Bacillus subtilis* improves maize tolerance to salinity. *Ciência Rural*, 48(8).
- Franciosi, R. 1991. *Manual del cultivo de frutales*. Trujillo: Edias.
- Gao, ZF; Zhang, BJ; Liu, HP; Han, JC. 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 105, 27– 39.

García, S; Alvarez, P. 2012. Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcáreos del Valle del Mantaro. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.

Gagic, V; Kleijn, D; Báldi, A; Boros, G; Jørgensen, HB; Elek, Z; Bommarco, R. 2017. Combined effects of agrochemicals and ecosystem services on crop yield across Europe. *Ecology Letters*, 20(11), 1427-1436.

Gómez, PM., Berdugo, EB; Valencia, CM. 2017. Bioprospecting of fungi mycorrhizal as an alternative for the strengthening of the cultivation of avocado (*Persea americana* Miller) in Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1), 71-79.

Ghosh, PK; De, TK; Maiti, TK. 2018. Role of ACC deaminase as a stress ameliorating enzyme of plant growth-promoting rhizobacteria useful in stress agriculture: a review. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*, 57-106.

Gotor-Vila, A; Teixidó, N; Di, FA; Usall, J. 2017. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*, 64, 219– 225.

Guevara-Avenidaño, E; Carrillo, JD; Ndinga-Muniania, C; Moreno, K; Méndez-Bravo, A., Guerrero-Analco, JA; Reverchon, F. 2018. Antifungal activity of avocado rhizobacteria against *Fusarium euwallaceae* and *Graphium* spp., associated with *Euwallacea* spp. nr. *fornicatus*, and *Phytophthora cinnamomi*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(4), 563-572.

Gutiérrez, L. 2019. Inoculación de bacterias endófitas en Palto (*Persea americana* Mill) cv. Zutano en vivero, Trujillo-La Libertad.

Hardham, AR; Blackman, LM. 2018. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular plant pathology*, 19(2), 260-285.

Hernández-Salmerón, J; Hernández, B; Loeza, P; Santoyo, G. 2018. Hongos fitopatógenos modulan la expresión de los genes antimicrobianos *phlD* Y *hcnC* de la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* UM270. *Biotechnia*, [S.l.], v. 20, n. 2, p. 110-116, may 2018. ISSN 1665-1456.

Disponible en:



<<https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/609>>. Fecha de acceso: 08 nov. 2019

Hunter, SR. 2018. Determining the risk of phosphite tolerance in *Phytophthora* species in New Zealand and the United States: a case study on the implications of long-term use of phosphite to control *Phytophthora cinnamomi* in avocado (*Persea americana*) (Doctoral dissertation, The University of Waikato).

Hurtado-Fernández, E; Fernández-Gutiérrez, A; Carrasco-Pancorbo, A. 2018. Avocado fruit—*Persea americana*. In *Exotic fruits* (pp. 37-48). Academic Press.

Iriti, M; Vitalini, S. 2020. Sustainable crop protection, global climate change, food security and safety—Plant immunity at the crossroads. *Vaccines*, 8(1), 42.

Jena, N. 2012. *Pseudomonas* and *Trichoderma*: The most effective bio-control agents against damping off pathogens of vegetable crops. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, vol. 14, no. 2, pp. 295-298. ISSN 0972-3005.

Jeffries, P; Gianinazzi, S; Perotto, S; Turnau, K; Barea, JM. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and fertility of soils*, 37(1), 1-16.

Jeon, JS; Lee, SS; Kim, HY; Ahn, TS; Song, HG. 2003. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *J. Microbiol.* 41, 271–276.

Kadam, SB; Pable, AA; Barvkar, VT. 2020. Mycorrhiza induced resistance (MIR): a defence developed through synergistic engagement of phytohormones, metabolites and rhizosphere. *Functional Plant Biology*, 47(10), 880-890.

Kapulnik, Y. 2002. Plant growth promoting by rhizosphere bacteria. Plant roots the hidden half. Ed Marcel Dekker. Nueva York. Estados Unidos de América. 869-887P.

Karakurt, H; Aslantas, R. 2010. Effects of some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains on plant growth and leaf nutrient content of apple. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18(1), 101-110.

- Khan, AG. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 355–364. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.02.006
- Kim, YG; Kang, HK; Kwon, KD; Seo, CH. 2015. Antagonistic activities of novel peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* PT14 against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**, 10380– 10387.
- Kumar, A; Maurya, BR; Raghuwanshi, R. 2014. Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 121–128.
- Kurbetli, İ; Sülü, G; Aydoğdu, M; Woodward, S; Bayram, S. 2020. Outbreak of *Phytophthora cinnamomi* causing severe decline of avocado trees in southern Turkey. *Journal of Phytopathology*, 168(9), 533-541.
- Lara, C; Esquivel, L; Negrete, J. 2011. Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba Colombia. *Revista Biotecnología Agropecuaria y Agroindustrial*, 9(2), 114- 120.
- Lastochkina, O; Pusenkova, L; Yuldashev, R; Babaev, M; Garipova, S; Blagova, DY; Aliniaiefard, S. 2017. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L.(wheat) under salinity. *Plant physiology and Biochemistry*, 121, 80-88.
- Leal, JM; Castaño, J; Bolaños, MM. 2014. Manejo de la pudrición radical (*Phytophthora cinnamomi* RANDES) del aguacate (*Persea americana* LINNEO). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 17(1), 105-114.
- Lema, E; Machunda, R; Njau, KN. 2014. Agrochemicals use in horticulture industry in Tanzania and their potential impact to water resources. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(2), 831-842.

