



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Influencia de la nutrición mineral y la actividad biológica rizosférica en la
disminución del daño ocasionado por *Phytophthora cinnamomi* Rands en
plántulas de Aguacate (*Persea americana* Mill)**

MILTON CESAR ARARAT OROZCO

Ing. Agrónomo *M. Sc.*

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
SEDE PALMIRA

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Influencia de la nutrición mineral y la actividad biológica rizosférica en la
disminución del daño ocasionado por *Phytophthora cinnamomi* Rands en
plántulas de Aguacate (*Persea americana* Mill)**

MILTON CESAR ARARAT OROZCO

Ing. Agrónomo *M. Sc.*

Trabajo de tesis como requisito parcial para optar al título de Doctor en
Ciencias Agropecuarias Línea de Investigación Manejo de Suelos y Aguas

Director

JUAN CARLOS MENJIVAR *Ph. D.*

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
SEDE PALMIRA

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGRARIAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN MANEJO DE SUELOS Y AGUAS

En Palmira a los 03 del mes de Octubre de 2013, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores NELSON VIRGILIO PIRANEQUE, DAGOBERTO CASTRO y CARLOS GERMÁN MUÑOZ P.

Para calificar la Tesis de Grado de:

MILTON CÉSAR ARARAT OROZCO

Titulada:

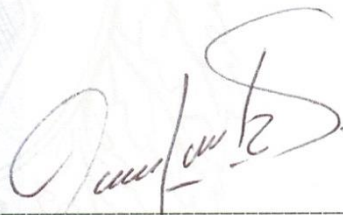
“INFLUENCIA DE LA NUTRICION MINERAL Y LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA RIZOSFÉRICA EN LA DISMINUCIÓN DEL DAÑO OCASIONADO PO *Phytophthora cinnamomi* Rands EN PLÁNTULAS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill)". Bajo la dirección de Juan Carlos Menjivar Flores, PhD.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los investigadores NELSON VIRGILIO PIRANEQUE, DAGOBERTO CASTRO y CARLOS GERMAN MUÑOZ P, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA


NELSON VIRGILIO PIRANEQUE


DAGOBERTO CASTRO


CARLOS GERMÁN MUÑOZ P

(Dedicatoria)

Para las personas que DIOS puso en mi corazón, a quienes les comparto la importancia de la fe, la alegría y la comprensión: con todo mi AMOR dedico a mis padres José Enrique y Gabriela, a mis hermanos Carlos Enrique y Luis Gabriel, a mi sobrino José Alessandro y a mi esposa Carolina Hernandez Rivera, quien me ha dado la felicidad y bendición de sentir muy cerca a mi hija LUCIANA.

Agradecimientos

De todo corazón, agradezco:

- A mi director Dr. Juan Carlos Menjivar por su apoyo y confianza.
- A La Corporación BIOTEC, en especial a la Dra. Myriam Sanchez y Sirleny Zapata por la cordialidad y valoración de mis esfuerzos.
- Al Dr. Danilo Rios (PROFRUTALES LTDA) por su atención y colaboración en la experimentación.
- A Dra. Elizabeth Alvarez (CIAT) y Juan Fernando Mejia por la asesoría y colaboración en temas de fitopatología.
- Al Dr. Felipe Macias por su inmenso apoyo durante mi pasantía en la Universidad de Santiago de Compostela (España).
- Al Dr. Franco Alirio Vallejo por su gran interés en mi proceso.
- Al interés de los profesores Carlos Escobar Ch., Edgar Madero, Harold Tafur, Yolanda Rubiano, Carmen R. Bonilla, Sanín Ortiz, Alvaro García.
- A todos los docentes administrativos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por su constante colaboración.
- A los compañeros Andres Aristizabal, Fanor Barney, Cesar Ospina, Diana Lucia Correa, Margarita Vallejo, Margarita Rosa Bonilla, Sandra Montenegro, Henry Velasquez, Raul Molina, Javier Restrepo, Edwin Restrepo, Sandro Ipaz, Ivan Paz, Herminio Paredes, Magda Narvaez, Oscar Sanclemente, Juan Carlos, Clever ... y muchos mas que saben que me aportaron momentos agradables en mi formación.
- A Marzory, Ana Milena, Socorro, Caliche, Ximena y muchos mas empleados que colaboraron con mucha amabilidad; también a la gente de CEUNP y los laboratorios de biología molecular, fitopatología, suelos y microscopía.
- A mis amigos de infancia y adolescencia Hader Tovar, Carlos Andres Lopez, Francisco Hurtado, Alex Orozco, Andres Meneses, Andres Herrera, Diego Bustamante y otros más que siempre estuvieron pendientes de mi culminación.
- A COLCIENCIAS por su apoyo económico.
- A otras personas entre familiares y amigos que de todas formas están en mi mente y mi corazón.

Resumen

Los estudios a nivel de rizósfera, el manejo de sustratos y nutrición de plántulas de aguacate y las evaluaciones fitosanitarias en fase de vivero, conllevan a la obtención de indicadores de calidad como la actividad biológica y enzimática en sustratos de enraizamiento para el control biológico o disminución de la pudrición de raíces ocasionada por *Phytophthora cinnamomi* Rands; La investigación se desarrolló en tres fases concernientes a la experimentación en campo, laboratorio y análisis de resultados; en la primera inicia con un diagnóstico del sistema de producción de plántulas en condiciones de vivero, para detectar la problemática fitosanitaria; posteriormente se realizaron pruebas con diferentes mezclas de sustratos, evaluando variables de respuesta química físicas y bioquímicas del sustrato y fisiológicas de las plántulas; se definió el método de inoculación del patógeno *in vivo* para aplicarlos en la fase dos de la investigación.

Se seleccionó un sustrato en la fase dos, donde se estableció un manejo preventivo fitosanitario de los sustratos con productos biológicos (*Trichoderma* spp) y fungistáticos (silicato de potasio) y las variables asociadas a la rizósfera de las plántulas, considerando la inoculación de *Phytophthora cinnamomi* Rands como principal agente causal en la pudrición de raíces (el método de inoculación se define en la fase uno).

En los resultados iniciales, los sustratos mostraron ser diferentes en densidad aparente, conductividad hidráulica, retención de humedad y distribución de poros de las diferentes mezclas de sustratos. La máxima retención de humedad y una alta cantidad de micro poros generaron mayor porcentaje de mortalidad; en la segunda fase se encontró una influencia directa del manejo del sustrato con la actividad enzimática de las celulasas y fosfatasas ácidas, obteniendo los mayores valores en los tratamientos donde no se inoculó *P. cinnamomi*.

La adición de los productos químicos para el manejo del pH como sulfato de amonio, el uso de enmiendas y la calidad de los materiales orgánicos, influyeron en las poblaciones de bacterias oxidantes de amonio y nitrito. A pesar de que la presencia de *P. cinnamomi* Rands influyó negativamente en la actividad microbiana (respirometría), hubo una marcada reducción de este patógeno por la fungistasis en tratamientos con silicato de potasio; también se relacionan los valores mas bajos de mortalidad de plántulas con los mas altos contenidos de calcio en tejido foliar.

Palabras claves: aguacate, rizósfera, celulasas, fosfatasas, *Phytophthora cinnamomi*, *Trichoderma harzianum*, silicato de potasio.

Summary

The rhizosphere level studies, handling of substrates and avocado seedling nutrition and plant health assessments in nursery phase, leading to the production of quality indicators such as biological and enzymatic activity in rooting substrates for biological control or reduction of root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands. The research was conducted in three phases concerning the experimental field, laboratory and analysis of results, in the first begins with an assessment of the production system of seedlings in nursery conditions for detecting problematic plant; subsequently tested with different mixtures of substrates by evaluating chemical response variables physical and biochemical and physiological substrate of seedlings; was defined pathogen inoculation method to apply in vivo in phase two of the investigation

Substrate was selected in phase two, which was established preventive phytosanitary management with organic substrates (*Trichoderma* spp) and fungistatic (potassium silicate) and the variables associated with the rhizosphere of seedlings, whereas inoculation of *Phytophthora cinnamomi* Rands as the main causal agent of root rot (inoculation method defined in phase one).

In the initial results, the substrates were shown to be different in bulk density, hydraulic conductivity, moisture retention and pore distribution of the different mixtures of substrates. The maximum moisture retention and a high amount of micro pores highest mortality generated, the second phase was found a direct influence of the substrate handling with the enzymatic activity of cellulases and acid phosphatases, obtaining greater values for the treatments not inoculated *P. cinnamomi*.

The addition of chemicals for pH management as ammonium sulfate, the use of amendments and quality of organic materials influenced populations ammonium oxidizing bacteria and nitrite. Although the presence of *P. cinnamomi* Rands negatively influenced microbial activity (respirometry), there was a marked reduction of this pathogen by antifungal of potassium silicate treatments; also relate the lowest values of seedling mortality with the highest content in leaf tissue calcium.

Keywords: avocado, rhizosphere, cellulases, phosphatases, *Phytophthora cinnamomi*, *Trichoderma harzianum*, potassium silicate.

Contenido

1. Introducción.....	15
2. Planteamiento del problema.....	20
3. Objetivo General	20
3.1 Objetivos Específicos.....	20
4. Marco teórico y estado del arte	21
4.1 Importancia de la Actividad rizosférica.....	21
4.1.1 Actividad enzimática rizosférica.....	21
4.1.2 Actividad microbiana en la rizósfera.....	25
4.2 Manejo de sustratos y evaluación en el crecimiento de plántulas.....	31
4.3 La Rizósfera de Aguacate y control preventivo de la pudrición.....	33
5. Materiales y métodos	36
5.1 Materiales y métodos fase 1.....	38
5.1.1 Localización del experimento.....	38
5.1.2 Diagnóstico del sistema de producción	38
5.1.3 Diseño experimental fase 1 (Evaluación de sustratos)	38
5.1.4 Descripción de los tratamientos	39
5.1.5 Descripción de la unidad experimental.....	39
5.1.6 Variables de respuesta fase 1.....	39
5.1.7 Métodos y técnicas fase 1.....	40
5.1.8 Análisis estadístico de la información fase 1.....	47
5.2 Materiales y métodos fase 2.....	47
5.2.1 Diseño experimental fase 2.....	47
5.2.3 Descripción de tratamientos.....	47
5.2.4 Descripción de los factores	49
5.2.5 Variables de respuesta fase 2.....	50
5.2.6 Métodos y técnicas fase 2.....	50
6. Resultados y discusión fase 1	53
6.1 Relación con el sistema de producción.....	53
6.2 Relación con Propiedades físicas en sustratos.....	65
6.3 Relación con Propiedades químicas en sustratos.....	71

6.4 Relación con respuestas biológicas.....	80
6.5 Pruebas de aislamiento e inoculación de <i>P. cinnamomi</i> Rands	91
6.6 Conclusiones fase uno.....	95
7. Resultados y discusión fase 2	97
7. 1 Actividad enzimática rizosférica.....	97
7.2 Microorganismos asociados a la rizósfera	101
7.3 Respuestas fisiológicas de las plántulas de aguacate	107
7.4 Conclusiones fase dos	120
8. Bibliografía.....	122
9. Anexos	137

Lista de figuras

Figura 1 Esquema de las fases de investigación.....	38
Figura 2 Descripción del diseño de tratamientos en la fase 2	48
Figura 3 Selección de semillas de aguacate.	54
Figura 4 Evaluación del tamaño de semillas sanas de aguacate.	54
Figura 5 Efecto del despunte de semillas de aguacate sobre el porcentaje de germinación.....	55
Figura 6 Efecto del despunte de semillas de aguacate en la germinación	56
Figura 7 Tamaño de yemas para injertos obtenidos de huertos de aguacate variedad Hass. (Foto BIOTEC, 2010).....	57
Figura 8 Injerto con diferencias entre el diámetro del patrón y las yemas de aguacate (Foto Ararat, 2010)	58
Figura 9 Injerto exitoso de la variedad Hass con 25 días de desarrollo en vivero	59
Figura 10 Identificación de limitantes en los sustratos: heterogeneidad de los tamaños de agregados del compost de cachaza	60
Figura 11 Distribución de costos en la obtención de plántulas de aguacate ..	61
Figura 12 Preparación convencional de sustratos con tamiz o malla	62
Figura 13 Diseño para una maquina mezcladora de sustratos.....	63
Figura 14 Valores de densidad aparente de los sustratos para porta injertos de aguacate	66
Figura 15 Determinación de la conductividad hidráulica en sustratos para portainjertos de aguacate	67
Figura 16 Determinación de curvas de retención de humedad de sustratos de plántulas de aguacate	69
Figura 17 Cambios en pH del sustrato convencional en el tiempo	72
Figura 18 Relación del pH y la conductividad eléctrica en diferentes sustratos	73
Figura 19 Cambios en pH de diferentes sustratos durante el tiempo de experimentación	74
Figura 20 Relación entre el aumento del numero de bacterias oxidantes de nitrito (NO ₂) y la macroporosidad de sustratos	82

Figura 21 Incremento de la actividad enzimática de celulasas en función del contenido de celulosa en sustratos	85
Figura 22 Valores determinados de Celulasas del suelo en función del pH...	86
Figura 23 Relación entre la longitud de raíces de plántulas de aguacate y la densidad aparente de los sustratos.....	87
Figura 24 Contenido hídrico relativo (CHR) en hojas	89
Figura 25 Comparación del contenido de azufre foliar de plántulas de aguacate con los niveles de referencia.....	91
Figura 26 Diferenciación visual de estructuras de <i>T. harzianum</i> sobre <i>P. cinnamomi</i>	93
Figura 27 Avance del crecimiento de microorganismos en pruebas de biocontrol <i>in vitro</i>	93
Figura 28 Estructuras de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands (A= Esporangio; B= Claidiosporas y Oosporas; C= Micelio.....	94
Figura 29 Diferentes métodos de inoculación de <i>P. cinnamomi</i> en plántulas de aguacate Hass	95
Figura 30 Identificación de raíces secundarias de plántulas de aguacate con pudriciones obtenidas de sustratos con alta retención de humedad	96
Figura 31 Comportamiento de celulasas en sustratos de aguacate	99
Figura 32 Comportamiento de la actividad de fosfatasa en sustratos de enraizamiento de plántulas de aguacate <i>Persea americana</i> Mill.....	100
Figura 33 Actividad microbiana (Respirometría) en sustratos	103
Figura 34 Colonización de micorrizas en plántulas de aguacate	105
Figura 35 Porcentaje de materia seca en plántulas de aguacate (área delimitada con trabamientos con aplicación de auxinas: ácido indol-burítico AIB)	108
Figura 36 Efecto de auxina (AIB) sobre la elongación de raíces de plántulas de aguacate (Tratamiento: T1+ácido indol-butírico).....	108
Figura 37 Área foliar de plántulas de aguacate (área delimitada en tratamientos con la aplicación de estimuladores de crecimiento radical: auxina AIB).	110
Figura 38 Deficiencia de fósforo en injertos de aguacate Hass.....	111
Figura 39 Comportamiento de N y P de acuerdo a la interacción: estado fitosanitario (SinPC: sin <i>P. cinnamomi</i> ; conPC: con <i>P. cinnamomi</i>) con el manejo del pH del sustrato (aplicación de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ - y vinaza).	113

Figura 40 Potasio foliar de acuerdo a la aplicación de silicato de potasio (K-SiO ₄) (Insumo de uso preventivo para control de <i>P. cinnamomi</i> Rands).	115
Figura 41 Interacción de la mortalidad de plántulas de aguacate con el control preventivo fitosanitario (con silicato de potasio y <i>Trichoderma harzianum</i>) ...	116
Figura 42 Distribución del porcentaje de mortalidad de plántulas de aguacate de acuerdo a la interacción con manejo preventivo fitosanitario (silicato de potasio y con <i>Trichoderma</i> spp.)	117
Figura 43 Relación del contenido de Calcio foliar con la mortalidad de plántulas de aguacate.....	119
Figura 44 Densidad de inóculo de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands presentes en el sustratos con diferentes manejos preventivos	120

Lista de Tablas

Tabla 1 Evaluación de materiales de mezcla en sustratos de crecimiento de porta injertos.....	39
Tabla 2 Variables de respuesta evaluadas en la fase 1 en sustratos y plántulas	39
Tabla 3 Métodos para determinación de propiedades físicas en sustratos	40
Tabla 4 Métodos para determinación de propiedades químicas en sustratos .	41
Tabla 5 Métodos para determinación de elementos foliares.....	45
Tabla 6 Tratamientos de inoculación de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands “in vivo” (invernadero)	46
Tabla 7 Variables de respuesta evaluadas en la fase 2 en sustratos y plántulas	50
Tabla 8 Distribucion porcentual de poros en los sustratos de crecimiento de plantulas.....	68
Tabla 9 Retencion de humedad a 15 bares de succión matricial en los sustratos de crecimiento de plantulas de aguacate.	70
Tabla 10 Cambios de la Conductividad eléctrica (dS.m-1) en sustratos para plántulas de aguacate.	75
Tabla 11 Caracterización química de los sustratos.....	77
Tabla 12 Saturación de bases en sustratos.....	78
Tabla 13 Tipos de bacterias presentes en sustratos de crecimiento de plantulas de aguacate.....	81
Tabla 14 Presencia de actinomicetos en sustratos de crecimiento de plántulas de aguacate.....	83
Tabla 15 Actividad enzimática rizosferica de celulasas y el contenido de celulosa en sustratos para plantulas de aguacate.....	83
Tabla 16 Porcentajes de materia seca a los 20* y 240** dias en plantulas de aguacate, variedad Hass.....	88
Tabla 17 Contenido (%) de macronutrientes en hojas de plántulas de aguacate después del injerto (180 días).	89

Tabla 18 Crecimiento de microorganismos en pruebas de biocontrol in vitro .	92
Tabla 19 Nivel de daño de <i>P. cinnamomi</i> en plántulas de aguacate con diferentes métodos de inoculación.....	94
Tabla 20 Prueba de comparación de promedios para la actividad enzimática rizosférica.....	98
Tabla 21 Prueba de comparación de promedios para las poblaciones de bacterias oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito.....	102
Tabla 22 Resultados de la prueba de comparación de promedios para los nutrientes foliares.....	112

1. Introducción

El estudio de la rizósfera y su relación con la nutrición mineral de las plantas puede integrar algunas relaciones entre las propiedades físicas, químicas, biológicas y bioquímicas del suelo, lo mismo que de sustratos que contribuyen a la disponibilidad de nutrientes y a la respuesta a diferentes formas de susceptibilidad o tolerancia del cultivo a enfermedades como es la pudrición de raíces.