López-Bucio J; Campos-Cuevas JC; Hernández-Calderón E; Velásquez-Becerra C; Farías-Rodríguez R; Macías-Rodríguez LI, et al. 2007. Las rizobacterias de *Bacillus megaterium* promueven el crecimiento y alteran la arquitectura del sistema radicular a través de un mecanismo de señalización independiente de auxina y etileno en *Arabidopsis thaliana*. Mol. Planta-Microbio En; 20: 207–217.

Lucy, M; Reed, E; Glick, BR. 2004. Application of free living plant-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86, 1–25. doi: 10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e

Mamani, J. 2017. *Pseudomonas* de rizosfera de palto (*Persea americana* Mill.) con actividad biocontroladora de *Phytophthora cinnamomi* Rands, aisladas en costa central del Perú. tesis para optar el título de ingeniero agrónomo Lima – Perú. Disponible en <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2762/P34-M35-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mamani, J; Aragón, L. 2018. *Pseudomonas* of the rhizosphere of avocado (*Persea americana* Mill.) with biocontrol activity of *Phytophthora cinnamomi* Rands isolated in the central coast of Peru. *Peruvian Journal of Agronomy*, 2(3), 35-43.

Martínez, C. 2010. Diversidad y selección de *Pseudomonas* fluorescentes provenientes de la rizosfera y suelo como promotores de crecimiento y desarrollo de plantas de papa. UNALM. Lima, Perú. 32-49 p.

Martínez, F; De Antonio, L; Aguilera, E; Araujo, G; Ortiz, L; Rojas, E; Gamboa, M y Boshell, F. 2015. Aptitud agroclimática e identificación de nichos productivos de bajo riesgo a deficiencias hídricas para aguacate en El Tambo, Colombia. En Actas VIII Congreso Mundial de la Palta. Manejo de técnicas y de cultivo (342-348). Lima, Perú

Marques, GC; Pires, C; Moreira, H; Rangel, SS; Castro, PM. 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1229–1235. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.04.014

Maathuis, FJ. 2014. Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany*, 65(3), 849-858.

Mehetre, S; Mukherjee, P. 2015. *Trichoderma* improves nutrient use efficiency in crop plants. In A. Rakshit, H. Singh, y A. Sen (eds), *Nutrient use efficiency: from basic to advances New Delhi, India, Springer*. pp. 173-180

Méndez-Bravo, A; Cortazar-Murillo, EM; Guevara-Avenidaño, E; Ceballos-Luna, O; Rodríguez-Haas, B; Kiel-Martínez, AL; Reverchon, F. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. *PLoS One*, 13(3), e0194665.

Mendis, HC; Thomas, VP; Schwientek, P; Salamzade, R. 2018. Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. *PLoS ONE*, 13, e0193119.

Mickelbart, M; Melser S; Arpaia, M. 2007. Salinity-induced changes in ion concentrations of Hass avocado trees on three rootstocks. *J. Plant Nutr.* 30:105-122.

Ministerio de Agricultura y Riego del Perú. 2019. La Situación del Mercado Internacional de la Palta: Su análisis desde una perspectiva de las exportaciones peruanas. Lima, Perú. 41 pp. <http://minagri.gob.pe/portal/analisis-economico/analisis-2019?download=14480:la-situacion-del-mercado-internacional-de-la-palta&start=20>

Mokrani, S; Nabti, EH; Cruz, C. 2020. Current advances in plant growth promoting bacteria alleviating salt stress for sustainable agriculture. *Applied Sciences*, 10(20), 7025.

Molina, M; Santiago, R; Blanco, A; Pozo J; Colino, M; Palo, E; Torres-Vila, L. 2003. Detección de *Phytophthora cinnamomi* en dehesas de Extremadura afectadas por seca y su comportamiento *in vitro*. *Bol Sanid Veg Plagas* 29:627–640. [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf\\_plagas\\_2FBSVP-29-04-627-640.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_plagas_2FBSVP-29-04-627-640.pdf). Accessed 5 Nov 2019