La investigación sobre la nutrición de plantas, fitopatología y el metabolismo de microorganismos, debe proyectarse hacia el uso y manejo integrado de las prácticas agrícolas del suelo; por ejemplo los mecanismos de absorción de nutrientes, tolerancia de plantas al ataque de patógenos ó en su defecto aspectos enzimáticos en sistemas simbióticos entre plantas/bacteria y/o planta/hongos que tienen gran importancia en la nutrición mineral de las plantas; de acuerdo con esto, en la interacción suelo-raíz, se maneja el término de “efecto rizosférico” asociado a la composición de los exudados radicales y los microorganismos del medio, como lo menciona Siqueira y Franco (1988) que definen lo anterior en los siguientes términos: “entorno de mayor actividad física, química y principalmente biológica, de gran interés agronómico y ecológico, pues representa una interfase de comunicación entre plantas terrestres y su sustrato.

Anualmente son considerables los costos económicos a escala internacional por concepto de pérdidas en diversos cultivos debido al ataque de diferentes plagas y enfermedades, así como también por el uso de productos químicos destinados a prevenirlas y controlarlas, resaltando las enfermedades fungosas dentro del conjunto de afecciones que producen daños en las plantaciones, debido fundamentalmente a su diversidad y a lo difícil que resulta su control (Echemendia, 2002); para el caso del cultivo de aguacate, Coffey (1992) históricamente la mayor disminución de la producción de aguacate causada por la pudrición de raíces en California (USA) en la década de los 70's con pérdidas aproximadas de 30 millones de dólares y de igual manera se reporta para finales

de 1979 en Michoacán (México) una de las áreas más grandes del mundo sembradas en aguacate, más de 13 mil árboles afectados; según Teliz (2000) los últimos reportes de otras regiones productoras de México registran la fluctuación de la incidencia entre 45 y 90% además de otros registros de esta enfermedad en zonas productoras del mundo como Sur-África, Israel, Nueva Zelanda, California, Australia, Centro América y el Caribe Colombiano, siendo un factor limitante para la producción, lo que conlleva a intensificar las investigaciones en todos los estados fenológicos de la planta.

El cultivo del Aguacate, la principal enfermedad en el mundo causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands (Oomyceto), se denomina “Muerte descendente” ó “Pudrición radical” por los daños que ocasiona al sistema de raíces; este problema ocasiona la destrucción de las puntas de las raíces, las cuales desempeñan la importancia en absorción de agua y de nutrientes del suelo y no solo se presenta en aguacate, sino también en otras especies de árboles incluyendo especies de eucalipto, pino melocotón, piña, pera, macadamia, ornamentales leñosos (como azaleas, camelias y rododendros), y otras especies. Se le atribuye un rango de hospederos de más de 950 especies de plantas (Broadley, 1992).

Las raíces infectadas se necrosan y se desprenden fácilmente. Ocasionalmente este Oomyceto coloniza raíces gruesas, necesitando una herida para causar infección. Raras veces causa chancros o cáncer en la base del tronco. Los síntomas en el follaje son originados por la reducción de la absorción de nutrientes y agua y su transporte ascendente; además, el árbol pierde más agua por transpiración que la absorbida por un sistema radical lesionado, reduciendo así la capacidad de las hojas para producir clorofila, que les da coloración verde a las hojas y esto les causa clorosis o amarillamiento foliar (Téliz, 2000).

La agresividad de diversos microorganismos patógenos está ligada a condiciones de altas temperaturas con abundancia de agua y mal drenaje, condiciones que facilitan su reproducción y disseminación, pero es necesario involucrar en las investigaciones las variables fisiológicas y nutricionales de la planta en relación con propiedades químicas y biológicas del suelo; estas relaciones entre nutrición limitada y patogenicidad de raíces pueden influir sobre

variables agronómicas como los bajos rendimientos de los cultivos; según Díaz-Zorita (2004) estas interacciones dependen de la selección de factores determinantes (genotipo, fecha de siembra, tipo de suelo) y del resultado del manejo de factores limitantes (disponibilidad de agua y nutrientes) y reductores (enfermedades y plagas).

En este contexto es muy importante evaluar y correlacionar con variables de respuesta vegetal con la actividad de bacterias pertenecientes al ciclo nutrientes, tal como lo menciona Sylvia *et al.* 2005; Philippot & Germon, 2005 y Coyne, 2000 con relación a la fijación biológica de nitrógeno (FBN) que consiste en el paso del N₂ molecular presente en el aire hasta formas inorgánicas disponibles para las plantas. Este proceso es llevado a cabo por organismos llamados diazótrofos, los cuales pueden encontrarse en vida libre en el suelo (asimbióticos) o viviendo en asociaciones íntimas con plantas (simbióticos), con beneficios mutuos.

Por otro lado, se constituye la actividad enzimática como un indicador de calidad del suelo, el cual considera la contribución del proceso de descomposición de la materia orgánica en estos procesos bioquímicos originado por los microorganismos y que ayudan a la nutrición de la planta.

Este indicador puede ser sensible a los cambios generados por el uso del suelo, entendiendo que los ecosistemas ocurren fenómenos como la catálisis biológica como responsable de mantener diversas funciones relacionadas con la producción de biomasa, el control biológico y el ciclaje de nutrientes (Melgarejo, 2004).

La acción de cada uno de estos factores sobre el crecimiento y producción no es independiente y se definen abundantes interacciones que en conjunto resultan en respuestas óptimas para la planta, como es el caso del manejo integrado en aguacate que tiene como objetivos: mejorar el vigor a las plantas, restituir un equilibrio entre los volúmenes de follaje y raíces, mejorar la nutrición, incrementar actividad biológica (enzimas del suelo), reducir la acción de las plagas y enfermedades y evitar el mal uso de prácticas culturales que debiliten los árboles, incluyendo componentes de sanidad, nutrición, control biológico y cultural y uso de patrones tolerantes; con estos aspectos es propósito de este proyecto presentar y discutir elementos que contribuyan a interpretar los aportes

de la extracción de nutrientes, actividad microbiana y actividad enzimática del suelo sobre la sanidad del cultivo de aguacate, en este caso la tolerancia a pudriciones de raíces y en particular en el contexto de sistemas de producción en viveros para condiciones del Valle del Cauca.

Algunas características edáficas pueden determinar la tasa de multiplicación y el grado de severidad con que los patógenos afectan los cultivos (Marschner, 1995), por lo que la nutrición, la absorción diferencial de nutrientes y la actividad biológica puede contribuir al impacto de los sistemas de producción de plántulas de aguacate frente a las pudriciones de raíces, se hace necesario un conjunto de indicadores de calidad, ya que la influencia de algunos insumos convencionales de control fitopatógenos sobre las actividades enzimáticas y las comunidades microbianas dependen de los componentes físicos, químicos y biológicos del suelo o del sustrato y relacionan la disponibilidad de nutrientes para la planta.

Estudios como el de Monkiedje *et al* (2002), reportaron cambios como resultado de la aplicación de fungicidas convencionales (Mefenoxam y Metalaxyl) para el control de hongos fitopatógenos del suelo, prácticamente se registraron descensos significativos en las actividades deshidrogenasa, b-glucosidasa, fosfatasa alcalina, en los recuentos de bacterias fijadoras de nitrógeno y en los niveles de amonificación.

Para estudiar la nutrición del aguacate frente a condiciones de adversidad patogénica como la pudrición de raíces causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, debe evaluarse la relación entre nutrientes de las plantas sanas y las afectadas con la actividad enzimática rizosférica de celulasas producida por microorganismos antagónicos descomponedores de materia orgánica. Según Fenchel (2000) en la zona de la rizósfera, la micro biota es modificada por la estimulación y en algunos casos inhibición, debida a los exudados radicales y los restos de tejidos, considerando no solamente la intensidad del efecto rizosférico sino también la intensidad de la colonización del rizoplano con variaciones en las diferentes partes de un mismo sistema radical.

Para un buen manejo de este tipo de problemas es necesario conocer aspectos relacionados con el patógeno, suelos, sustratos en plántulas, clima y la fenología

del cultivo; esto permitiría disponer de las recomendaciones adecuadas para un manejo fitosanitario en diferentes regiones al adicionar entonces microorganismos como las Micorrizas que podría contribuir a las necesidades nutrimentales de la planta durante el periodo vegetativo de vivero y *Trichoderma* spp que favorecería la descomposición de los materiales orgánicos y producción de enzimas para control de *P. cinnamomi*; en este caso de estudio, estas tecnologías pueden resultar eficientes con la constitución de un sustrato óptimo para estas plántulas de aguacate.

También existe la necesidad de realizar estudios con productos que hagan parte del manejo integrado de la nutrición de las plántulas de aguacate que también prevengan la acción de patógenos como el caso de productos fungistáticos; Bekker en 2007 encontró inhibición eficaz de la pudrición de la raíz de árboles de aguacate infectados por *Phytophthora cinnamomi* a través de la aplicación de silicato de potasio, encontrando resultados similares a los niveles obtenidos por aplicación comercial de los fosfonato de potasio. El mismo autor resalta la aplicación de este producto en cuanto a la inducción del crecimiento de raíces nuevas; el efecto es mas beneficioso realizando varias aplicaciones al año dependiendo de otros factores como por ejemplo el medio de crecimiento y la capacidad de intercambio catiónico (CIC), que hacen que la aplicación de silicio sea eficiente para absorción por la planta.

Esta investigación se realizó en el marco del proyecto “Diseño de Estrategias para la Obtención de Plántulas Sanas de Aguacate en condiciones de Vivero”, ejecutado por la corporación BIOTEC y cofinanciado por COLCIENCIAS, durante 2009 – 2010, aportando criterios para recomendaciones en el manejo de la nutrición de plántulas de aguacate y evaluaciones fitosanitarias en fase de vivero teniendo en cuenta algunos indicadores de calidad como la actividad biológica y enzimática en sustratos de enraizamiento producido por microorganismos antagonistas y utilizado para el control de estos patógenos.

2. Planteamiento del problema

Los productores de plántulas de aguacate en Colombia tienen diversos inconvenientes en sus sistemas de producción, como los problemas nutricionales y fitosanitarios identificando la Pudrición de raíces como la principal enfermedad, causada por un Oomycete llamado *Phytophthora cinnamomi* Rands, cuya presencia puede estar relacionada con:

- Aspectos ambientales (exceso de humedad en sustratos)
- Patrones utilizados (susceptibles, desconocidos y sin control comercial, etc.)
- Manejo de los sistemas de producción (inadecuada nutrición ó control fitosanitario).

El conocimiento de lo anteriormente expuesto puede conllevar al planteamiento de soluciones o en la medida del caso la disminución de los problemas presentados, además de generar avances científicos y tecnológicos dentro del marco de la agricultura ecológica.

3. Objetivo General

Evaluar la Influencia la nutrición mineral y la actividad biológica rizosférica en la reducción del daño ocasionado por *Phytophthora cinnamomi* Rands en el cultivo de Aguacate (*Persea americana* Mill).

3.1 Objetivos Específicos

- Relacionar las propiedades químicas y físicas de los sustratos de enraizamiento con variables de respuesta concernientes al desarrollo de plántulas de Aguacate (*Persea americana* Mill).
- Evaluar la Actividad enzimática rizosférica de Celulasas y fosfatasas y la influencia de *Phytophthora cinnamomi* Rands agente causal de pudrición de raíces en plántulas de Aguacate (*Persea americana* Mill).
- Evaluar microorganismos benéficos asociados a la rizósfera de plántulas de Aguacate frente al control preventivos de la pudrición de raíces ocasionada por *Phytophthora cinnamomi* Rands.

4. Marco teórico y estado del arte

4.1 Importancia de la Actividad rizosférica

La rizósfera presenta gradientes que ocurren tanto en dirección radial como longitudinal en una raíz individual; estos gradientes pueden ser de nutrientes disponible, pH, potencial redox, exudados radicales y actividad microbiana (Marschner, 1995).

La rizósfera es también definida como la zona donde la actividad de la raíz influye significativamente en las propiedades biológicas. Después de una revisión amplia podría inferirse que rizósfera es el volumen de suelo adyacente a las raíces influenciado por ellas y a la vez, las raíces reciben influencia de la actividad rizosférica (Bolaños, 2006).

Altieri en 2005 menciona que el empleo de microorganismos, constituye una práctica agrícola que cada día cobra más fuerza en la agricultura, no solo por su bajo costo de producción sino por la posibilidad de fabricarse a partir de recursos locales renovables; Mayea (1995) señaló que los microorganismos utilizados como biofertilizantes tienen un triple papel como suministradores de nutrientes, fitohormonas y antagonistas de fitopatógenos.

En este contexto, se puntualizan las siguientes características relacionadas con los objetivos de la investigación:

4.1.1 Actividad enzimática rizosférica.

Los enzimas son proteínas cuyo papel es catalizar las reacciones químicas en los sistemas vivos, actúan sobre sustratos específicos transformándolos en productos necesarios para los ciclos biológicos. Los organismos y las plantas liberan enzimas al suelo por secreción y por lisis celular después de su muerte; un bajo porcentaje de estas proteínas quedan inmovilizadas y estabilizadas en interacción con los diferentes componentes de la fase sólida del suelo, como las arcillas, moléculas orgánicas y complejos organominerales (Joinville *et al.*, 2004).

Los enzimas de naturaleza proteica están conformadas por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Muchos de estos enzimas requieren la presencia

de un ión metálico o cofactor o de algunas moléculas orgánicas para su funcionamiento (Coyne, 2000). Su composición química está basada en elementos como carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O), hidrógeno (H) y azufre (S).

En la actividad enzimática del suelo existen componentes intracelulares y extracelulares producidos por microorganismos como bacterias, hongos, protozoarios o de origen animal o vegetal, entre ellos, raíces, residuos de plantas, residuos de tracto digestivo de meso y macrofauna del suelo, (Gianfrenda y Bollag, 1996). La actividad de los enzimas en el suelo es resultado de actividades asociadas a varios componentes tanto bióticos como abióticos.

Nannipieri *et al.* (1990) indicaron que las actividades enzimáticas son específicas de un sustrato y están relacionadas con reacciones específicas. Por ello es difícil inferir, mediante un solo valor de actividad enzimática, el conocimiento del estado general de nutrientes de un suelo o determinar la actividad microbiológica del mismo. Sin embargo, las mediciones simultáneas de varias enzimas si pueden resultar útiles como marcadores de bioactividad y pueden utilizarse como índices de fertilidad bioquímica de los suelos (Gil Sotres *et al.*, 1992).

Muchas de las enzimas estudiadas en suelos agrícolas están relacionadas a los ciclos de elementos tan importantes como el carbono (celulasas, b-glucosidasa), nitrógeno (ureasa y proteasa), fósforo (fosfatasa) y azufre (arilsulfatasa). Las estimaciones en laboratorio han sido manejadas con diferentes propósitos como por ejemplo como indicadores de la productividad, como medida indirecta de la biomasa microbiana, para comparar los efectos de la rizósfera, como índice potencial del suelo para descomponer distintos materiales orgánicos (por ejemplo compost, residuos orgánicos, lodos activados, etc.), como indicadores de posible contaminación con metales pesados o pesticidas, etc. (Burns, 1982; Dick y Tabatabai, 1993).

Taylor *et al* (2002) mencionan dos razones para determinar la actividad de los enzimas en el suelo, primero, porque pueden usarse como indicadores de la diversidad de procesos, que informan del potencial bioquímico, la posible elasticidad y potencial para la manipulación del sistema y, segundo, usarlas como indicadores de calidad en el sentido de que cambios en las actividades

pueden proveer información acerca del progreso de la remediación o de la sostenibilidad de tipos particulares de manejo del suelo, en este caso podría usarse como indicador de calidad en sustratos para plántulas.

- **Actividad enzimática de Fosfatasas:** El término fosfatasas se utiliza para designar de manera general a un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico que liberan grupos fosfato y que están acoplados a sustratos más complejos como la materia orgánica (que en este caso es del sustrato de enraizamiento), siendo así las responsables de la mineralización de el fósforo orgánico en forma de fósforo inorgánico el cual queda disponible para los requerimientos de microorganismos y plantas. (Tabatabai, 1994 citado por Trasar *et al.*, 2003).

Su nombre se debe al sustrato base con el sufijo “asa” y la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica clasificó a las fosfatasas de acuerdo al tipo de enlace y a los compuestos sobre los cuales actúan como:

- Fosfatasas que actúan sobre enlaces de tipo éster que a su vez se dividen en: monoésterfosfato hidrolasas, diésterfosfato hidrolasas, trifosfato monoéster hidrolasas, difosfato monoéster hidrolasas y triésterfosfato hidrolasas (Speir y Ross, 1978).
- Enzimas que actúan sobre anhídridos ácidos, en anhídridos que contengan grupos fosfato como por ejemplo, la *adenosin trifosfatasa* y la *pirofosfatasa* (Speir, 1980 citado por Trasar *et al.*, 2003).
- Enzimas que actúan sobre el enlace P-N, como la *fosfoamidasa* (Eivazi y Tabatabai, 1982).
- Enzimas que actúan sobre enlaces C-N, como la *fosfonoacetato hidrolasa* (Trasar *et al.*, 2003).

En este sentido, las fosfatasas cumplen papel importante en las reacciones de hidrólisis del fósforo orgánico hasta fósforo inorgánico. En la mayoría de los suelos, la fracción de fósforo unido al material orgánico se encuentra entre 30 y 70% (Borie y Rubio, 2003, Marscher, 1995 citados por Bolaños, 2006), el resto forma parte de los minerales del suelo. Las fosfatasas ácidas se derivan tanto

de plantas como de microorganismos, mientras que las alcalinas se derivan principalmente de microorganismos.

Para el caso de los sustratos también se puede establecer relaciones con esta enzima de acuerdo con Portilla *et al.* (1998), que argumentan que las fosfatasa detectadas y cuantificadas en suelo rizosférico constituyen un grupo de enzimas de gran importancia en la dinámica de uno de los nutrientes mas importantes para los frutales como es el fósforo (P).

- **Actividad enzimática de Celulasas:** son enzimas extracelulares que pertenecen al grupo de las hidrolasas y catalisa reacciones de hidrólisis; pueden estar en forma libre o inmovilizada; tiene su origen en microorganismos celulolíticos tales como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, etc (Alvarez 2003).

Son proteínas derivadas de procesos naturales de fermentación capaces de degradar celulosa; en realidad se trata de una mezcla de componentes enzimáticos (llamado “complejo enzimático”) que actúa de forma simultánea en la degradación de celulosa. Este complejo está formado por tres tipos de enzimas (Charpentier, 1968):

- Endoglucanasas o endocelulasas (β -1,4-D-glucan-4-glucanohidrolasas).
- Celobiohidrolasas o exocelulasas (1,4- β -D-glucancelobiohidrolasas) y
- β - glucosidasa o celobiasa (β - D- glucósido glucohidrolasas).

Las metodologías usadas para la determinación de la actividad enzimática de celulasas en el suelo difieren en su procedimiento y a la vez en los reactivos que se emplean para su determinación, sin embargo, no se han hecho estudios que permitan determinar la actividad de esta enzima en sustratos de crecimiento de plántulas en frutales.

De acuerdo con el método descrito por García-Álvarez *et al* (1994), el principio radica en la valoración de azúcares reductores generados por la intervención de una parte del sistema enzimático celulítico en la transformación de la celulosa amorfa, que se utiliza como sustrato, en azúcares más sencillos. Se utilizan disoluciones como tampón fosfato, carboximetil-celulosa (CMC) 0.2%, reactivo alcalino de Simogyi, reactivo de Nelson y a la vez emplea una disolución patrón

de glucosa (1mM) determinándose la actividad de celulasas suelos o sustratos rizosférico. Se usan 5 g de suelo. La actividad de la celulasa generalmente se mide en μg de glucosa g^{-1} suelo seco h^{-1} (García *et al.*, 2003).

4.1.2 Actividad microbiana en la rizósfera:

Todos los organismos presentes en el suelo respiran y la gran mayoría, los organismos aerobios, liberan CO_2 en el proceso. El total de CO_2 liberado incluye la respiración por toda la flora y fauna del suelo y las raíces. Por tanto, la cantidad de CO_2 liberada es un indicador de la actividad biológica (aerobia) en el suelo. Una alta tasa de respiración indica un nivel elevado de actividad biológica y puede señalar la descomposición rápida de la materia orgánica y la liberación de nutrientes. Un método indirecto de estimación de la actividad biológica del suelo, es la respirometría, que consiste en la cantidad de CO_2 desprendido del suelo por unidad de área ó por unidad de masa, en un tiempo determinado (Swisher, 1999, citado por Sanclemente 2009).

La actividad microbiana generalmente relaciona la producción de ATP, biosíntesis de macromoléculas, producción y liberación de calor, transformaciones específicas como la amonificación, consumo de sustrato o acumulación de productos, actividad enzimática total y específica, tasa de mineralización de C, N, P y S, dinámica de la materia orgánica y del humus, densidad poblacional, biomasa, reacciones químicas específicas y observaciones microscópicas "In situ" (Siqueira *et al.*, 1994);

- **Presencia de Bacterias rizosféricas:** Son los microorganismos más abundantes y pequeños (0,1 a 1 micras). Pueden ser aerobias (crecen con oxígeno), anaerobias (crecen sin oxígeno) o facultativas (crecen con o sin oxígeno). Pueden tolerar pH ácido (acidófilas), pH básico (basófilas) o pH neutro (neutrófilas). En suelos ácidos algunas bacterias neutrófilas tienen la capacidad de neutralizar el suelo donde se están desarrollando para cumplir su función. Algunas bacterias producen endósporas y quistes latentes que les proporcionan resistencia a las variaciones de temperatura, los niveles extremos de pH y a la desecación del suelo. De esta forma pueden crecer de nuevo cuando encuentran condiciones favorables.

Otras se protegen de la depredación y de la desecación emitiendo una cápsula de sustancias mucoides. Otras se desplazan en la solución del suelo mediante un flagelo para encontrar más fácilmente el sustrato alimenticio. Su capacidad de multiplicación les permite crear poblaciones muy grandes en un tiempo muy corto, colonizando rápidamente los sustratos a degradar. La clase y abundancia de bacterias presentes en una fracción de suelo dependen de los sustratos que la compongan y de sus condiciones (suelo ácido, con materia orgánica alta, anegado, de sabana, etc).

Bacterias oxidantes de amoniacó: Según Sylvia *et al.* 2005, se caracterizan por estar encargadas del primer paso de la nitrificación y corresponden a un grupo coherente y bien definido; Estudios basados en secuencias de ARN 16Sr mostraron que todas estas bacterias autotróficas están agrupadas filogenéticamente a las Betaprotobacterias con excepción de *Nitrosococcus*. Según Madigan *et al.* 2003 y Philippot, 2005, *Nitrosomonas* es tal vez la más estudiada y caracterizada, especialmente con respecto a su enzimología y bioquímica de la oxidación del amoniacó., sin embargo, *Nitrospira* parece ser el género de dominante en muchos suelos.

Sylvia *et al.* 2005, define el primer paso en la conversión del Amoniacó NH₃ a Hidroxilamina NH₂OH por medio de la enzima ligada a la membrana amoniacó monooxigenasa (AMO). La ecuación es:



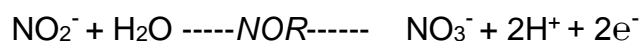
El segundo paso en la formación de NO₂⁻ es la oxidación de la hidroxilamina, mediante la enzima HidroxilAmino oxido-reductasa (HAO), que se encuentra distribuida en el periplasma de los bacterias nitrificantes. La ecuación es:



Bacterias oxidantes de nitrito: Estas son las encargadas del segundo paso de la nitrificación, son filogenéticamente más diversas que las oxidantes de amoniacó. En la mayoría de los suelos se ha aislado generalmente el género *Nitrobacter*

spp., aunque también se ha aislado el género *Nitrospira* (Madigan *et al.* 2003 y McNeill and Unkovich, 2007).

Según Philippot, and Germon, 2005 la oxidación del NO_2^- hasta NO_3^- es un proceso de un solo paso y es llevado a cabo por las oxidantes de nitrito por medio de una enzima ligada a la membrana; la nitrito óxido-reductasa (*NOR*). Esta enzima transfiere un oxígeno del agua y transfiere un par de electrones a la cadena transportadora de electrones para la producción de ATP por la vía de fosforilación oxidativa. La ecuación es:



Tanto las Bacterias Oxidantes de Amoniacó como las Oxidantes de Nitrito en condiciones autotróficas no son muy eficientes en la recuperación de la energía disponible a partir de la oxidación del NH_4^+ y NO_2^- .

Para el caso de Nitrosomonas, la relación entre el NH_4^+ oxidado y el carbono asimilado está entre 14:1 y 70:1. En el caso de Nitrobacter, la relación entre el NO_2^- oxidado y el carbono asimilado fluctúa entre 76:1 y 135:1; estas últimas tienen que metabolizar una cantidad de NO_2^- relativamente mayor para mantener el mismo nivel de crecimiento, mostrando una tasa de oxidación de NO_2^- mayor que la tasa de oxidación del NH_4^+ por parte de las oxidantes de amoniacó.

Según Brady and Weil, 2002 las bacterias nitrificantes del suelo son más sensibles a las condiciones ambientales que los microorganismos amonificantes. Algunos de los factores que influyen en su actividad, son:

De acuerdo con Coyne, 2000 (citado por Gallego, 2012), sigue siendo difícil cultivar y cuantificar bacterias nitrificantes del suelo en medios sólidos debido a su lento crecimiento y dificultad de aislamiento. Por esto, cuando los microbiólogos del suelo quieren cuantificar poblaciones de bacterias nitrificantes,

generalmente utilizan medios líquidos para su cultivo y hacen uso del método del Numero Más Probable (NMP) para su conteo.

- **Presencia de Actinomicetos:** Los principales géneros que se aíslan a partir de suelos son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora*, que pueden estar presentes como conidios o como hifas vegetativas (Martin 1981). Ciertos de estos organismos no han sido identificados específicamente, y la posición filogenética de algunos subgrupos muestra que su divergencia corresponde con la de los géneros tradicionales de actinomicetos, indicando una estructura rica en organismos de esta clase y no cultivable en suelos (Rheims et al. 1999, citado por Franco, 2009).

Algunos géneros han sido reportados como fijadores de nitrógeno atmosférico, como *Frankia* y algunas cepas pertenecientes a las familias *Thermomonosporaceae* y *Micromonosporaceae* (Valdés et al. 2005; Franco-Correa 2008). Los actinomicetos también han sido descritos como agentes de biocontrol por la capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, peroxidasas y otras, involucradas en el papel del micoparasitismo que llevan a cabo estos microorganismos (Franco-Correa 1999; Tokala et al. 2002; Márquez et al. 2003). El género *Streptomyces* ha sido descrito como colonizador de la rizósfera, capaz de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, producir sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal in vitro, promover la nodulación y ayudar a los bacteriodes de *Rhizobium* a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas, lo cual contribuye indirectamente a la promoción de crecimiento vegetal (Tokala et al. 2002).

- **Presencia de Micorrizas:** Los hongos denominados como micorrizas realizan una simbiosis (asociación no-patogénica) con la raíz de plantas; la palabra micorriza se deriva del griego: mykes: hongo y rhiza: raíz. La simbiosis se da cuando el hongo absorbe fotosintatos producidos por la planta y esta obtiene nutrientes e incrementa su rizósfera, por efecto de las hifas de las micorrizas, teniendo así una mayor área de absorción (Sieverding, 1991).

Autores como Azcón-Aguilar *et al.*, (1992) han comparado mezclas de sustratos durante la fase de aclimatación en plántulas de aguacate observando que la supervivencia de plantas es mejor con la mezcla turba-perlita. Sin embargo la inoculación de hongos micorrízico arbusculares puede coadyuvar la adaptación de las plantas en materiales inertes o en sustratos con bajo estado nutrimental; en este contexto observaron que la inoculación de *Glomus deserticola* y *G. mosseae* mejoró el desarrollo de las plantas crecidas en la mezcla suelo-arena. En esta etapa de desarrollo las plántulas de aguacate generalmente presentan tasas de desarrollo muy lentas por lo que se hace énfasis en la necesidad del uso de la micorriza. Vidal *et al.* (1992) observó que *G. fasciculatum* además de incrementar la biomasa aérea, también produjo beneficios en el sistema radical, el cual fue más vigoroso en comparación con plantas no-inoculadas, debido a esto la micorriza se considera como factor clave en la micropropagación de aguacate y otros frutales.

- **Presencia de agentes fitopatógenos; caso de Oomycetos (*Phytophthora cinnamomi* Rands):** Este patógeno omnívoro fue aislado por primera vez a inicios del siglo 20, y se piensa que se originó en Papúa Nueva Guinea, pero actualmente tiene una distribución mundial. Se considera que tiene un rango de hospedantes de más de 3,000 especies de plantas.

Es heterotálico¹ con sistemas de apareamiento A1 y A2, sin embargo la recombinación sexual no juega un rol significativo en la diversidad poblacional. Con frecuencia, las poblaciones consisten de un solo sistema de apareamiento. Este patógeno infecta raíces fibrosas y puede sobrevivir y crecer saprofiticamente en el suelo. Produce clamidosporas aún en ausencia de reproducción sexual, las mismas que pueden sobrevivir por largos periodos en el suelo (Fry, 2010).

¹ En las especies homotálicas (autofértiles), las estructuras sexuales se producen en un único cultivo. En las especies **heterotálicas**, las cepas de apareamiento se designan como A1 y A2. Durante el acoplamiento, los anteridios introducen los gametos en la oogonia, ya sea por la introducción de la oogonia en el anteridio (anfigina) o por el **acercamiento** del anteridio a la mitad proximal (inferior) de la oogonia (paragina) y la unión produce oosporas. Al igual que los animales, pero no como la mayoría de hongos verdaderos, la meiosis es gamética y los núcleos somáticos son diploides (Lucas *et al.*, 1991).

Se reconoce como un agente que se desarrolla en ambientes húmedos y necesita suelos húmedos para el mejor desarrollo de las esporas de propagación (Zentmyer, 1994). Los esporangios que producen las clamidosporas, producen zoosporas móviles o nadadoras. Las oosporas y clamidosporas son resistentes a condiciones desfavorables del suelo, lo que dificulta el control de la enfermedad. Este microorganismo requiere de agua para formar y liberar las esporas, y para que éstas germinen e infecten las raíces. Uno de los mecanismos indirectos de dispersión son los movimientos del suelo que se realizan para la formación de los viveros, principalmente los substratos, generalmente esta tierra no se analiza para detectar la presencia de patógenos (Bisono y Hernandez, 2008).

Se han detectado muchas características que distinguen a los oomicetes de los hongos. Las septas (paredes celulares) en las hifas son diferentes, resultando en una condición multinucleada (llamada cenocítica); Los núcleos de las células vegetativas son típicamente diploides, la pared celular se compone de β -1,3 y β -1,6 glucanos y no de quitina (el polímero de N-acetil glucosamina, que se encuentra en las paredes de los hongos verdaderos). Muchas especies producen esporas acuáticas (zoosporas) carentes de pared celular, biflageladas contenidas en estructuras llamadas esporangios (Fry, 2010).

Las mayores infecciones de las raíces tienen lugar en épocas cálidas del año, ya que este oomyceto forma sus esporangios cuando existen temperaturas de 25°C y 30.5°C. Las raíces de aguacate secretan sustancias que atraen las esporas, donde se concentran gran número de ellas para dar inicio a nuevas infecciones. Esta producción de zoosporas incrementa la capacidad patogénica en períodos de tiempos muy cortos; además requiere un pH de 6.5 para su buen desarrollo, por lo que para su control se reduce el pH a 3.0 a 3.5, principalmente en el cultivo de la piña, con la aplicación de 1,120 Kgs de azufre por hectárea (Zentmyer, 1994).

En suelos donde la cantidad y frecuencia de riego es alta, si existe un patógeno, la dispersión e infestación es más rápida, y este efecto está relacionado con las zoosporas que están rodeadas de flagelos que le permiten nadar y llegar a zonas

libres de la enfermedad. Por esta razón el riego por inundación es uno de los principales diseminadores de las zoosporas de oomicetos (Jorge, 2000).

En consecuencia, Riccardi *et al.*, 1998, resaltan la importancia de los mecanismos de adaptación de las plantas al estrés, los cuales pueden causar modificaciones en la expresión de la información genética, produciendo cambios en los productos génicos, incluyendo mRNA y proteínas; como respuesta se sintetizan proteínas específicas, llamadas proteínas de estrés, las cuales posiblemente dotan a las plantas con la capacidad de adaptación por medio de ajustes fisiológicos y bioquímicos. La síntesis de proteínas en plantas puede ser específica para un estrés particular, como aquellas que son inducidas por déficit hídrico o agentes patógenos.

- **Presencia de microorganismos controladores de patógenos del suelo:** en el caso de *Trichoderma* spp., este género posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Fusarium*, y oomicetos del género *Phytophthora* y *Pythium* entre otros. Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos anti fúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa (Ezziyani, 2004).

4.2 Manejo de sustratos y evaluación en el crecimiento de plántulas.

La composición y manejo del sustrato de enraizamiento de plántulas o portainjetos de aguacate, son los principales factores agronómicos para la obtención de material sano para las siembras en campo, los cuales deben garantizar óptimas características tanto en su sistema de raíces como en su parte aérea.

Según Abad *et al* (2004), el término sustrato se aplica en agricultura para definir a todo material sólido distinto del suelo, natural o sintético, mineral u orgánico, que puesto en un contenedor, en forma pura o en mezcla, que desempeña un

papel de soporte fisiológico para la planta; en otros términos, se ha definido también al sustrato, a todo material natural o artificial, que permite el anclaje del sistema radical y también el aporte de elementos nutritivos (Crozon & Neyroud, 1990).

En un sustrato elaborado, el componente orgánico es el que usualmente favorece la retención de agua y de nutrientes, el material mineral, comúnmente otorga peso y solidez para mantener la planta erecta y un adecuado espacio poroso para una buena aireación (Aburto, 2007).

Dentro de los parámetros químicos, la conductividad eléctrica (CE) resulta una forma de expresar el contenido y calidad de sales presentes en un sustrato; según Martínez (2005) los valores de ce superiores al rango de 1,8-2,25 (ds/m) reducirían el crecimiento de las plántulas, causarían problemas de marchites apical de las hojas. Valores superiores a 3,4 ds/m causarían lesiones severas y pérdidas irreversibles de los cultivos.

Según Abad *et al* (1992, citado por Terés, 2001) el rango de pH para materiales orgánicos que son usados en la elaboración de sustratos debe estar entre 5,2 y 6,3 debido a que en esta condición la mayoría de los nutrientes mantienen su máximo nivel de asimilabilidad. Por su parte Handreck y Black (2002) estrechan el rango de pH de 5,5 a 6,3.