- Mora, A; Téliz, D; Mora, G; Etchevers, J. 2007. Tristeza del aguacate (*Phytophthora cinnamomi*). En: El aguacate y su manejo integrado. Mundi prensa. Pp 192-201.
- Muhammad, S; Zafar, I; Ahmad, S; Muhammad, A. 2009. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.) *Pak. J. Bot.* 41(1):359-368.
- Newett, S; Crane, J; Balerdi, C. 2002. Cultivars and rootstocks. In Whiley A. W; Schaffer, B; Wolstenholme, B. The Avocado. *CABI publishing*. p. 161-187.
- Odoh, CK; Sam, K; Zabbey, N; Eze, CN; Nwankwegu, AS; Laku, C; Dumpe, BB. 2020. Microbial Consortium as Biofertilizers for Crops Growing Under the Extreme Habitats. In *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture* (pp. 381-424). Springer, Cham.
- Orberá, T; Serrat, M; Ortega, E. 2014. Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. *Biotecnología Aplicada* 31: 7-12.
- Orozco, I; Vargas, C; Cabezas, M; Cuervo, J. 2010. Colonización micorrícica en plantas de aguacate (*Persea americana* L.). *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, vol. 13, no. 2, pp. 51-60. ISSN 0123-4226.
- Parida, S; Das, A. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.
- Peix, A; Ramírez-Bahena, MH; Velázquez, E. 2018. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update. *Infection, Genetics and Evolution*, 57, 106-116.
- Picos, P; García, R; León, J; Sañudo, A; Allende, R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 54-74.
- Porcel, R; Aroca, R; Azcon, R; Ruiz-Lozano, JM. 2016. Regulation of cation transporter genes by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice plants subjected to salinity suggests improved salt tolerance due to reduced Na<sup>+</sup> root-to-shoot distribution. *Mycorrhiza*, 26(7), 673-684.

- Pompeiano, A; Giannini, V; Gaetani, M; Vita, F; Guglielminetti, L; Bonari, E; Volterrani, M. 2014. Response of warm – season grasses to N fertilization and salinity. *Scientia Horticulturae*, 177, 92-98.
- Qiu, F; Tan, XH; Xie, CP; Xu, G; Li, X., Zheng, FQ; Wang, WL. 2020. First Report of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Branch Blight on Avocado in China. *Plant Disease*, 104(10), 2728-2728.
- Raaijmakers, J; Vlami M; De Souza, J. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 537-547.
- Ramírez-Gil, JG; Morales-Osorio, JG. 2020. Integrated proposal for management of root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* in avocado cv. Hass crops. *Crop Protection*, 137, 105271.
- Ramírez-Gil, JG., Ramelli, EG; Osorio, JG. 2017. Economic impact of the avocado (cv. Hass) wilt disease complex in Antioquia, Colombia, crops under different technological management levels. *Crop protection*, 101, 103-115.
- Raza, W; Wang, J; Wu, Y. 2016. Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1– 12.
- Reyes-Tena, A; Rincón-Enríquez, G; López-Pérez, L; Quiñones-Aguilar, EE. 2017. Effect of mycorrhizae and actinomycetes on growth and bioprotection of *Capsicum annuum* L. against *Phytophthora capsici*. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(3).
- Rodríguez-Gálvez, E; Maldonado, E; Alves, A. 2015. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 141, 477–489.
- Rodríguez-Gálvez, E; Guerrero, P; Barradas, C; Crous, PW; Alves, A. 2017. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology*, 121, 452–465.

Rodríguez-Gálvez, E; Hilário, S; Lopes, A; Alves, A. 2020. Diversity and pathogenicity of *Lasiodiplodia* and *Neopestalotiopsis* species associated with stem blight and dieback of blueberry plants in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 157, 89–102.

Rubinstein, M; Eshed, R; Rozen, A; Zviran, T; Kuhn, DN; Irihimovitch, V; Ophir, R. 2019. Genetic diversity of avocado (*Persea americana* Mill.) germplasm using pooled sequencing. *BMC genomics*, 20(1), 1-10.

Ruiz, S. 2021. Nutrición del palto: efecto sobre desórdenes y condición de frutos. *Revista Red Agrícola*.

Ryu, CM; Farag, MA; Hu, CH. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3), 1017– 1026.

Sagar, A; Rathore, P; Ramteke, PW; Ramakrishna, W; Reddy, MS; Pecoraro, L. 2021. Plant growth promoting rhizobacteria, arbuscular mycorrhizal fungi and their synergistic interactions to counteract the negative effects of saline soil on agriculture: key macromolecules and mechanisms. *Microorganisms*, 9, 1491.

Sahin, U; Ekinci, M; Kiziloglu, FM; Yildirim, E; Turan, M; Kotan, R; Ors, S. 2015. Ameliorative effects of plant growth promoting bacteria on water-yield relationships, growth, and nutrient uptake of lettuce plants under different irrigation levels. *Hortscience*, 50(9), 1379-1386.

Saleem, M; Arshad, M; Hussain, S; Bhatti, AS. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(10), 635-648.

Santander, C; Ruiz, A; García, S; Aroca, R; Cumming, J; Cornejo, P. 2020. Efficiency of two arbuscular mycorrhizal fungal inocula to improve saline stress tolerance in lettuce plants by changes of antioxidant defense mechanisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1577-1587.

Santander, C; Sanhueza, M; Olave, J; Borie, F; Valentine, A; Cornejo, P. 2019. Arbuscular mycorrhizal colonization promotes the tolerance to salt stress in lettuce plants through an

efficient modification of ionic balance. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19(2), 321-331.

Santoyo, G; Orozco-Mosqueda, MC; Govindappa, M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review. *Biocontrol Science and Technology*, 22, 855– 872.