Según Ezziyyani *et al* (2005), el valor de pH es de vital importancia, ya que la concentración de iones hidrógeno modifica la disponibilidad de nutrientes. Generalmente el pH ácido no es favorable para el desarrollo de la mayoría de los cultivos, por lo que en los ensayos *in vivo* se observa que tanto el porcentaje de germinación, como el desarrollo morfológico de las plántulas crecidas a partir de semillas de *Capsicum annuum* L en un sustrato de turba, presentaban un aspecto amarillento en los extremos de los cotiledones; esto se debe a que a un pH menor que 4 es demasiado ácido y por tanto crea un ambiente desfavorable.

Por lo general los sustratos usados en vivero se tratan con fungicidas o bactericidas para eliminar los patógenos y las semillas de malezas, proceso que elimina o reduce los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) nativos y afecta la captación de nutrientes especialmente el fósforo y otros como el compost no

contienen propágulos, por lo cual la introducción de inóculos de HMA ha tenido éxito en suelos o sustratos desinfectados. El uso de sustratos apropiados para las plantas de vivero con proporciones óptimas de suelo en mezcla con materiales orgánicos e inorgánicos, permiten mejorar la estructura del suelo, favorecen la aireación y aumentan la capacidad de retención de agua. Sieverding, 1991; Davies y Albrigo, 1994.

4.3 La Rizósfera de Aguacate y control preventivo de la pudrición

El manejo inicia desde la selección de los materiales orgánicos e inorgánicos que componen el sustrato de enraizamiento de plántulas de aguacate para propender por una óptima aireación o flujo de gases, adecuada retención de humedad y buena disponibilidad de nutrientes; estos materiales deben cumplir tres fundamentos técnicos:

- Fácil adquisición en la región o zona de producción.
- Ambientalmente de fácil almacenamiento
- Económicamente rentable.

El caso de la cascarilla de arroz se ajusta a estas condiciones ya que es un sub producto de la industria molinera de las zonas arroceras, considerado como un material orgánico de baja tasa de descomposición dado el alto contenido de sílice, es liviano, aporta un buen drenaje y aireación, pero presenta una baja tasa de retención de humedad inicial y es difícil de conservar su humedad homogéneamente cuando se usa como sustrato. Tiene buena inercia química, sin embargo se pueden encontrar semillas de otras plantas, generando problemas de malezas. Con el tiempo de uso, van ocurriendo algunos cambios en sus propiedades físico químicas, los cambios más notables tienen que ver con la degradación física, es decir las partículas se van fracturando y se genera un polvillo que tiende a aumentar la retención de humedad (Valverde, 2007), además el contenido de sílice de la cascarilla favorece a los vegetales del ataque de insectos y microorganismos (Restrepo, 1996).

En el manejo preventivo de la pudrición de raíces se puede incluir productos fungistáticos, de esa manera se fortalecen los planes de nutrición de plántulas de aguacate como por ejemplo fuentes comerciales de silicio; las hipótesis

preliminares planteadas hacen referencia a Wagner en 1940, quien fue el primero en especular sobre el modo de acción de silicio, describiendo que la resistencia de una planta a los patógenos pueden ser atribuida a la acumulación específica y polimerización de $\text{Si}(\text{OH})_4$ en las paredes celulares; estudiando el efecto de silicio en el desarrollo del oídio del trigo, señaló que la correlación positiva entre la concentración del ácido silícico en el sitio de infección y el grado de resistencia al moho, es indicador de un efecto de supresión de la enfermedad por silicio (Bowen et al., 1999).

Según Quero (2008), el principio fisiológico y bioquímico se establece en las formas poliméricas y amorfas del Silicio, que se alojan en el tejido de la epidermis formando una capa fina de membrana silicio-celulosa (Si-C) que está asociado con pectina y iones calcio, además se forma otra capa sólida que corresponde a partículas con formas diversas pero definidas de SiO_2 , que se conocen como fitolitos, las cuales se intercalan con la película de celulosa en la cutícula, otra parte de SiO_2 recubre las paredes externas de las células que componen a los tricomas.

Los tricomas o pelos pubescentes, son apéndices epidérmicos con diversa forma, estructura y función que pueden estar en cualquier órgano de la planta; en resumen este proceso que ocurre en la epidermis es conocido como *biosilicificación*, donde la doble capa cuticular y el recubrimiento de los tricomas, pueden proteger y proporcionar fortaleza mecánica a las estructuras de las plantas, protegiéndola de factores bióticos y abióticos. Algunos tricomas pueden biosintetizar compuestos químicos que repelen algunas plagas o bien pueden atraer a insectos benéficos. Cambios en la nutrición con Si tienen influencia en la cantidad y formas de fitolitos y tricomas.

Samuels *et al* (1993), Utilizando el oídium como patógeno en pepino, mostró que dentro de un corto período de tiempo después de la aplicación de Si es dejado, todos los efectos profilácticos retroceden; por lo tanto, la interrupción de la aplicación de silicio conduce a la pérdida de resistencia del tejido, reduciendo la hipótesis de la barrera mecánica frente al desarrollo del patógeno.

El uso otros productos agrícolas como estimuladores de crecimiento radical o fitohormonas como las Auxinas (AIB), puedan integrarse a un plan de manejo

integrado para mejorar la eficiencia del enraizamiento; la eficiencia de estos productos dependen de factores relacionados con el déficit hídrico, la fotosíntesis durante el proceso de propagación, así como también la utilización de sustratos adecuados que favorezcan la iniciación y desarrollo de las raíces (Loach 1988, Leakey *et al.* 1990).

El aumento en la capacidad de enraizamiento a través del uso de una auxina se le atribuye efectos positivos de estas sobre la división celular, unido al reconocido efecto de promover el transporte de carbohidratos y cofactores foliares hacia las regiones tratadas con auxinas (Phillips 1975). Otro efecto de las auxinas sobre la formación de raíces radica en su capacidad de estimular la síntesis de ADN, lo cual resulta en una mayor división celular (Gaspar y Hofinger 1988).

Para el manejo del pH del sustrato, principalmente para bajar el pH cercano a la alcalinidad, se usan usualmente precursores de carga positiva como el sulfato de amonio (SA); según lo reportado por Adams (1984), cada mol de N proveniente del SA produce 4 moles de H^+ , mientras que cada mol de N proveniente de la urea o del Nitrato de Amonio produce solamente 2 moles de H^+ .

Otro producto utilizado es la Vinaza, resultante de la destilación de melaza fermentada, tiene una composición elemental interesante y contiene componentes que han sido arrastrados por el vapor de agua, así como cantidades de azúcar residual y componentes volátiles (García & Rojas, 2004); se utiliza fundamentalmente por el potencial redox, reconociendo su composición de microorganismos, elementos químicos y compuestos orgánicos de naturaleza acida (anexo 12); los constituyentes de la vinaza de manera general son los siguientes:

- Sustancias inorgánicas solubles con predominio de los iones K, Ca y SO_4 .
- Células muertas de levadura.
- Sustancias orgánicas resultantes de los procesos metabólicos de levaduras y microorganismos.
- Alcohol y azúcar residual.

- Sustancias orgánicas insolubles.
- Sustancias orgánicas volátiles.

Por otra parte, también es importante mencionar la correcta elección del portainjerto, en los cuales se deben tener en cuenta la facilidad en la consecución de una semilla con características de vigor para el crecimiento de las plántulas, buen desarrollo radical, alta compatibilidad con la variedad a injertar, resistencia o tolerancia a factores bióticos limitantes (Bernal y Díaz, 2006).

En Colombia la selección de portainjertos de aguacate no es tan intensa como en otros frutales, debido a la laboriosidad y dificultad técnica de efectuar la propagación sexual. No obstante, es posible hacer una selección de materiales basándose en la existencia de las razas, Mexicana, Guatemalteca y Antillana; Cada una de estas razas posee características específicas que pueden servir para ciertas elecciones. Los árboles de raza Antillana son los más fácilmente accesibles en el país, al ser su hábitat natural claramente tropical (cálido-húmedo, con débiles variaciones a lo largo del año) son, sin embargo, más resistentes a la salinidad y a la clorosis por exceso de cal (Ríos *et al.*, 2005).

En el presente estudio se planteó como hipótesis que las propiedades físicas y químicas de los sustratos y la actividad microbiana rizosférica influyen en respuestas fisiológicas de las plántulas de aguacate y en la reducción de la pudrición de raíces ocasionado por *Phytophthora cinnamomi* Rands.

5. Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en tres fases concernientes a la experimentación en campo, laboratorio y análisis de resultados (figura 1); en la primera (abril de 2009 a enero 2010) se parte de un diagnóstico del sistema de producción de plántulas en condiciones de vivero, para detectar la problemática fitosanitaria; posteriormente se realizaron pruebas con diferentes mezclas de sustratos, evaluando variables de respuesta química físicas y bioquímicas del sustrato y fisiológicas de las plántulas; paralelamente se definió el método de multiplicación, ensayos de biocontrol *in vitro* e inoculación del patógeno *in vivo* para aplicarlos en la fase dos de la investigación.

Se seleccionó un sustrato en la fase dos (mayo 2010 a enero de 2011), con optimas características para las plántulas. Se estableció las relaciones entre el manejo preventivo fitosanitario de los sustratos con productos biológicos (*Trichoderma* spp) y fungistáticos (silicato de potasio) y las variables asociadas a la rizósfera de las plántulas, considerando la inoculación de *Phytophthora cinnamomi* Rands como principal agente causal en la pudrición de raíces (el método de inoculación se define en la fase uno).

Después de obtener los resultados de las fases 1 y 2, se realizaron los correspondientes análisis estadísticos para dar inicio a la interpretación (fase 3) y discusión de resultados.

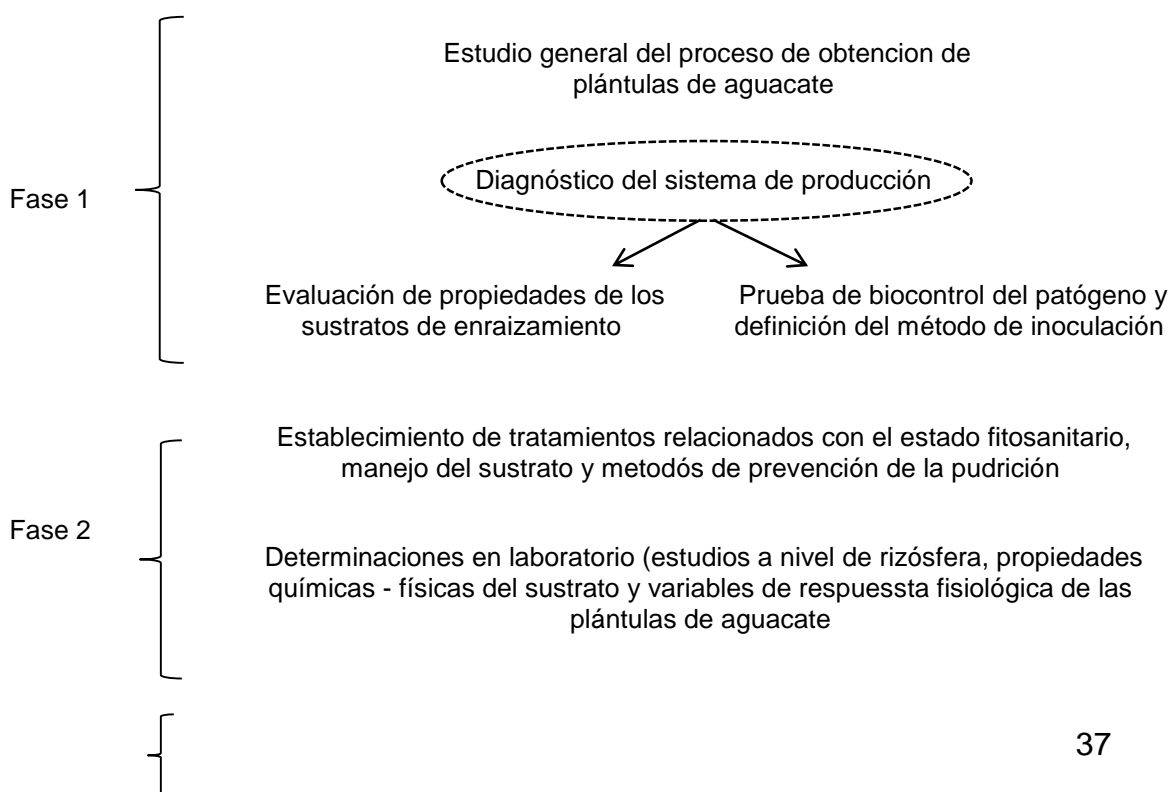


Figura 1 Esquema de las fases de investigación

5.1 Materiales y métodos fase 1.

5.1.1 Localización del experimento.

La evaluación de los materiales, sustratos y plántulas se realizó en los laboratorios de microbiología, fitopatología, biología molecular y física de suelos de la Universidad Nacional de Colombia – sede Palmira y en el laboratorio de biotecnología de la corporación BIOTEC (sede CIAT); el establecimiento de las plántulas de aguacate se realizó en instalaciones del centro experimental de la Universidad Nacional de Colombia CEUNP – sede Palmira, ubicado en el corregimiento de Candelaria (Valle) a 1009 m.s.n.m. con una temperatura promedio anual 24,81 °C, humedad relativa de 75% y una precipitación promedio anual de 998 mm; Los sustratos, las semillas y plántulas fueron obtenidos de un vivero comercial del Valle del Cauca, cuya variedad de injerto fue *Hass* y porta injerto de raza antillana.

5.1.2 Diagnóstico del sistema de producción.

El diagnóstico corresponde a la identificación de puntos críticos relacionados con factores de tipo técnico en un sistema de producción de plántulas comerciales del Valle del Cauca; que incluye la manipulación de materiales del sustrato, el manejo de semillas y el sistema de siembra; estos factores influyen directamente en el proceso para obtener plántulas sanas de aguacate según la normativa del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

5.1.3 Diseño experimental fase 1 (Evaluación de sustratos).

Teniendo en cuenta el diagnóstico del sistema de producción relacionada con el exceso de humedad, la heterogeneidad y deficientes condiciones de aireación en el sustrato, se realizó el experimento con diferentes proporciones de los materiales que constituyen el sustrato, el cual se estableció en un diseño de

bloques completos al azar (BCAA), con cinco tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento.

5.1.4 Descripción de los tratamientos.

Los tratamientos corresponden a diferentes mezclas para la conformación de sustratos, cuyos materiales fueron: limo, carbonilla de calderas, Compost de cachaza de ingenios azucareros y cascarilla de arroz proveniente de molinos (tabla 1). El T1 correspondió al manejo convencional del sistema de producción.

Tabla 1 Evaluación de materiales de mezcla en sustratos de crecimiento de porta injertos.

Tratamientos	Porcentaje del material en a mezcla				Total de la mezcla
	Compost cachaza	Carbonilla	Cascarilla de arroz	Arena fina	
T1	33	33	23	11	100
T2	100	0	0	0	100
T3	50	0	50	0	100
T4	50	50	0	0	100
T5	50	25	25	0	100

5.1.5 Descripción de la unidad experimental.

La unidad experimental estuvo formada por 15 plántulas por repetición para un total de 300 plántulas.

5.1.6 Variables de respuesta fase 1.

En la tabla 2 se muestran las variables de respuesta con las correspondientes relaciones de las propiedades tanto para el sustrato como para las plantulas.

Tabla 2 Variables de respuesta evaluadas en la fase 1 en sustratos y plántulas

Propiedades	Variable
Propiedades físicas de los sustratos	Densidad aparente, Distribución de poros, Conductividad hidráulica, Retención de humedad
Propiedades químicas de los sustratos	Materia orgánica, pH, Conductividad eléctrica, Capacidad de intercambio catiónico, Nutrientes (macro elementos), Contenido de celulosa
Propiedades biológicas de los sustratos	Poblaciones bacterias vida libre, bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias oxidantes nitrito, bacterias oxidantes amonio, Actinomicetos.

Propiedades bioquímicas de los sustratos Actividad enzimática de celulasas

Propiedades fito fisiológicas Materia seca raíces, Materia seca foliar, Nutrientes foliares, Contenido Hídrico Relativo, Mortalidad (pérdida total de la plántula)

5.1.7 Métodos y técnicas fase 1

5.1.7.1 Evaluación de propiedades físicas de sustratos.

Las metodologías relacionadas con variables de respuesta de las propiedades físicas en los sustratos fueron: Densidad aparente, Humedad gravimétrica, Cuvas de retención de humedad y Distribución de poros; el muestreo de estas variables se realizó en el momento de la labor de Injertación, es decir, a los 55 días después del trasplante del semillero a bolsa. Dichas metodología se describen en la tabla 3.

5.1.7.2 Evaluación de propiedades químicas de sustratos.

Las metodologías relacionadas con variables de respuesta de las propiedades químicas en los sustratos fueron: pH, materia orgánica, carbono orgánico, capacidad de intercambio catiónico y macronutrientes; el muestreo de estas variables se realizó en el momento de la labor de Injertación, es decir, a los 55 días después del trasplante del semillero a bolsa. Dichas metodología se describen en la tabla 4.

Tabla 3 Métodos para determinación de propiedades físicas en sustratos

Parámetro	Metodología		
Densidad aparente (g cm ⁻³)	Método cilindro de volumen conocido (Forsythe, 1980).	$\delta a = \left(\frac{P_{ss} (g)}{V_c (cm^3)} \right)$	<p>δa: Densidad aparente. Pss: Peso de suelo seco a 105°C.</p>
Humedad gravimétrica (%)	Relación entre la masa de agua y la masa seca de los sólidos del suelo (Malagón y Montenegro, 1990).	$\theta_w (\%) = \left[\left(\frac{P_w (g)}{P_{ss} (g)} \right) * 100 \right]$	<p>θw: Humedad gravimétrica. Pw: Peso del Agua (Peso suelo húmedo – Peso del suelo seco a 105°C). Pss: Peso de suelo seco a 105°C.</p>
Humedad Volumétrica (%)	Relación entre el volumen de agua y el volumen total del suelo (Malagón y Montenegro, 1990).	$\theta_v (\%) = \left[\left(\frac{\theta_w (\%) * \delta a (g/cm^3)}{\delta_w (g/cm^3)} \right) * 100 \right]$	<p>θv: Humedad Volumétrica. θw: Humedad gravimétrica. δa: Densidad aparente. δw: Densidad del agua.</p>
Curvas de Retención de humedad	Cilindros sometidos a presión 75 cm en Mesa de Tensión y 0.3, 1 y 15 bares en ollas y platos de presión (Malagón y Montenegro, 1990).	$\theta_v (\%) = \left[\left(\frac{\theta_w (\%) * \delta a (g/cm^3)}{\delta_w (g/cm^3)} \right) * 100 \right]$ <p>θv (75 atm, 0.3, 1 y 15 bares):</p>	<p>θv: Humedad Volumétrica. θw: Humedad gravimétrica. δa: Densidad aparente. δw: Densidad del agua.</p>
Distribución de poros (%).	Cilindros sometidos a 75 cm de presión en mesa de tensión y 0.3, 1 y 15 bares en ollas y platos de presión (Malagón y Montenegro, 1990).	$Ma (\%) = [PT - \theta_v 7.5 Kpa]$ $Me (\%) = [\theta_v 7.5 Kpa - \theta_v 1500 Kpa]$ $Mi (\%) = [\theta_v 1500 Kpa]$ $PT (\%) = 1 - \left(\frac{\delta a}{\delta r} \right) * 100$	<p>PT: Porosidad total. δa: Densidad aparente. δr: Densidad real. Ma: Macroporos. θv: Humedad Volumétrica. Me: Mesoporos. Mi: Microporos.</p>
Conductividad hidráulica saturada (cm. h ⁻¹)	Método Permeámetro de Cabeza constante (Forsythe, 1980).	$K_s = \left(\frac{V (cm^3)}{t (min) A (cm^2)} * \frac{L (cm)}{H (cm)} \right)$	<p>Ks: Conductividad hidráulica saturada (cm h⁻¹). V: Volumen total de agua que paso por el cilindro. t: Tiempo total empleado. A: Area transversal interna del cilindro. L: Longitud de la columna de suelo. H: Longitud de la columna de agua.</p>

Tabla 4 Métodos para determinación de propiedades químicas en sustratos

Parámetro	Metodología
pH	Potenciómetro. Relación 1:1 (ICA, 1993).
Capacidad de intercambio catiónico (cmol kg ⁻¹ suelo).	Método del NH ₄ OAc 1M. pH 7 (ICA, 1993).
	$CIC = \left(\frac{mL NaOH * N_{NaOH} * 100}{PM} \right)$
Fosforo asimilable (mg kg ⁻¹ suelo).	Bray II (pH < 7); Olsen (pH > 7) (ICA, 1993).
	$P_{BrayII} = Lc * \frac{mL SE}{PM} * 10$ $P_{Olsen} = Lc * \frac{mL SE}{PM}$
Conductividad eléctrica.	Extracto de saturación. Medición conductímetro (IGAC, 1990).
Contenido de Calcio, Sodio, Potasio y Magnesio: Intercambiables + Solubles. (cmol kg ⁻¹ suelo). Contenido de carbonatos.	Determinación con solución extractora: Acetato de Amonio 1M, pH 7, si alcalinos o calcáreo bufferar a pH 8.5. Solubles extracción en agua (ICA, 1993). Lectura por espectrometría de absorción atómica (McKean, 1993).
	$E_{(Ca,Mg,Na,K)} = Lc * Vf * \frac{L}{1000} * \frac{Ve}{Va} * \frac{100}{PM} * \frac{1}{pe}$
Contenido de Carbono Total (g kg ⁻¹ de suelo).	Oxidación húmeda (Walkley and Black) (ICA, 1993).
	$C = \left(\frac{(B - M) * N_{sol,fer.} * pe * FEO * 100}{PM} \right)$ $MO (\%) = \left(\frac{L * FCC * FEO * 100}{PM} \right)$

CIC: Capacidad de intercambio catiónico.

mL: mililitros.

NaOH: Hidróxido de Sodio.

N: Normalidad.

PM: Peso de la muestra.

100: Referencia a la unidad de masa.

P: Fosforo.

Lc: Lectura en la curva.

mL: mililitros.

S.E: Solución extractora.

N: Normalidad.

dS.m⁻¹

E: Cantidad del elemento determinado (Calcio, magnesio, sodio, potasio).

Lc: Lectura en la curva.

Vf: Volumen final (ml).

Ve: Volumen del extractante agregado (ml).

Va: Alicuota tomada (ml).

PM: Peso de la muestra.

Pe: Peso de un cmol del elemento expresado en mg.

C: Carbono Orgánico.

B: Lectura en blanco.

M: Lectura de las muestras.

N: normalidad solución ferrosa.

Pe: Peso en gramos de un cmol de C.

FEO: Factor de eficiencia de oxidación del C.

PM: Peso de la muestra.

MO: Materia orgánica.

L: Lectura en la curva (C – g).

FCC: Factor de conversión del carbono a materia orgánica.

También se caracterizaron los materiales que componen los sustratos (compost de cachaza, carbonilla, cascarilla de arroz) y se comparó con los requisitos de la norma técnica Colombiana NTC 5167 (anexo 1), que define los materiales orgánicos utilizados como fertilizantes o acondicionadores de suelos; Posteriormente se realizó un seguimiento del pH y CE durante el tiempo de desarrollo de las plántulas hasta la edad propicia para su comercialización (8

meses); La profundidad de muestreo fue de 10 cm donde se encuentra la mayor biomasa de raíces secundarias (2 – 3 mm de diámetro).

5.1.7.3 Evaluación de propiedades biológicas y bioquímicas en los sustratos.

- **Poblaciones de Bacterias en sustratos:** Para el caso de las bacterias de vida libre, fijadores de N y actinomicetos, se realizó un recuento según la metodología de Novo, 1993; se tomaron muestras de sustrato rizosférico con raíces secundarias en diluciones escalonadas hasta 10^{-6} en tubos con 9 mL de solución salina al 0,80% de NaCl; Luego se inoculó 0,1 mL de cada dilución por triplicado, en viales de 5 mL de medio sólido; la incubación se llevó a cabo a una temperatura de 35 °C durante 24 horas.

Para determinar la presencia de bacterias oxidantes de amonio y nitrito, las muestras fueron evaluadas por la técnica del número más probable (NMP) en medio líquido, sintético (Schmidt y Belser, 1994) modificada por Rodríguez y Moreno *et. al.* (2007) (El procedimiento se describe en el anexo 3).

- **Actividad enzimática de celulasas en la rizósfera:** La determinación bioquímica se realizó mediante el método espectrofotométrico de Somogyi-Nelson, cuyo principio radica en la valoración de azúcares reductores generados por la intervención de una parte del sistema enzimático celulítico en la transformación de la celulosa amorfa, que se utiliza como sustrato, en azúcares más sencillos. Se utilizaron disoluciones como tampón fosfato: carboximetil-celulasa (CMC) 0.2 %, reactivo alcalino Simogyi, reactivo de Nelson y a la vez una disolución patrón de glucosa (1mM). Se usaron 5 g de sustrato. La actividad de la celulasa se midió en μg de glucosa por g^{-1} sustrato seco h^{-1} (García *et al.*, 2003). (El procedimiento se describe en el anexo 4).

5.1.7.4 Evaluación de propiedades fisiológicas en las plántulas.

- **Materia seca (hojas y raíces):** se determinó según Weissbluth & Valenzuela (2007), tomando tres plantas de cada tratamiento, pesando independientemente las raíces y las hojas en una balanza analítica, después se llevaron a un horno

microonda a una temperatura de 80°C por 24 horas hasta que las muestras quedaron totalmente secas, se toma el peso en seco y se logra establecer el porcentaje de materia seca con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Materia seca} = \frac{PS}{Pf} * 100$$

Donde

PS: peso seco de la muestra

Pf: peso fresco de la muestra

- **Crecimiento de las raíces:** se midió la longitud expresada en centímetros desde la base del tallo hasta el extremo más larga de la raíz pivotante.

- **Determinación del Contenido hídrico relativo en hojas (CHR):** El método fue a través de la diferencia entre peso seco y peso fresco, dividido por el peso de saturación menos el peso seco; Esta variable nos cuantifica el estado hídrico que tiene la planta en relación con el que tendría esta misma si estuviera muy bien hidratada.

$$\% \text{ CHR} = \frac{Pf - Ps}{Pt - Ps} * 100$$

Dónde:

CHR: contenido hídrico relativo foliar

Pf: Peso fresco (Peso en una balanza inmediatamente después del corte).

Ps: Peso seco (muestra a 80°C durante 24 horas).

Pt: Peso de saturación ó plena turgencia (se hidrata el tejido al 100% sumergiendo la muestra por completo durante 12 horas y se cuantifica nuevamente el peso).

- **Nutrientes foliares (Macronutrientes N, P, K, Ca, Mg, S):** El contenido de nutrientes foliares con sus correspondientes metodologías se detallan en la tabla 5, los cuales se determinaron al final de la etapa de desarrollo de las plántulas (8 meses después de la germinación de las semillas).

Tabla 5 Métodos para determinación de elementos foliares

Determinaciones (%)	Métodos
N	Nitrógeno, Digestión Kjeldhal
P	Fosforo, Espectrometría
K	Potasio, Abs.Atómica
Ca	Calcio, Abs.Atómica
Mg	Magnesio, Abs.Atómica
S-Total	Azufre Total, Turbidimetría
MS	Materia seca, Gravimetría

- **Determinación de la Mortalidad de plántulas:** La mortalidad se realizó mediante el cálculo matemático expresado en porcentaje (%) con la pérdida de plántulas en cada tratamiento.

5.1.7.5 Prueba de biocontrol del patógeno y definición de método de inoculación en sustratos.

Con el fin de determinar un manejo preventivo del patógeno en las plántulas para la fase 2 de la investigación, se realizó una prueba de biocontrol (*in vitro*) que consistió sembrar a un centímetro del borde de una misma caja *Petri* con medio de cultivo PDA, discos con micelio de *Trichoderma harzianum* y *Phytophthora cinnamomi* Rands; se estableció un diseño experimental completamente al azar (CCA) con 2 tratamientos y 5 repeticiones por cada uno; la descripción de tratamientos se define de la siguiente manera:

T1= Crecimiento lineal de *Trichoderma harzianum*

T2= Crecimiento lineal de *Phytophthora cinnamomi* Rands

La unidad experimental estuvo conformada por 3 cajas *Petri*, para un total de 30 cajas. La variable de respuesta fue el crecimiento lineal de los microorganismos (mm/día) en las cajas *Petri* incubadas a una temperatura de 27°C durante 7 días.

La definición del método de inoculación en sustratos, se obtuvo a través de una prueba (*in vivo*) de inoculación en raíces de plántulas de aguacate recién injertadas; los sustratos se esterilizaron con tratamiento térmico (vapor de agua) durante 2 horas; se estableció un diseño completamente al azar (CAA) con 3 tratamientos y 3 repeticiones por cada uno; la descripción de los tratamientos de describe en la tabla 6.

Tabla 6 Tratamientos de inoculación de *Phytophthora cinnamomi* Rands “in vivo” (invernadero)

Tratamiento	Método de inoculación	Descripción
T1	Herida (daño mecánico)	Se realizó una herida en raíces secundarias de la plántula en donde se le adiciono discos de PDA+ con micelio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> y luego se cubrió con el sustrato.
T2	Aplicación solida (sin herida)	Se adicionó discos de PDA+ con micelio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> en la zona radical sin causar ningún tipo de herida.
T3	Aplicación líquida (sin herida)	En 1 litro de agua destilada – esterilizada, se diluyó micelio de <i>Phytophthora cinnamomi</i> de cajas Petri adicionándole una mezcla de jugo de verduras V8, se agito y se asperjó 10 ml / planta con bomba espaldera.

La unidad experimental estuvo conformada por 10 plántulas para un total de 90 plántulas; la variable evaluada fue la escala de severidad del patógeno causante de la pudrición en raíces de plántulas en los diferentes métodos de inoculación. Se utilizó la escala de infección de la enfermedad, propuesta por (Zentmyer, 1984) para observar la apariencia de hojas de aguacate y escala de infección de la enfermedad de la siguiente manera:

0 = planta sana

1 = daño leve (follaje amarillo)

2 = daño medio (follaje amarillo con 10% de Hojas secas)

3 = daño severo (follaje amarillo con 20% de Hojas secas)

4 = daño muy severo (follaje amarillo con 40% de hojas secas)

5 = planta muerta

Utilizando la escala anterior se tomaron datos de las 10 plántulas de cada tratamiento cuando se evidenciaron los síntomas avanzados de la enfermedad (45 – 55 días después de la inoculación).

5.1.8 Análisis estadístico de la información fase 1

De acuerdo a los resultados obtenidos en las variables de respuesta, se les realizó análisis de varianza (ANDEVA), evaluando el efecto de los tratamientos; en aquellas variables donde se presentaron diferencias estadísticas se utilizó la prueba de comparación de promedios (método de Duncan 5 %). Con el propósito de evaluar a nivel estadístico las posibles relaciones entre las variables de respuesta, se hizo análisis de correlación de Pearson a través del paquete estadístico SAS (Version 9.1).

5.2 Materiales y métodos fase 2.

La localización para el establecimiento de las plántulas, las evaluaciones de campo y las pruebas de laboratorio para los sustratos y plántulas, es similar a la presentada en la fase 1.

5.2.1 Diseño experimental fase 2.

Se estableció un Diseño factorial de BCAA con 18 tratamientos y con 3 repeticiones por cada uno.

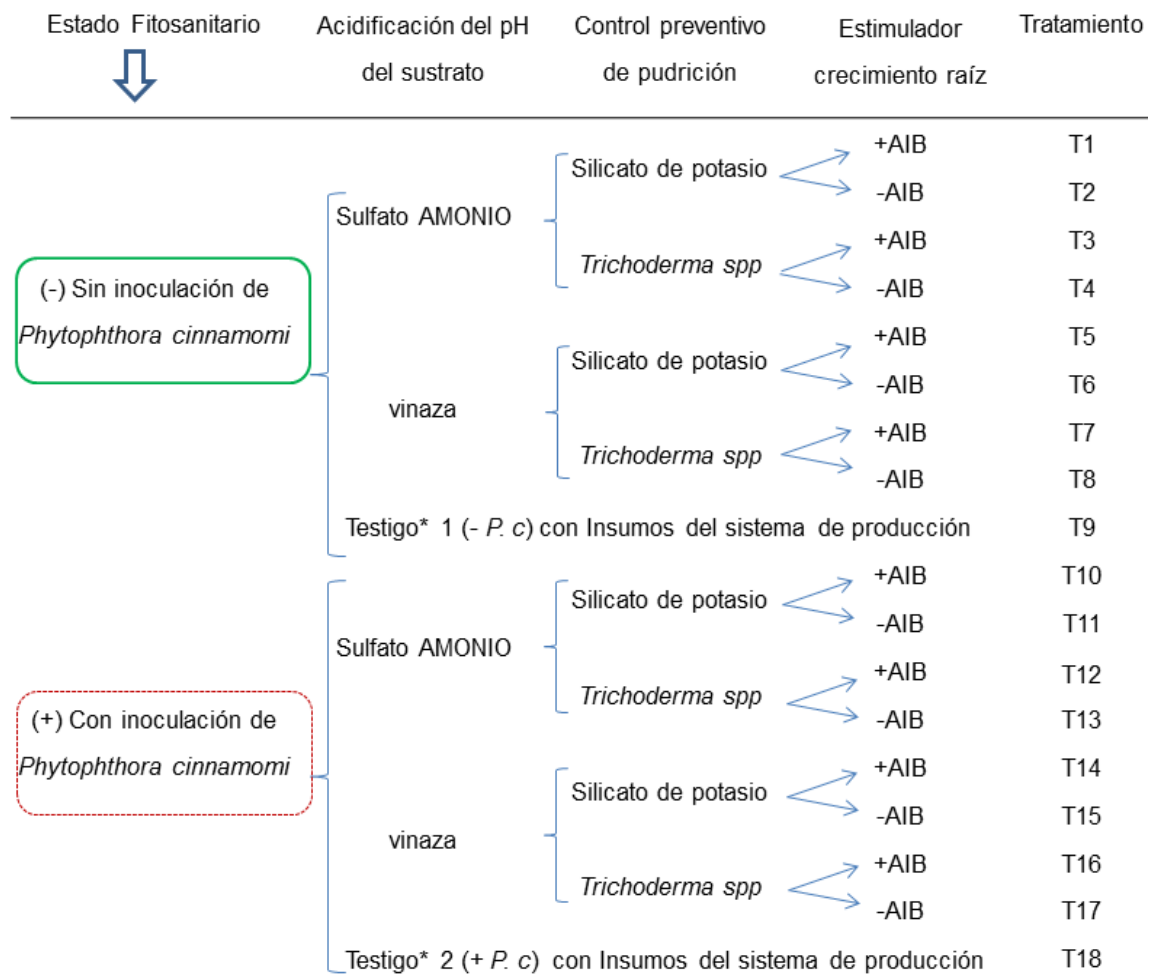
5.2.3 Descripción de tratamientos.

La descripción de los tratamientos ilustrada en la figura 2, se fundamenta a través de los principales factores como:

- Estado fitosanitario² del sustrato.
- Acidificación del sustrato.
- Control preventivo de la pudrición y el estimulador de raíces.

² En esta segunda fase, se realizó un tratamiento térmico para todas las semillas con agua a una temperatura de 48 oC durante 30 minutos (Zentmyer, 1980), el cual elimina la eventual contaminación con patógenos que pueda estar presente en la semilla de aguacate. También se realizó una esterilización del sustrato seleccionado de la fase 1, sometido al vapor de agua durante 1 hora y 45 minutos antes de llevar a las bolsas de transplante.