Schaffer, PM. Gil, MV; Mickelbart; A. Whiley, W. 2013. Ecophysiology. In: The Avocado: Botany, Production and Uses, 2nd Edition. B. Schaffer, B.N. Wolstenholme and A.W. Whiley (eds.), CAB International Press, Wallingford, U.K.

Segura, M; Rodríguez, J; Chico-Ruiz. 2015. Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones de laboratorio. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo*, 35(2), 47-52.

Shafi, J; Tian, H; Ji, M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: A review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31, 446– 459.

Shrivastava, P; Kumar, R. 2014. Soil salinity: A serious environmental issues and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 123-131.

Shu, B; Liu, L; Jue, D; Wang, Y; Wei, Y; Shi, S. 2017. Effects of avocado (*Persea americana* Mill.) association on arbuscular mycorrhizal and root hair development in rootstock. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(14), 1951-1962.

Singh, AK; Singh, A; Aswin, C; Shashidhar, KS. 2020. Evaluation of agro-chemicals for enhancing the productivity and profitability of late-sown Indian mustard (*Brassica juncea*) under acidic soils of Manipur. *Indian Journal of Agronomy*, 65(1), 94-99.

Silva, VD. 2019. Avaliação do desenvolvimento da *Salicornia ramosissima* submetida à irrigação com água salina e à presença de micorriza arbuscular.



Srivastava, S; Srivastava, S. 2020. Prescience of endogenous regulation in *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas putida* MTCC 5279 under phosphate starved salinity stress condition. *Scientific reports*, 10(1), 1-15.

Sotomayor, A; Gonzáles, A; Cho, KJ; Villavicencio, A; Jackson, T; Viera, W. 2019. Effect of the application of microorganisms on the nutrient absorption in avocado (*Persea americana* Mill.) seedlings. *한국국제농업개발학회지*, 31(1), 17-24.

Sumida, CH; Fantin, LH; Braga, K; Canteri, MG; Homechin, M. 2020. Control of root rot (*Phytophthora cinnamomi*) in avocado (*Persea Americana*) with bioagents. *Summa Phytopathologica*, 46(3), 205-211.

Syed-Ab-Rahman, SF; Carvalhais, LC; Chua, E; Xiao, Y; Wass, TJ; Schenk, P. M. 2018. Identification of soil bacterial isolates suppressing different *Phytophthora* spp. and promoting plant growth. *Frontiers in plant science*, 9, 1502.

Tahir, AS; Gu, G; Wu, HJ; Raza, W. 2017. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, 8, 171.

Tiessen H. 2008. Phosphorus in the global environment. In: White PJ, Hammond JP, editors. The ecophysiology of plant-phosphorus interactions. *Springer*; 2008. p.1-7.

Tofighi, C; Khavari-Nejad, RA; Najafi, F; Razavi, K; Rejali, F. 2021. Physiological and molecular responses of wheat plants to mycorrhizal and epibrassinolide interactions under salinity. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 155(5), 1075-1080.

Tzec-Interián, JA; Desgarenes, D; Carrión, G; Monribot-Villanueva, JL; Guerrero-Analco, JA; Ferrera-Rodríguez, O; Ortiz-Castro, R. 2020. Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with avocado trees (*Persea americana* Miller) and their potential use in the biocontrol of *Scirtothrips perseae* (avocado thrips). *PloS one*, 15(4), e0231215.

Upadhyay, S; Singh, J; Singh, D. 2011. Exopolysaccharide Producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria Under salinity condition. *Pedosphere*, 21 (2), 214- 222.

Viera, W; Campaña, D; Gallardo, D; Vásquez, W; Viteri, P; Sotomayor, A. 2017. Native mycorrhizae for improving seedling growth in avocado nursery (*Persea americana* Mill.). *Indian Journal of Science and Technology* 10(25): 1-13.

Villablanca, I. 1994. Estudio comparativo de la distribución y densidad de raíces absorbentes en paltos (*Persea americana* Mill.) cv. Hass en función de los patrones de distribución uso consumo del agua en el suelo evaluados bajo dos sistemas de riego presurizado (goteo y microaspersión). 117p. Taller de Titulación, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Quillota, Chile.

Virgen, ME; Avila, ND; Velasco, CR; Esquivel, GL; Campos, OC; Ayón, CC. 2020. Identificación y actividad antagónica *in vitro* de aislados de bacterias contra hongos de importancia agrícola. *Revista Bio Ciencias*, 7, 12.

Wanjiku, EK; Waceke, JW; Wanjala, BW; Mbaka, JN. 2020. Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem end rots of avocado fruits in kenya. *International Journal of Microbiology*, 2020.

Walsh, F; Morrissey, P; O’Gara, F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 289-95.

Weller, D. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soil borne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology* 97:250-256.

Yang, C; Crowley, D; Menge, J. 2001. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. *Microbiology Ecology*, vol. 35, pp. 129-136. ISSN 0095-3628.

Zapata, J; Leal, J. 2018. Manejo integrado de la pudrición de raíces del aguacate (*Persea americana* Miller), causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Temas Agrarios*, 131-143.

Zhang, N; Wu, K; He, X; Li, SQ. 2011. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant and Soil*, 344, 87– 97.

Zhang, S; Gan, Y; Xu, B. 2016. Application of plant growth promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Frontiers in Plant Science* 7(1): 1-11.