MANEJO INTEGRADO DE LAS PLANTULAS DE AGUACATE



* Testigo: manejo convencional con fertilizantes y fungicidas de síntesis química

Figura 2 Descripción del diseño de tratamientos en la fase 2

Se establecieron 2 tratamientos diferentes al manejo integrado, denominados “testigos” en el diseño, que corresponden al manejo convencional del sistema de producción comercial (T9: sin inoculación y T18 con inoculación de *P. cinnamomi* Rands); estos tratamientos se basaron en el uso de fertilizantes y fungicidas de síntesis química como se detalló en la fase 1 con la evaluación del sistema productivo.

5.2.4 Descripción de los factores.

- Factor estado fitosanitario: Factor que se relaciona con la ausencia y presencia de *P. cinnamomi* Rands (cepa³ CAA-03) en los sustratos, teniendo en cuenta la prueba preliminar del método de inoculación para ver el efecto del patógeno sobre las variables de desarrollo de las plántulas de aguacate.

- Factor acidificación temporal de pH del sustrato: en los sustratos de evaluados preliminarmente se resaltó el manejo del pH alcalino⁴, el cual es indispensable para el buen desarrollo de las plántulas de aguacate antes de llevarlas a la siembra o sitio definitivo en campo. Para este factor, se determinó el uso de sulfato de amonio (SA) como fuente acidificante “temporal” de síntesis química y precursor de iones de carga positiva por NH_4^+ (anexo 6); La dosificación del SA empleada fue de 10 g/litro, en dosis mensuales iniciando desde la injertación.

El otro insumo fue la vinaza (anexo 7) con un pH de 4.31 a una dilución del al 50%; la dosis empleada fue de 5 cc/L, aplicada los 3 primeros meses, debido al ascenso del pH del sustrato posteriormente.

La definición de las respectivas dosis de SA y vinazas surgió a partir de pruebas preliminares con estos productos que demostraron el descenso temporal del pH en el sustrato elegido de la fase 1 (anexo 8 y 9).

- Factor control preventivo: para el caso de la pudrición de raíces ocasionado por *P. cinnamomi* Rands, se utilizó un producto fungistático⁵ como el silicato de potasio (anexo 10) en una dosis de 0,5% y un producto bio-controlador (*Trichoderma harzianum*) en una dosis de 50 mL de suspensiones de 1.0×10^6 conidios.mL⁻¹. (Álvarez *et al.* 2009).

³ Proyecto: Colección, caracterización y multiplicación clonal de selecciones criollas de aguacate con énfasis en la identificación de patrones con tolerancia a *Phytophthora* spp.; Entidades ejecutoras: CIAT, CORPOICA, PROFRUTALES; 2009.

⁴ El pH alcalino puede presentar efectos osmóticos debido al bajo potencial que se desarrolla como consecuencia de la alta concentración de sales en solución, iones tóxicos como Na y Cl- y desbalances nutricionales (Marschner, 1995).

⁵ Fungistasis: consiste en imponer condiciones de inactividad especialmente para las esporas de hongos por limitación en los nutrientes (Lockwood, 1986). Los elementos saprotrofos pueden reducir las fuentes de carbono e imponer la fungistasis a las esporas del patógeno impidiendo que germinen y que infecten a las plantas.

- **Factor estimulador de crecimiento:** considerando un manejo complementario de la nutrición vegetal, la importancia comercial las plántulas de aguacate y el hecho que aun no se ha definido un método adecuado de enraizamiento, se utilizó una fitohormona para estimular el desarrollo y crecimiento de raíces como la aplicación de ácido indol-3-butírico (AIB) en una dosis de 0,5 mg.L⁻¹ (Fuentes *et al.* 2007) (anexo 11).

5.2.5 Variables de respuesta fase 2.

En la tabla 7 se muestran las variables de respuesta con las correspondientes relaciones de las propiedades tanto para el sustrato como para las plantulas.

Tabla 7 Variables de respuesta evaluadas en la fase 2 en sustratos y plántulas

Propiedades	Variable
Propiedades biológicas de los sustratos	Actividad microbiana (respirometría), Poblaciones bacterias oxidantes nitrito, bacterias oxidantes amonio, micorrizas, propagulos de <i>P. cinnamomi</i>
Propiedades bioquímicas de los sustratos	Actividad enzimática de celulasas y fosfatasas
Propiedades fisiológicas de plántulas	Materia seca raíces, Materia seca foliar, Nutrientes foliares (macro elementos), Área foliar, Contenido Hídrico Relativo, Mortalidad (pérdida total de la plántula).

5.2.6 Métodos y técnicas fase 2

5.2.6.1 Evaluación de propiedades biológicas y bioquímicas en los sustratos.

- **Determinación de la actividad microbiana (Respirometría):** para la medida del CO₂, se usó un sistema cerrado donde se incubó la muestra del sustrato (50 g) por un tiempo de cuatro días, agregando un cristizador que capture el CO₂ – NaOH 1N, luego se precipita con BaCl₂ como carbonato de bario y posteriormente se agregó una o dos gotas de fenolftaleina al 1%, por último se realiza una titulación con HCL 0.5 N para cuantificar el volumen de hidróxido que no reacciono con el CO₂; la actividad microbiana se expresó en términos de C-CO₂. El procedimiento se detalla en el anexo 12.

- **Determinación de la UFC bacterias oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito:**

Esta determinación se describe en la fase 1 de la investigación, de acuerdo con la metodología reportada por (Schmidt y Belser, 1994) modificada por Rodríguez *et. al.* 2007.

- **Determinación de la colonización de micorrizas:** Para evaluar la colonización de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) en raíces, se empleó la técnica de tinción de raíces de Phillips y Hayman, 1970.

Las raíces se distribuyeron al azar y al momento de la lectura la raíz se visualizó a 40x contabilizándose por raíz a modo de cubrir las diez raíces por cada placa. Por cada plántula se leyó una placa y se analizaron 4 placas por cada mezcla y 3 placas por testigo. La metodología se detalla en el anexo 13.

Una vez ya contabilizada cada placa se cuantificó cada estructura el porcentaje de colonización y la cantidad de estructuras presente en la raíz, mediante una fórmula:

$$\% \text{ colonización: } \frac{\text{Numero de Campos Colonizado (positivo)}}{\text{Numero de Campos total Observados}} * 100$$

- **Determinación de la presencia del patógeno:** Se realizaron aislamientos a partir del sustrato infectado con diluciones seriadas (Coffey & Gabor, 1991), para estimar el número de propágulos del patógeno ó densidad de inóculo en el sustrato. La visualización y conteo de colonias se realizó por el reverso de la placa con la ayuda de una lupa binocular con iluminación diascópica (luz transmitida). En caso de colonias muy pequeñas se pudo confirmar observando al microscopio el aspecto del micelio.

De las plántulas marchitas se realizaron aislamientos de los tejidos afectados y se identificaron las estructuras del patógeno en cultivo puro⁶, así se confirmó la patogenicidad de *P. cinnamomi* Rands.

⁶ Medio de cultivo con papa dextrosa agar (PDA) y antibióticos (39 g PDA, Ampicillin 250 µg/l, Penicillin 400 µg/l, Rifampicin 10 µg/l, penta-cloro-nitrobenzeno (PCNB) 200 µg/l, Benomil 10 µg/L, Hymexazol 25 µg/l Thiabendazol 1 ml/l).

- **Determinación de la actividad enzimática de celulasas:** Esta determinación se describe en la fase 1 de la investigación, de acuerdo con la metodología citada por García-Álvarez et al (2003), La actividad de la celulasa se midió en μg de glucosa g^{-1} suelo seco h^{-1} .

- **Determinación de la actividad enzimática de Fosfatasas:** El ensayo enzimático se basó en la determinación de p-nitrofenol liberado por la enzima a partir de p-nitrofenilfosfato, el cual que se incubó con la muestra de sustrato 1 h a 37°C al pH correspondiente. El p-nitrofenol liberado por actividad se extrajo en medio alcalino y se determinó colorimétricamente a 400 nm. Como las sustancias húmicas disueltas incrementan en medio alcalino y pueden interferir con la determinación de p-nitrofenol, se adicionó cloruro de calcio a las muestras para evitar dispersión de minerales de arcilla presentes (Tabatabai, 1982). Se clasificó en acida (pH 6.5) o alcalina (pH 11) según su pH óptimo. En el anexo 4 se detalla el procedimiento en laboratorio.

5.2.6.2 Evaluación de propiedades fisiológicas en las plántulas.

- **Determinación del Área foliar:** Se calculó mediante un medidor modelo CI-202 (anexo 14) que esta constituido básicamente por un scanner de alta velocidad integrado a un almacenador de datos (Datalogger); La placa de medición esta provista de un film transparente para posicionar la hoja que va a ser medida, y guías para facilitar el desplazamiento del scanner. Las unidades expresadas en $\text{cm}^2/\text{planta}$.

- **Materia seca en hojas y raíces:** Esta determinación se describe en la fase uno de la investigación, de acuerdo con la metodología reportada por Waissbluth & Valenzuela, 2007.

- **Determinación del Contenido hídrico relativo en hojas:** Esta determinación se describe en la fase uno de la investigación, de acuerdo con la metodología del estado hídrico.

- **Nutrientes foliares (Macronutrientes N, P, K, Ca, Mg, S):** Esta determinación se describe en la fase uno de la investigación, de acuerdo las metodologías de espectrometría y absorción atómica.

- **Determinación de la Mortalidad de plántulas:** Se describe en la fase uno de la investigación, de acuerdo con cálculo matemático expresado en porcentaje (%).

5.2.7 Análisis de la información fase 2.

La información de las distintas variables se sometió a análisis de varianza (ANDEVA) donde se evaluó el efecto de los tratamientos establecido por el estado fitosanitario y los factores relacionados con el manejo integrado de las plántulas y sustratos (acidificación del pH, control preventivo del patógeno y la aplicación de reguladores de crecimiento radical) . Las pruebas de Duncan y DMS se utilizaron para los casos en los cuales se detectaron diferencias significativas. Para estimar las correlaciones entre las variables se calculó el coeficiente de Pearson con nivel de significancia $P \leq 0,05$. El paquete estadístico usado fue SAS (versión 9.1).

6. Resultados y discusión fase 1

6.1 Relación con el sistema de producción

El diagnóstico del sistema de producción identificó algunos aspectos importantes que a continuación se detallan:

Selección de semillas: El sistema de producción tiene un criterio único para identificar los daños ocasionados por insectos y enfermedades, el cual consiste en realizar una valoración inicial del estado de la semilla considerando la apariencia visual de sanidad o daño, posteriormente se realiza el lavado y despunte o corte transversal para verificar la sanidad al interior (figura 3).

Para iniciar un proceso adecuado de obtención de plántulas de aguacate, se debe tener cuidado en la recolección y posterior selección de las semillas (Ararat, 2010); cualidades básicas relacionadas con la genética, fisiológica y aspectos fitosanitarios, deben ser consideradas en la obtención de plantas productivas. Se debe garantizar el uso de semillas sanas, de buen tamaño (figura 4), cosechadas de árboles libres de enfermedades y de producción continua de acuerdo a los requisitos establecidos por el ICA, 2009 (anexo 1.1).



Evaluación inicial de semillas:

- A. Semilla en buen estado.
- B. Semilla con daño por microorganismos



Corte Transversal de semilla:

- C. Semilla en buen estado
- D. Semilla con daño por microorganismos
- E. Semilla con daño por insecto perforador

Figura 3 Selección de semillas de aguacate.
(Foto BIOTEC, 2009)



Figura 4 Evaluación del tamaño de semillas sanas de aguacate.
(Fuente Ararat, 2012)

En el diagnóstico del sistema de producción se estableció un ensayo de pregerminación con semillas de igual tamaño de las variedades Hass, Lorena, Waldin, Duke 7 y G-755 para determinar el efecto del despunte (1/2 pulgada) sobre el tiempo de la germinación.

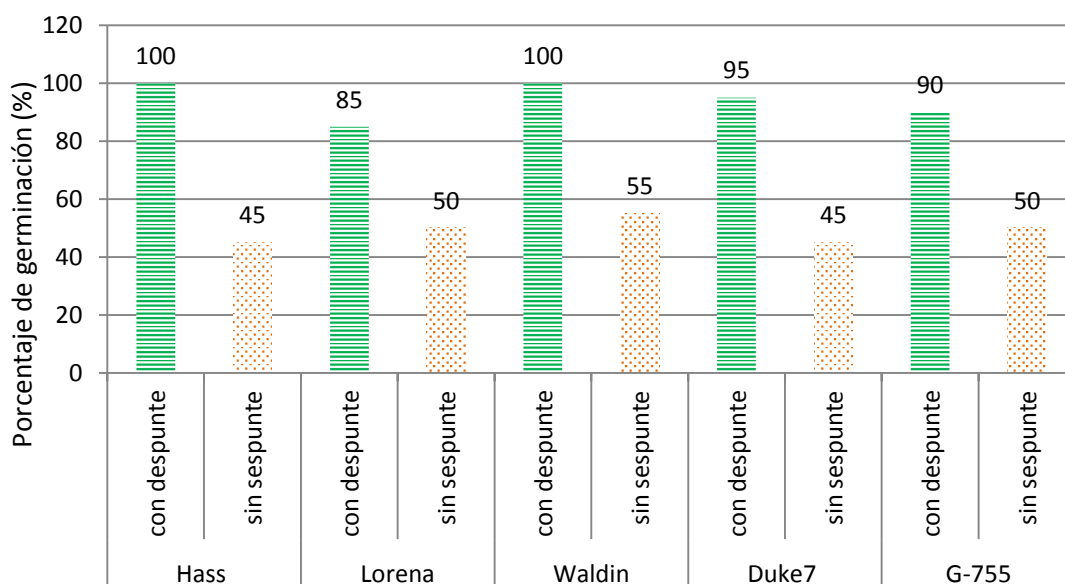


Figura 5 Efecto del despunte de semillas de aguacate sobre el porcentaje de germinación

Los resultados ilustrados en la figura 6 muestran que para todas las variedades de aguacate, se evidenció un efecto del 100% de la germinación en las variedades Hass y Waldin y cuando no se realizó la labor del despunte, ninguna de las variedades alcanzaron el 60% de la germinación; este resultado permite comprobar y definir este método en sistemas de producción a nivel de vivero.

Igualmente, en todas las variedades se observó que hay una aceleración en el tiempo de germinación por efecto del despunte (figura 6), donde se destaca la variedad Lorena con una disminución de 27 a 19 días, considerado como un ahorro del 29% del tiempo total). Esta labor podría contribuir no solo a la homogenización del desarrollo y crecimiento de las plántulas desde la fase de semillero, sino también al mejoramiento de tiempos y movimientos en las labores agronómicas del sistema de producción.

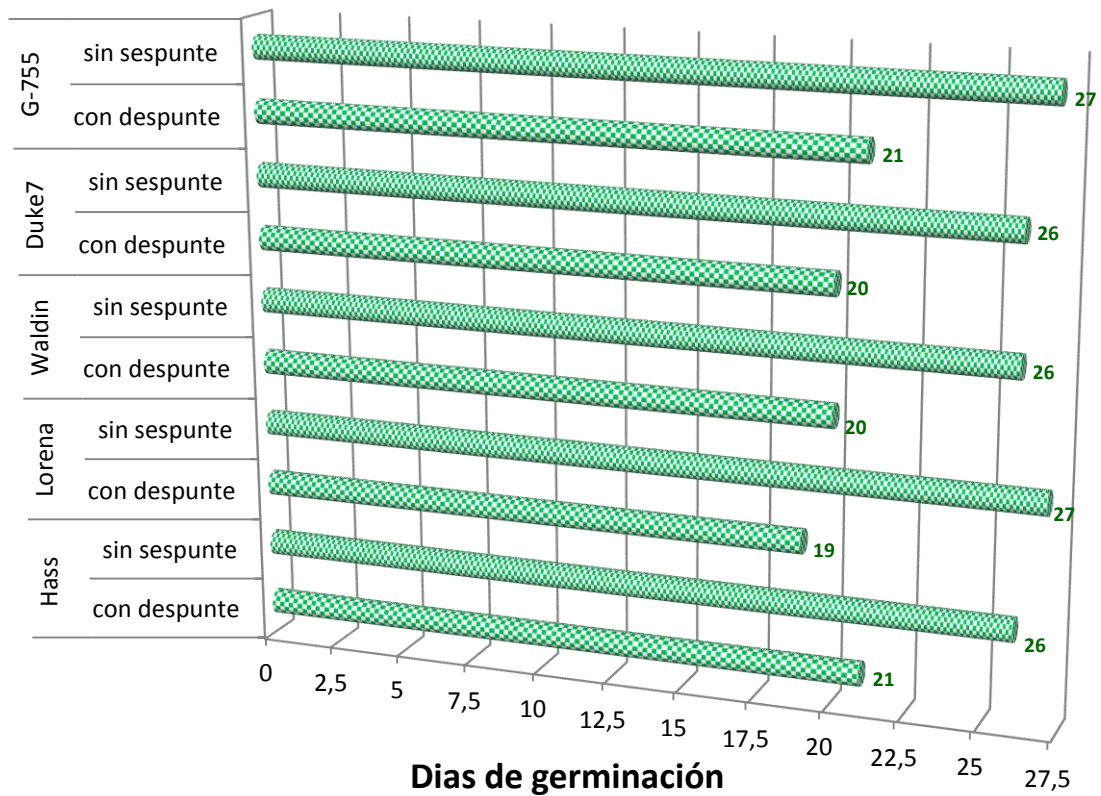


Figura 6 Efecto del despunte de semillas de aguacate en la germinación

Existen algunas hipótesis que intentan explicar esta situación; este efecto podría atribuírsele a que el área de la semilla descubierta perteneciente a los cotiledones y expuesta a las temperaturas del sustrato tendría una mayor sensibilidad que la de la epidermis; Osipi y Nakagawa (2005), resalta como la alternancia de temperatura entre el día y la noche de la zona radical parece afectar principalmente los niveles de germinación y la uniformidad algunas especies, mostrando efectos sobre la inducción de la liberación de la latencia, existiendo algunas que exigen puntualmente esta condición ambiental.