Zhao, J; Wang, Y; Liang, H. 2018. The rhizosphere microbial community response to a bio-organic fertilizer: Finding the mechanisms behind the suppression of watermelon *Fusarium wilt* disease. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 17.

Zuñiga, O. 2009. Crecimiento de *Bacillus pumilus* productor de la auxina AIA, como base para formular un biofertilizante. (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Perú.

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Informes de análisis de suelos y plantas

1. Informe de análisis de fertilidad de suelo de la rizosfera de palto empleado en los aislamientos de bacterias promotoras

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



### INFORME DE ANALISIS DE SUELO - FERTILIDAD

SOLICITANTE : DRA. DORIS ZUÑIGA  
PROCEDENCIA : LA LIBERTAD/ VIRÚ  
REFERENCIA : H.R. 68602  
FECHA : 11/06/2019

Número Muestra		pH	CE <sub>(1:1)</sub>	CaCO <sub>3</sub>	M.O.	P	K	Al <sup>3+</sup> + H <sup>+</sup>
Lab	Claves	(1:1)	dS/m	%	%	ppm	ppm	meq/100
142		6.57	1.16	0.10	0.57	26.7	224	0.00

  
*Sady García Bendezú*  
Jefe del Laboratorio

---

Av. La Molina s/n Campus UNALM  
Telf.: 614-7800 Anexo 222 Teléfono Directo: 349-5622  
e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

2. Informe de análisis de calidad de agua empleada para riego en algunos ensayos



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES




ANALISIS DE AGUA

SOLICITANTE : DRA. DORIS ZUÑIGA  
PROCEDENCIA : LIMA/ LIMA/ LA MOLINA  
REFERENCIA : H.R. 69322

No. Laboratorio	470
No. Campo	25/07/2019
pH	7.02
C.E. dS/m	0.58
Calcio meq/L	4.42
Magnesio meq/L	0.73
Potasio meq/L	0.08
Sodio meq/L	0.78
SUMA DE CATIONES	6.01
Nitratos meq/L	0.02
Carbonatos meq/L	0.00
Bicarbonatos meq/L	2.25
Sulfatos meq/L	2.11
Cloruros meq/L	1.60
SUMA DE ANIONES	5.98
Sodio %	12.94
RAS	0.48
Boro ppm	0.22
Clasificación	C2-S1

La Molina, 02 de Agosto del 2019


  
 Ing. Bláudio La Torre Martínez  
 Jefe del Laboratorio

Av. La Molina s/n Campus UNALM  
 Telf.: 614-7800 Anexo 222 Teléfono Directo: 349-5622  
 e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

## Anexo 2. Composición de medios de cultivo

### 1. Medio Agar nutritivo

Reactivo	Para 1 L
Peptona de carne	5 g
Extracto de carne	3 g
Agar	15 g
pH	$7 \pm 0,2$

### 2. Medio National Botanical Research Institute, NBRIP (Beracochea, 2011) para solubilización de fosfatos

Componentes	g/L
glucosa	10
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
KCl	0.2
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5
agar agar	15
agua destilada	1000 mL

Para el caso del fosfato tricálcico se agregaron 5 g que equivalen a 1g de fósforo por litro de medio de cultivo, se calculó de la siguiente manera:

$$\text{PM} = 310$$

$$310 \longrightarrow 62 \text{ de P}$$

$$X \longrightarrow 1 \text{ de P}$$

X = 5 g

### 3. Caldo nutritivo

Reactivo	Para 1 L
Peptona de carne	5 g
Extracto de carne	3 g
pH	7 ± 0,2

### 4. Solución salina

Reactivo	Cantidades
Agua destilada	100 ml
NaCl	0.85g
pH	7 ± 0,2

### 5. Medio Cromo Azurol S (CAS) para sideróforos

	Reactivo	Cantidades
	Cromo Azurol S	0.06 g/50 ml agua destilada
Tinte azul	FeCl <sub>3</sub> -6H <sub>2</sub> O	0.0027 g/10 ml de HCL 10 mM
	Bromuro de cetiltrimetilamonio	0.073 g/40 ml agua destilada
Base	Proteasa	20g/l
medio	Sulfato de magnesio heptahidratado	1.5g/l
King B	Fosfato hidrógeno dipotásico	1.5g/l
	Agar	20g/l
	pH	7 ± 0,2

6. Agar papa dextrosa

Reactivo	Cantidades
Dextrosa	20g/l
Papa (infusión de hervido)	800 ml
Agar	15g/l
pH	5.5 ± 0,2

7. Agar cetrimide

Reactivo	Cantidades
Digerido pancreático de gelatina	20g/l
Cloruro de potasio	1.4g/l
Sulfato de potasio	10g/l
Glicerol	10 ml
Cetrimida	0.3 g/l
Agar	15g/l
pH	7 ± 0,2

8. Agar extracto de glucosa y triptona (TGE)

Reactivo	Cantidades
Extracto de carne	3g/l
Digestado enzimático de caseína	5g/l
Dextrosa	1g/l
Agar	15g/l
pH	7 ± 0,2



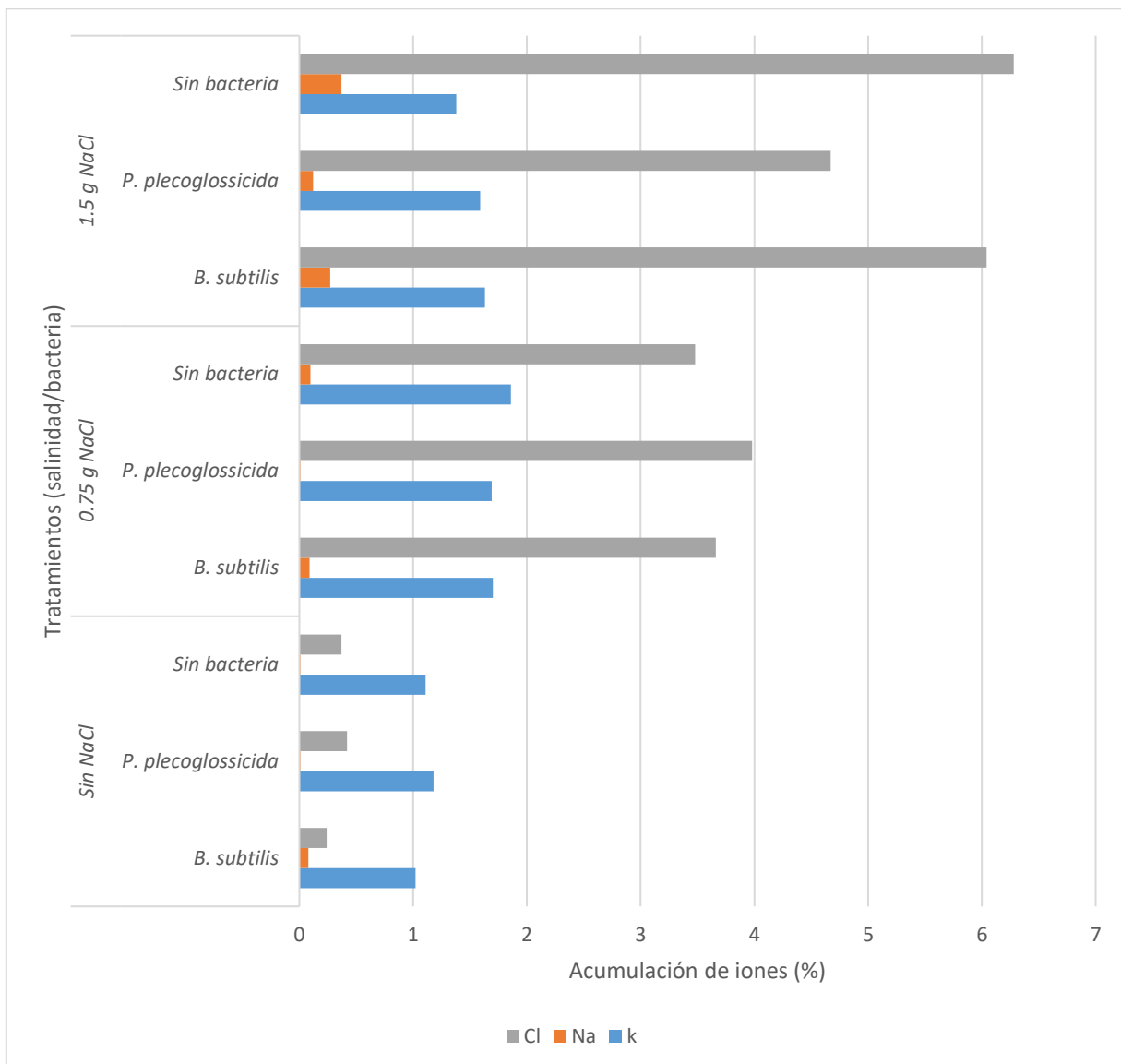
9. Agar harina de maíz

---