Estos ensayos conllevan a la selección de patrones y/o técnicas para el mejoramiento de características agronómicas como por ejemplo la reducción del porte de las plantas para el empleo de altas densidades de población en campo; por tanto, cualquier diagnóstico de producción de plántulas debe buscar facilidades de propagación y buena afinidad del injerto, una combinación entre el porte y vigor necesario para tener altos rendimientos, resistencia o tolerancia

a los factores abióticos como la salinidad del suelo y bióticos como las pudriciones radicales; pero sin perturbar la calidad que identifican la variedad.

El Injerto: La selección, corte y manipulación de yemas para el injerto, asegura un buen desarrollo de la plántula; el diámetro debe coincidir con el porta injerto o patrón, así se garantiza un óptimo acople y prendimiento; La recolección y clasificación por tamaño de las yemas (figura 7) debe realizarse de 6 - 7 de la mañana, desinfectadas y almacenadas en una caja de icopor para evitar la deshidratación y conservar una temperatura por debajo de los 15 °C durante su manipulación (Ararat, 2010). La figura 8 ilustra diferencias tanto en el diámetro del patrón como del injerto, los cuales ocasionan retrasos en el desarrollo vegetativo.



Figura 7 Tamaño de yemas para injertos obtenidos de huertos de aguacate variedad Hass. (Foto BIOTEC, 2010)

Los huertos básicos de aguacate para la obtención de “yemas” para injertos, deben tener plantas madres identificadas y caracterizadas, soportadas con documentación verificable ante las autoridades fitosanitarias (ICA, 2009).



Figura 8 Injerto con diferencias entre el diámetro del patrón y las yemas de aguacate (Foto Ararat, 2010)

Según Ayale *et al.* 2010, cuando se tiene un injerto exitoso en aguacate, se puede esperar que la planta obtenga respuestas fisiológicas positivas como la promoción de mayor densidad de células epidérmicas; en la figura 9, se detalla la igual dimensión en los diámetros correspondientes al patrón o portainjerto con el injerto.



Figura 9 Injerto exitoso de la variedad Hass con 25 días de desarrollo en vivero
(Foto Ararat, 2010).

Avilán *et al.* (1999), reportaron que el manejo óptimo del patrón y el injerto intermedio tienen influencia sobre variables de rendimiento (peso, forma y dimensiones del fruto y la semilla del injerto o copa); Las variaciones observadas fueron más acentuadas cuando se emplea en la combinación como patrón la variedad Duke.

Calidad del sustrato convencional: Se obtuvieron datos de pH alcalino para el compost de cachaza y la carbonilla con valores superiores a 8.04 y 8.28 respectivamente; Según Messerer (1998), el aguacate es uno de los frutales más sensibles a las condiciones físicas y químicas del medio de propagación; es una especie que tolera una muy baja salinidad, requiere de sustratos bien aireados y sin saturación de humedad, resiste bajos niveles de cloruros y bicarbonatos y el pH debe ser neutro a ácido. Por tanto, esta condición servirá

de parámetro de comparación a otras especies frutales, cuyos requerimientos edafológicos no son tan exigentes.

Un rango de pH de 5.5 a 7.0 es el mejor para el desarrollo de la mayoría de las plántulas de frutales en condiciones de vivero. Para reducirlo es posible agregar como fertilizante sulfato de amonio y para elevarlo usar nitrato de calcio (Hartmann, Kester y Davies, 1990); sin embargo es necesario definir esta variable con el tipo de frutal comercial.

En cuanto a la distribución física de los materiales de las mezclas, se encontró diferencias en el tamaño tanto en los agregados del compost como en mezclas con cascarilla de arroz; esta heterogeneidad puede ser uno de los aspectos más importantes que definen el flujo del aire y el movimiento o retención del agua de manera desuniforme; como se ilustra en la figura 10, los diferentes tamaños y la consistencia de los agregados son punto de partida para la generación de estudios relacionados con la dinámica del agua, crecimiento o efectos en las raíces y actividad de los microorganismos presentes.

Compost de cachaza para sustratos, foto Ararat (2012)



Figura 10 Identificación de limitantes en los sustratos: heterogeneidad de los tamaños de agregados del compost de cachaza

Insumos aplicados: El manejo convencional del sistema de producción utiliza productos de síntesis química en todas las etapas del proceso; pesticidas como carboxamida para la desinfección de semillas; para el control de enfermedades fungosas en estado de plántula se aplica Mancozeb Benlate y Ridomil; en cuanto fertilizantes, se hacen aplicaciones cada 2 meses de urea, sulfato de potasio y fosfato di amónico por planta. Después de la injertación, se notó la presencia de

insectos plaga como el *Copturus* spp (Coleoptero: *curculionidae*), el cual no registra daño económico y en ocasiones fue controlado en los tratamientos convencionales a través de aplicaciones de dosis preventivas de insecticidas de piretroides o fosforados.

Implicaciones económicas: La figura 11 muestra la distribución de los costos de las principales actividades del sistema de producción (materiales, insumos y mano de obra), donde el mayor valor (50,7%) corresponde a la actividad de preparación de los sustratos, seguido con la obtención de semillas con 38,1% (figura 9):

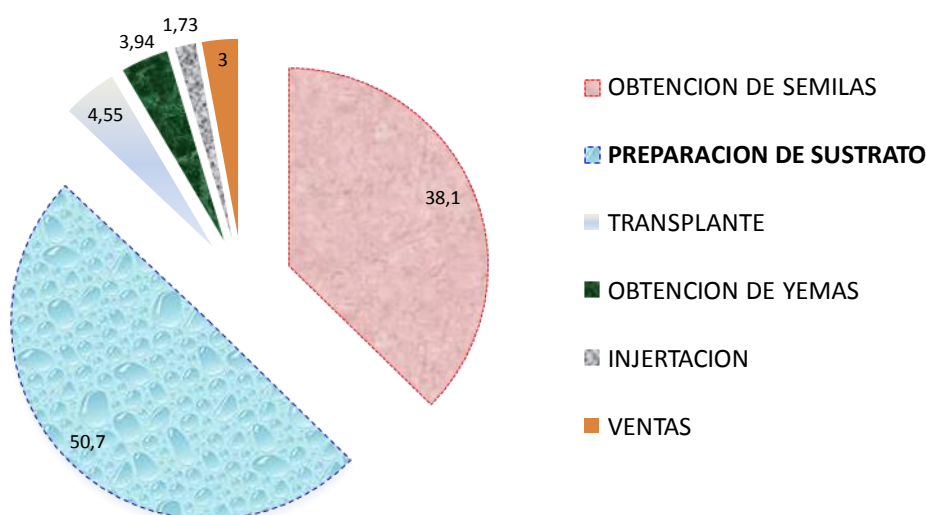


Figura 11 Distribución de costos en la obtención de plántulas de aguacate

Esto implica una mayor atención en la calidad y manejo los sustratos para garantizar adecuadas condiciones físicas químicas y biológicas para y así evitar altas mortalidades de plántulas que inciden directamente en los costos de producción; Logicamente, esto depende de la oferta y tipo de los materiales en el mercado que permita una eficiente preparación o mezcla.

De acuerdo con Masague y Lopez-Cuadrado (2006), a esta última circunstancia, se le une la necesidad de gestionar de forma adecuada los residuos orgánicos generados en los sectores agrícolas, agroindustriales forestales y urbanos, con criterios técnicos y ambientales para encontrar validez rentable de producción en viveros.

Propuesta para el mejoramiento de la calidad de sustratos: Uno de los principales problemas para obtener la mayor homogeneidad en la elaboración de los sustratos, es la preparación de las mezclas, ya que, de ello depende de las condiciones ideales para ofrecerle a la adecuada aireación y retención de humedad, las propiedades químicas como el pH y conductividad eléctrica y disponibilidad de nutrientes; La dinámica poblacional de microorganismos funcionales (celulolíticos y oxidantes de diferentes formas del nitrógeno) son entre otros importantes.

En la preparación de sustratos, se detectaron falencias en el proceso de mezcla con la malla o tamiz, en la cual quedan demasiados residuos y agregados de compost de tamaños de diámetros superiores a 10 cm; estos residuos son utilizados nuevamente en el llenado de bolsas generando heterogeneidad entre las partículas; Se identificó que el 10,67% del compost está saliendo del proceso, causando variación en la mezcla final; además, la operatividad manual durante un jornal no garantiza una mezcla estándar o tamaños homogéneos en la mezcla final (figura 12).



Figura 12 Preparación convencional de sustratos con tamiz o malla (Fuente, autor).

Para ello se diseñó y se fabricó una máquina mezcladora de materiales para obtener un sustrato homogéneo teniendo en cuenta las características de cada material y los cálculos para determinar la cantidad requerida en el sistema de producción de plántulas en vivero (figura 13).

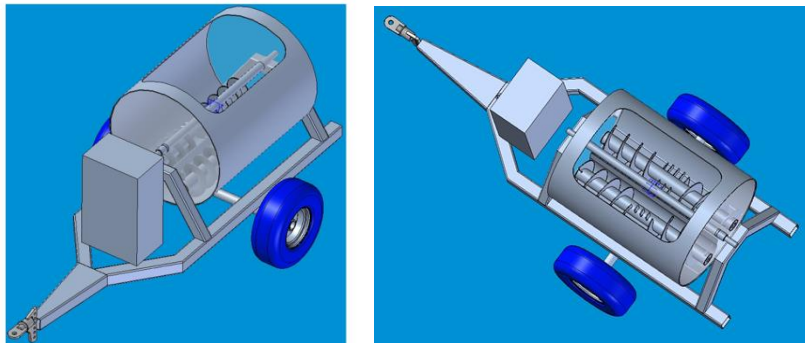


Figura 13 Diseño para una maquina mezcladora de sustratos

El Diseño de la mezcladora de sustratos tuvo en cuenta factores técnicos y económicos importantes para la determinación de un prototipo funcional y eficiente, los cuales permitieron la evaluación del comportamiento del sustrato frente a las respuestas fisiológicas de las plántulas. Se realizaron las pruebas experimentales de mezclado y homogenización del tamaño de los materiales, con el fin de observar y mejorar indicadores calidad y cantidad de la mezcla.

Las características de la maquina son las siguientes:

- Equipo con tambor rotativo construido en lámina HR A 36.
- Chasis construido en forma tubular.
- Mecanismos de rotación de “sinfines” con hélices opuestas accionados por piñón y cadenas

- Mecanismo de rotación accionado por embrague mecánico de accionamiento manual, tracción del tambor por rueda en contacto con el anillo externo.
- Accionamiento hidráulico de tractor de 540 RPM
- Moto-reductor de entrada a 540 RPM y salida a 20 RPM
- Capacidad volumétrica: 1,5 m³
- Capacidad efectiva: 1,0 m³
- Rendimiento estimado: 2,5 m³ sustrato/hora

Beneficios:

- Optimización en tiempos de mezcla de los materiales.
- Obtención de un sustrato homogéneo y con poca variación en las proporciones de cada componente.
- Posibilidad de implementar un sistema de producción permanente.
- Desagregación de componentes apelmazados.

Propuesta para el diseño de un sistema de riego en sustratos: considerando la necesidad de mantener una humedad adecuada en los sustratos el uso efectivo del agua de riego para las plántulas de aguacate, se planteó la micro-aspersión como una herramienta que posibilita la eficiencia hídrica a través de modelos que permiten controlar la uniformidad, distribución y frecuencia del riego en condiciones de vivero, donde la humedad de los sustratos debe ser controlada para evitar la pudrición de raíces.

En la propuesta ilustrada en los anexos 2 y 2.1, se determina: coeficientes de humedad, lámina de precipitación (l_p), velocidad del viento y las respectivas fórmulas matemáticas relacionadas con caudal y tiempo muerto para obtener el número de módulos y su respectivo tiempo de riego. Con un caudal inicial y usando el modelo de Hazen-Williams se halló el diámetro de la tubería de conducción; el diámetro de tubería múltiple se determinó a partir del factor de Christiansen considerando el criterio de pérdidas. Se calculó el diámetro de la tubería lateral teniendo en cuenta tanto el radio húmedo del microaspersor como el Factor de Christiansen y de Hazen-Williams. Finalmente, con las sumatorias de energías se obtuvo la potencia de la bomba. En estos sustratos se estableció un

caudal inicial de 0.0010m³ /sg con una frecuencia de riego cada 3 días, una lamina de precipitación de 12mm/h, y un tiempo de riego de 1 hora utilizando 10 módulos.

6.2 Relación con Propiedades físicas en sustratos

Densidad aparente: el análisis de varianza, muestra que existe diferencias significativas en los valores de densidad aparente de los sustratos evaluados; en la figura 14, generada a partir de la prueba de comparación de medias, muestra que los tratamientos con altos contenidos de cascarilla de arroz como el T5 y T3 presentaron los valores más bajos (0,32 y 0,35 g.cm⁻³ respectivamente).

Los valores más altos correspondieron a los tratamientos T1 y T2 (0.62 y 6.34 g.cm⁻³ respectivamente), considerando que en este último se tenía una proporción de compost fue del 100%;

Este resultado coincide con lo reportado por Aburto (2007), donde recomienda manejar densidades por debajo de los valores recomendados para suelos; así mismo, Abad *et al.*, (2004) resalta que valores alrededor de 0.26 y 0.53, favorecen significativamente la capacidad operacional, disminuyendo los costos de transporte y manipulación de los materiales.

El aumento de la proporción de compost en la mezcla de los sustratos generó una relación directamente proporcional con el aumento de la densidad aparente (anexo 15); esta situación podría generar problemas en las plántulas, ya que conforme va aumentando la densidad de los sustratos, el crecimiento de las raíces va requiriendo un mayor gasto de energía y su desarrollo se va viendo afectado, pudiendo verse totalmente impedido si la compactación es excesiva.

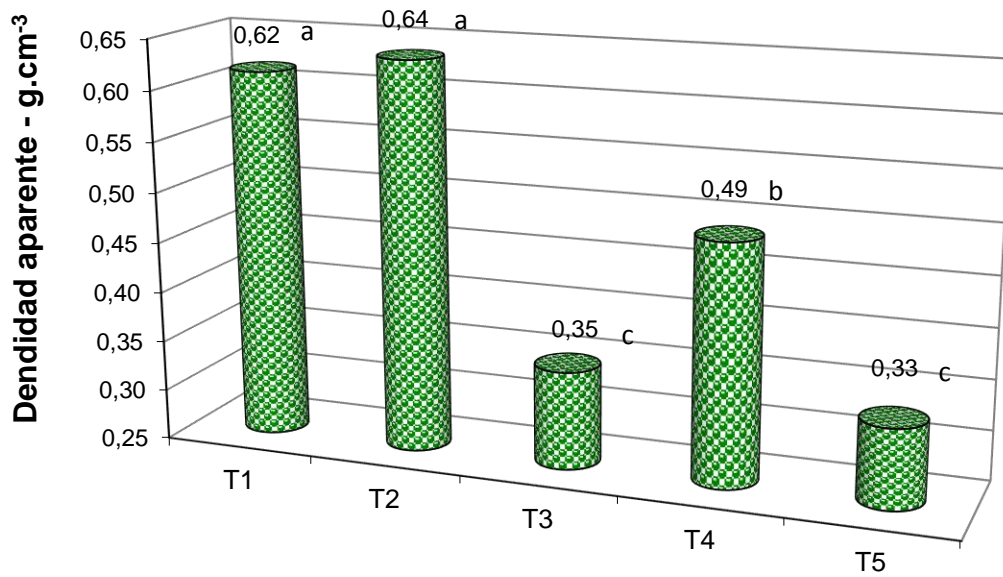


Figura 14 Valores de densidad aparente de los sustratos para porta injertos de aguacate

Conductividad hidráulica: El movimiento del agua en los sustratos es muy importante tanto para medir la capacidad de conducción del flujo del agua, como para también relacionar la retención y distribución de poros; de esta manera, la conductividad hidráulica nos permite mostrar el drenaje del agua de riego o de las lluvias en los mismos; el T3 quien resultó con la menor densidad aparente, obtuvo las mayores velocidades en la conductividad hidráulica, seguido del T5 (figura 15).

Al comparar estos resultados con la evaluación de la conductividad hidráulica en suelos de uso agrícola (Pinzón, 2003), la interpretación en estos sustratos es “muy rápida”, ya que la velocidad es superior a 18.0 cm.h⁻¹.