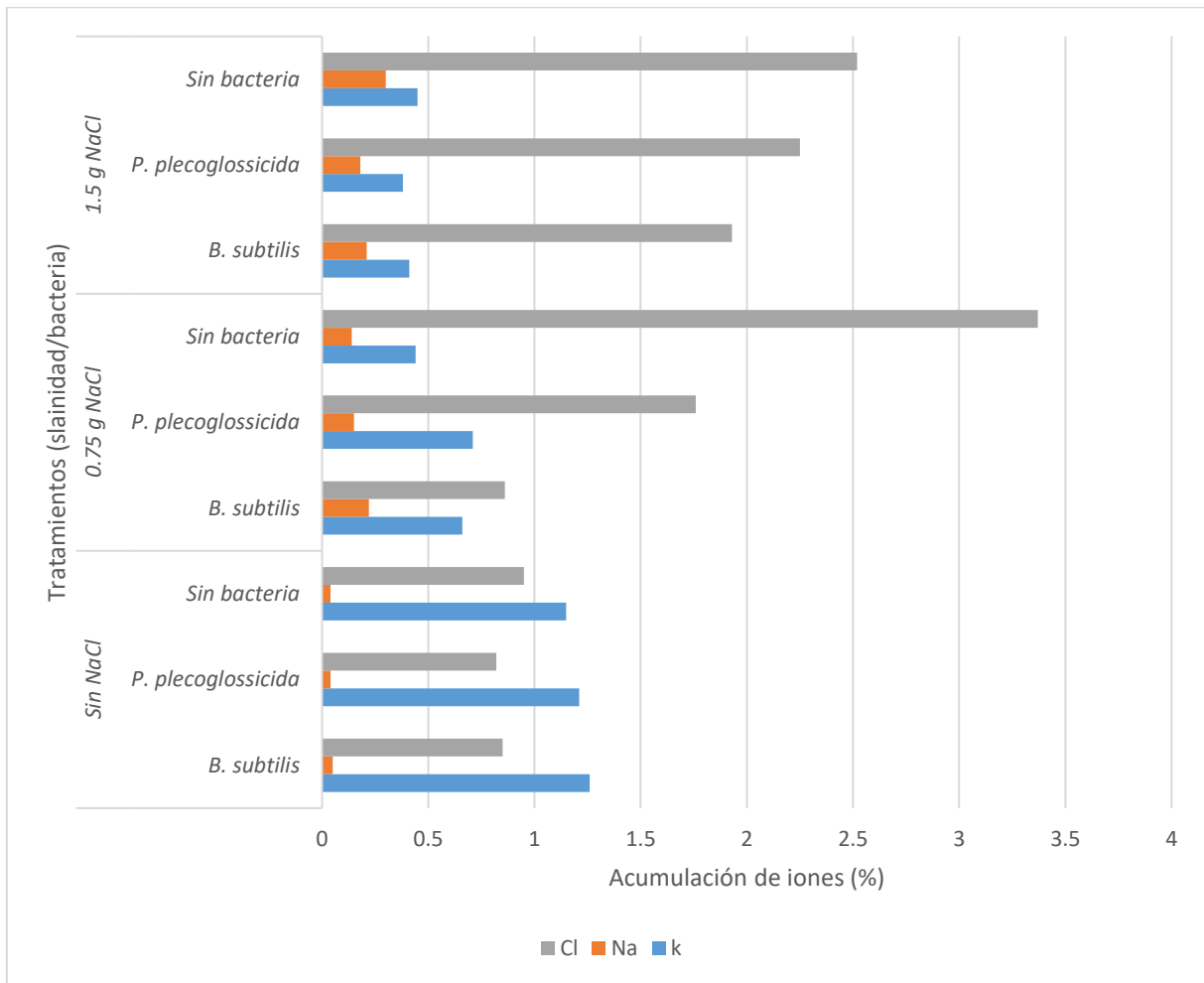
Reactivo	Cantidades
harina de maíz fina	2 g
Agar	15g/l
pH	5.5 ± 0,2

---

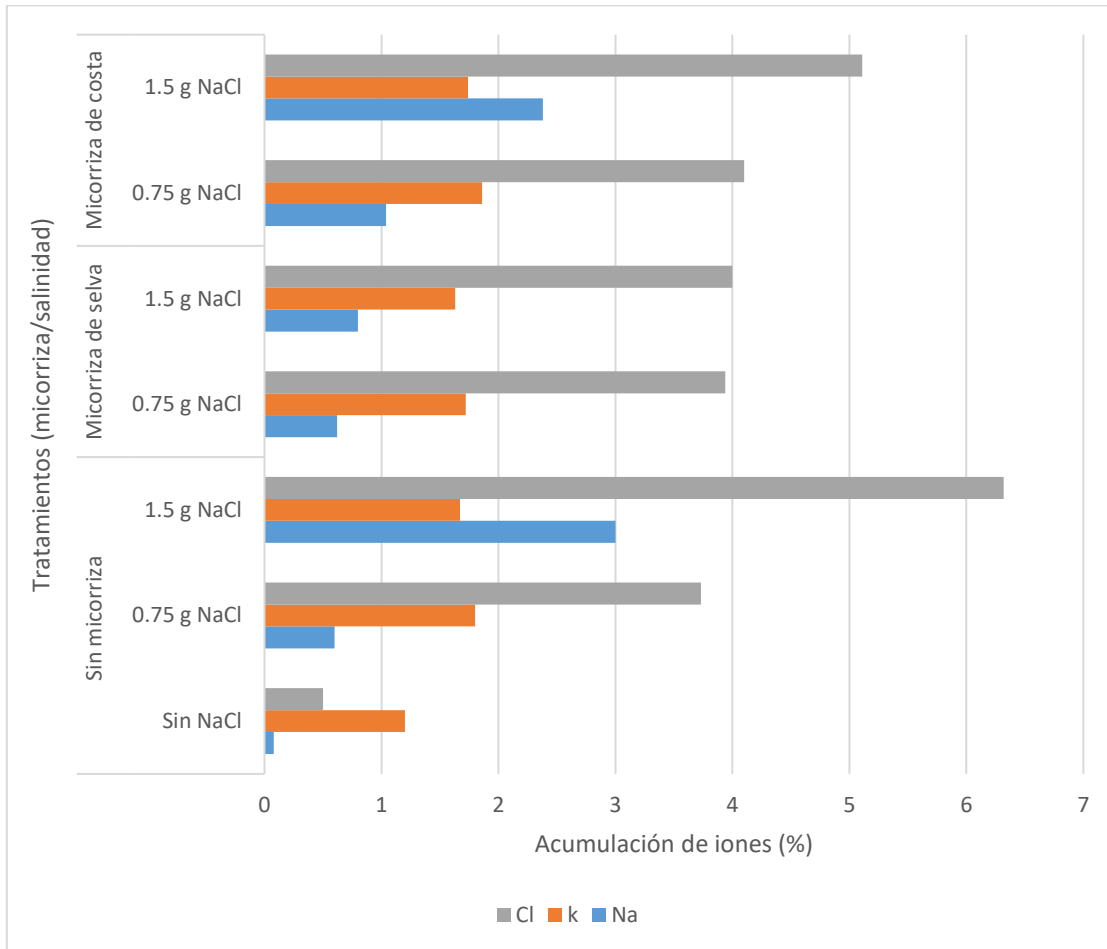
### Anexo 3. Figuras complementarias



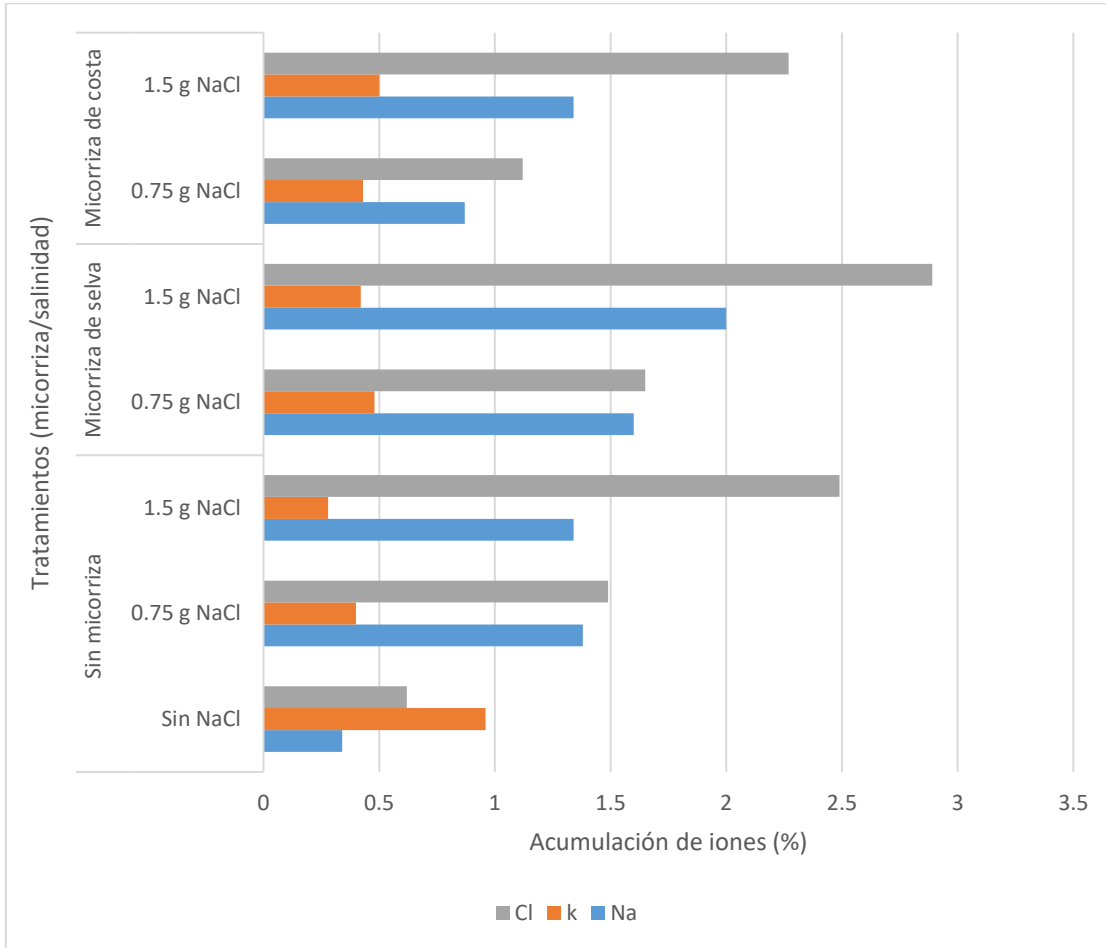
**Figura 32. Acumulación de iones salinos en hojas de plátones de *P. americana* var. Zutano inoculadas con bacterias PGP e inducidos a estrés por salinidad**



**Figura 33. Acumulación de iones salinos en raíces de plantones de *P. americana* var. Zutano inoculadas con bacterias PGP e inducidos a estrés por salinidad**



**Figura 34. Acumulación de iones salinos en hojas de plántulas de *P. americana* var. Zutano inoculadas con micorrizas arbusculares bajo estrés por salinidad**



**Figura 35. Acumulación de iones salinos en raíces de plantones de *P. americana* var. Zutano inoculadas con micorrizas arbusculares bajo estrés por salinidad**