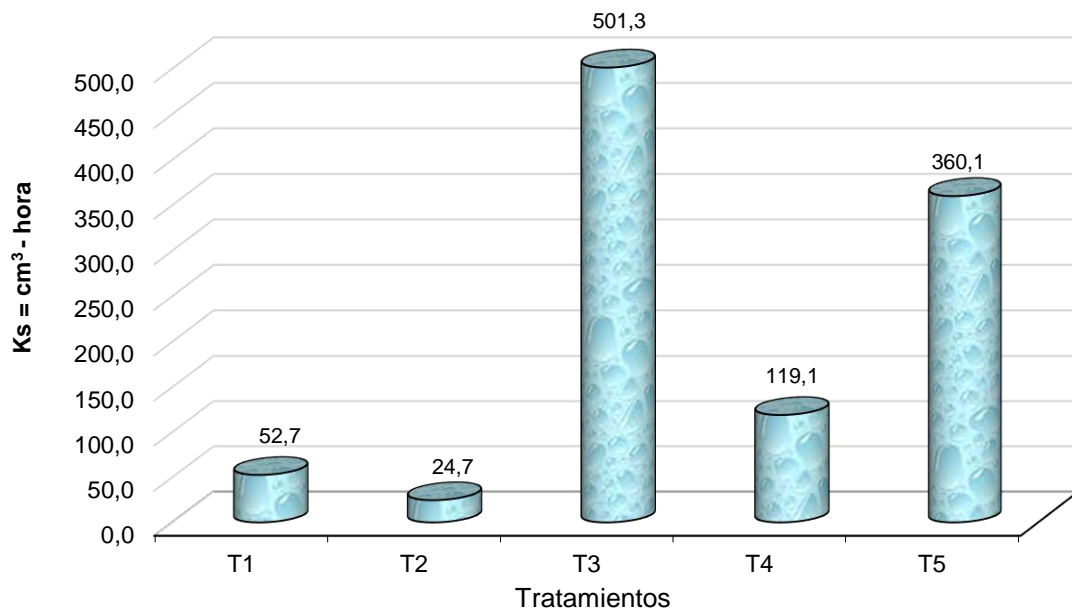


Figura 15 Determinación de la conductividad hidráulica en sustratos para portainjertos de aguacate

El aguacate posee raíces absorbentes suberizadas relativamente ineficientes y con alto requerimiento de oxígeno (Wolstenholme y Whiley, 1999). Lo anterior unido a una baja frecuencia de pelos radicales y una baja conductividad hidráulica (Wolstenholme, 1987) provocaría una variación diurna excesiva en el contenido de agua del árbol (Whiley et al., 1986), lo anterior afectaría el crecimiento de la planta en las etapas de mayor demanda evapotranspirativa, esto podría explicar el menor crecimiento de las plantas alcanzado en el T2, ya que estas se desarrollaron en un medio con una baja macro porosidad (tabla 6) lo que produjo un sistema radical poco desarrollado en cuanto a materia seca (tabla 12), siendo todo lo contrario en los restantes tratamientos que a su vez tuvieron el oxígeno más disponible para las planta.

Esto se relaciona con los resultados de la tabla 8, donde el T5 y T3 resultaron con las mayores distribuciones de macro poros (64.27% y 62.83% respectivamente), al contrario, el T2 obtuvo el menor valor (29,75%) y consecuentemente el contenido más alto en micro poros (36.96%); estos valores son coherentes a los reportados por Ibáñez (2006), quien menciona que a medida que se incrementa la densidad aparente disminuye el espacio poroso, especialmente la porosidad de mayor diámetro, que es la ocupada por el aire y el agua útil, reduciendo así el crecimiento de las raíces.

Para este caso, las características del T2 comienzan a cobrar importancia para el manejo de las proporciones en sustratos, ya que podría generar condiciones que favorecen la pudrición de raíces a través de agentes patógenos como *P. cinnamomi* Rands; lo anterior coincide con Pegg *et al.* (2002) quienes afirman que la pudrición de raíces de aguacate es más severa y se desarrolla más rápidamente con lento drenaje.

Tabla 8 Distribucion porcentual de poros en los sustratos de crecimiento de plantulas

Tratamientos	Macro poros	Meso poros	Micro poros
T1	55,53	19,24	25,23
T2	29,75	33,29	36,96
T3	62,83	22,24	14,93
T4	40,42	39,90	19,68
T5	64,27	17,61	18,12

Algunos autores como Ansorena (1994) consideran que a microporosidad de un sustrato no debe exceder el 30% ya que podría representar problemas de drenaje, asfixia y/o pudrición de raíces en aguacate, lo que indica que T1, T3, T4 y T5 se encuentran bajo este parámetro, mientras que T2 supera esta condicion y esta mas propenso a condiciones adversas para las plántulas de aguacate.

Retención de Humedad: los valores determinados se evaluaron con relación a constantes de humedad del suelo; según la prueba de comparación de medias (Duncan) ilustrada a través de la figura 16, el T2 que correspondió a un 100% de compost, obtuvo los máximos valores de retención de humedad en todos los puntos, desde saturación con 253.2% hasta el punto de marchitez permanente con 71.5%, (tabla 9), lo que puede ocasionar drenaje lento y aumento en problemas fitosanitarios como la presencia de *P. cinnamomi* Rands, ya que la supervivencia de diferentes especies de este patógeno en tejido hospedante, depende principalmente de la alta humedad. (Weste, 1994).

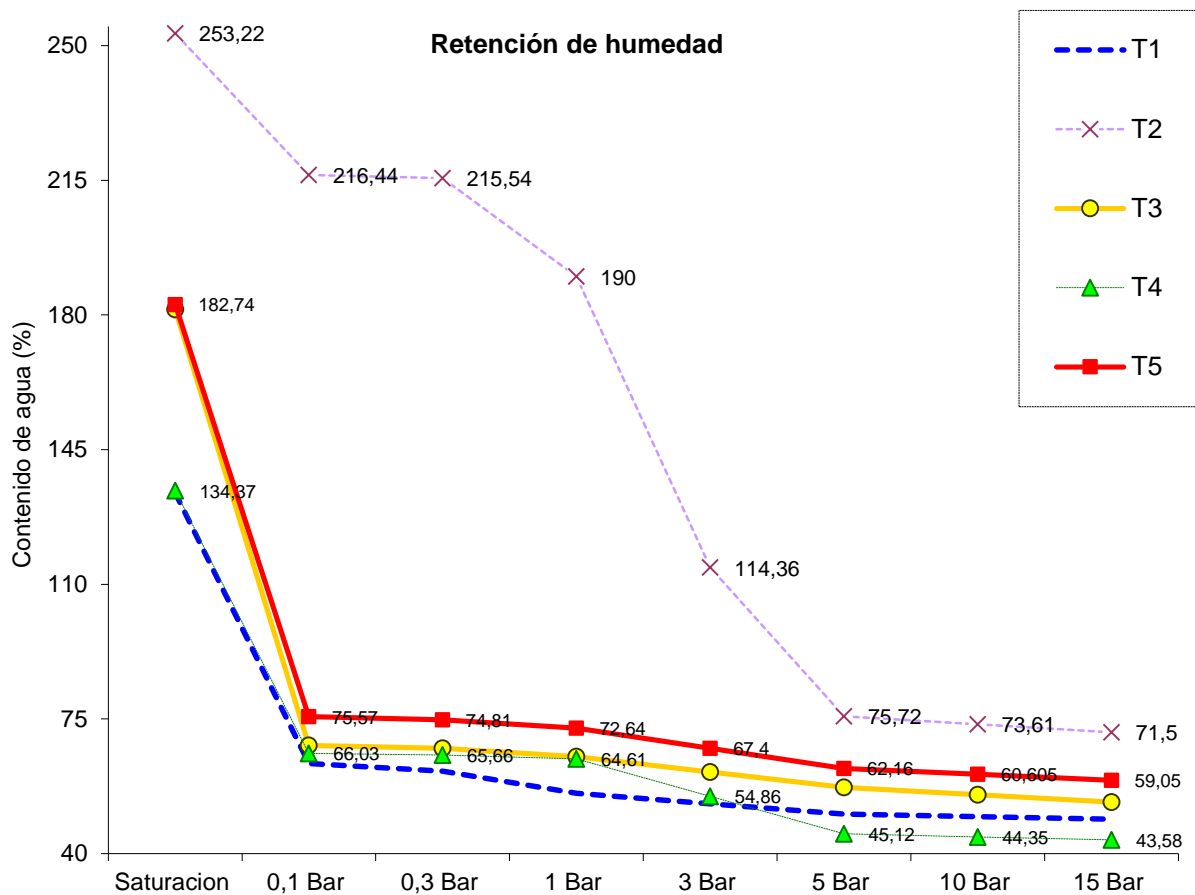


Figura 16 Determinación de curvas de retención de humedad de sustratos de plántulas de aguacate

Un sustrato adecuado corresponde a aquel que tiene un 20 ó 30 % de agua fácilmente disponible (Ansorena, 1994), para este caso, se supero este porcentaje en todos los tratamientos, sin embargo, la misma figura 16 muestra como el T2 que obtuvo valores por encima del 100% a capacidad de campo (0.3 bares), su efecto se debe al contenido de microporos (tabla 8) y sus consecuencias negativas como la alta mortalidad de plántulas (anexo 16).

Tabla 9 Retencion de humedad a 15 bares de succión matricial en los sustratos de crecimiento de plantulas de aguacate.

Tratamiento	Contenido de agua * (%)
T2	71,50(a)
T5	59,05(b)
T3	53,39(c)
T1	48,96(d)
T4	43,58(e)

(*): Letras diferentes significan promedios estadísticamente diferentes según la rueba de Duncan (0.05).

En el manejo de la humedad de los sustratos, es importante resaltar la cantidad de Compost de Cachaza en la mezcla, ya que se encontró una relación directamente proporcional de altos contenidos de este material con el incremento de microporos ($R^2= 0.89$) (anexo 17), siendo el T2 el tratamiento que mas puede llegar a afectar negativamente el desarrollo de las plantulas de aguacate de acuerdo con Zentmyer *et al* (1994), quienes encontraron mayor severidad en la pudrición de raíces estudiando la relación entre el potencial mátrico e hídrico del suelo relacionado a la infección de *P. cinnamomi* en raíces de *Persea indica*, es decir, a 0,05 bares de potencial mátrico obtuvo el mayor daño, reduciendose considerablemente a 0,10 bares.

A partir de los datos encontrados en T2, se le dá mayor importancia al contenido de compost en un sustrato ya que permite definir condiciones adversas como lo obtenido por Kuan y Erwin (1980), quienes estudiaron el efecto de la predisposición de la saturación de agua del suelo sobre la pudrición de raíces ocasionada por *Phytophthora* en Alfalfa, y concluyeron que ésta se debe al incremento del daño a las raíces y consecuente exudación de nutrientes, lo que incrementa la atracción quimiotóxica de zoosporas a la zona de las raíces.

Durand y Du Plessis (1990) y Whiley *et al.* (1987), señalan que el sistema radical del aguacate posee una baja densidad de pelos radicales, por ello, han sido descritos como extremadamente sensibles a las condiciones de falta de oxígeno en situaciones de saturación por exceso de humedad.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante el seguimiento efectuado a variables de las propiedades físicas de los sustratos, es posible señalar que el problema de las plántulas se debe a una asfixia de raíces, produciéndose la muerte de algunas de ellas por una probable susceptibilidad de las mismas a los patógenos que aprovecharían el estrés y muerte de raicillas para parasitar a la planta.

6.3 Relación con Propiedades químicas en sustratos

Características de los materiales de las mezclas: comparando el resultado de la composición química de los materiales de los sustratos con la norma técnica Colombiana NTC 5167, se puede considerar la cachaza del experimento para obtener el compost como “Enmienda No Humica” ya que los parámetros que cumplen son: el pH de 7.75, la Capacidad Intercambio Catiónico (CIC) con valores promedios de $40.42 \text{ Cmol.Kg}^{-1}$, materia orgánica 30,61%, Carbono Orgánico 17,75% y Calcio (CaO) 5,86%; por tanto, la riqueza de los minerales reportados como N total, P_2O_5 , K_2O y MgO, no superan el mínimo exigido por la norma (2%) para denominarse “Abono Orgánico Mineral Sólido” (anexo 18);

La carbonilla se caracterizó por presentar bajos contenidos de macronutrientes (N, P_2O_5 y K_2O) y una CIC menor de 3 Cmol.Kg^{-1} (anexo 6), la aplicación tuvo como principal propósito, el mejoramiento de condiciones físicas como la porosidad y drenaje (anexo 19).

En cuanto a la cascarilla de arroz, su principal componente fue el Silice (en forma de SiO_2), cuyo análisis alcanzó 10.1% (anexo 20); este valor coincide con lo reportado por Sierra (2009), donde especifica un rango de 10 – 12% en muestras obtenidas para otro tipo de alternativas de aprovechamiento de este material en Colombia; en la práctica, para valorar la calidad de un sustrato no basta con conocer las propiedades químicas generales, sino también es necesario determinarlas para cada ingrediente o mezcla particular (Ansorena, 1994); de acuerdo a esto, el silicio soluble presente en la cascarilla de arroz podría ser una alternativa de control de patógenos ya que se polimeriza rápidamente, dando por resultado los compuestos insolubles que posteriormente se deposita debajo

de la cutícula formando una doble capa (Silicio - cutícula fina) y que limita la transpiración (Epstein, en 2001).

Arredondo y Restrepo (2012), reportan que el uso de un producto para la mezcla de materiales y en este caso para sustratos de enraizamiento, debe ser un acondicionador que cumpla con los parámetros de calidad establecidos en la norma y estar certificado por el ICA para realizar su comercialización.

Dinámica del pH de los sustratos: se monitoreó el pH del sustrato convencional para estimar la tendencia a través del tiempo; en el primer mes se reportaron promedios de 8.38, incrementándose desde el segundo mes y estabilizándose hasta el final del experimento (mes 11) en 8.64; este incremento se ilustra en la figura 17 con una tendencia logarítmica ($R^2: 0.94$) al que se le atribuye la composición de los materiales como el compost de cachaza con altos contenidos de calcio (CaO) y adicional de esto la calidad del agua de riego que aumentó la conductividad eléctrica en el tiempo (anexo 21).

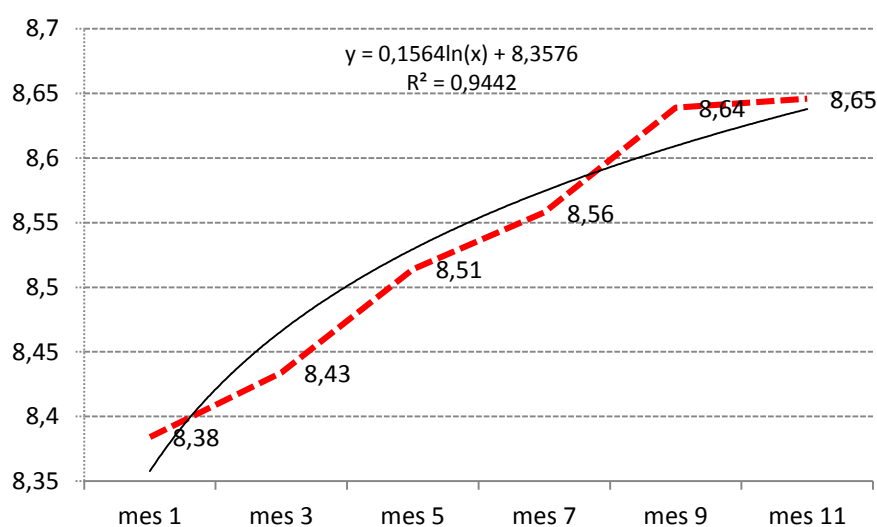


Figura 17 Cambios en pH del sustrato convencional en el tiempo

Para las evaluaciones de los 5 tratamientos, se registró el mayor valor de pH en el T2 con 9.15 como se muestra en la figura 18, que además obtuvo los más altos valores de conductividad eléctrica (1.10 dS.m^{-1}); el T3 obtuvo el menor promedio de pH con 8.1, clasificándose de igual manera como alcalino.

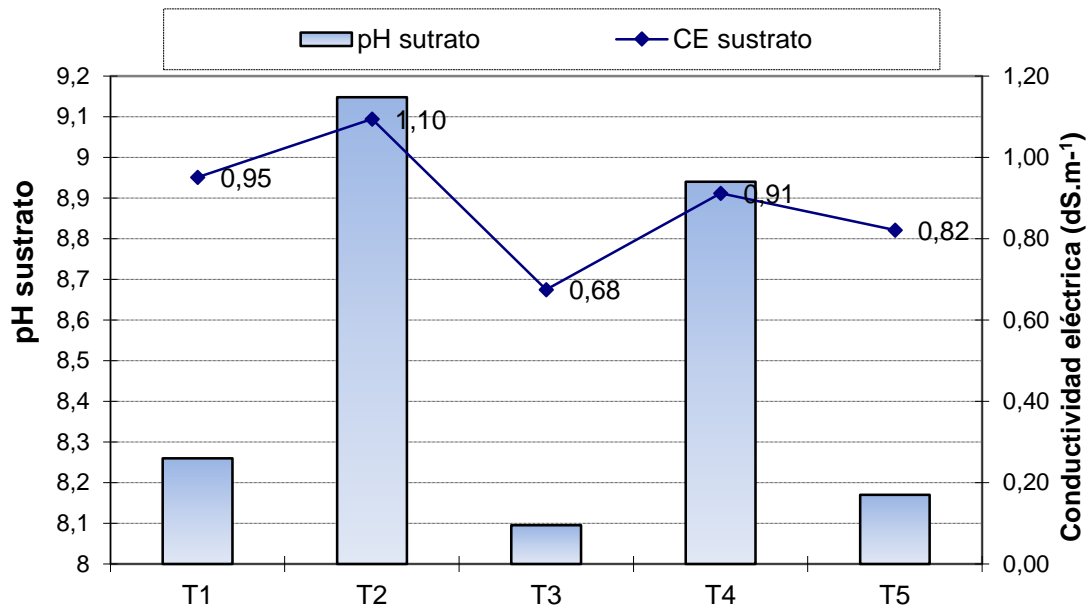


Figura 18 Relación del pH y la conductividad eléctrica en diferentes sustratos

Al observar el comportamiento de esta variable en todos los tratamientos a través del tiempo (figura 19), se puede evidenciar la tendencia de aumento del pH de forma general, donde el T2 alcanzó los máximos promedios en el mes 7 con 9.26; a partir de ahí se estabiliza hasta el mes 11 con valores de 9.24.

En plantas de aguacate se podría establecer como rango óptimo de pH en el suelo entre 5,5 y 6,5 existiendo algunas ventajas bajo este rango (Wolstenholme, 2002). Sin embargo, a un mismo nivel de pH la disponibilidad de nutrientes cambia en un suelo mineral en comparación a un sustrato orgánico (Handreck y Black, 2002).

Para este caso, se podría esperar una baja disponibilidad de fósforo por los altos pH, sin embargo Burés en 1997, argumenta que los materiales orgánicos utilizados como sustratos presentan una mayor capacidad buffer que los sustratos de origen mineral, lo que permitiría a la plántula una mayor adaptabilidad al sustrato.

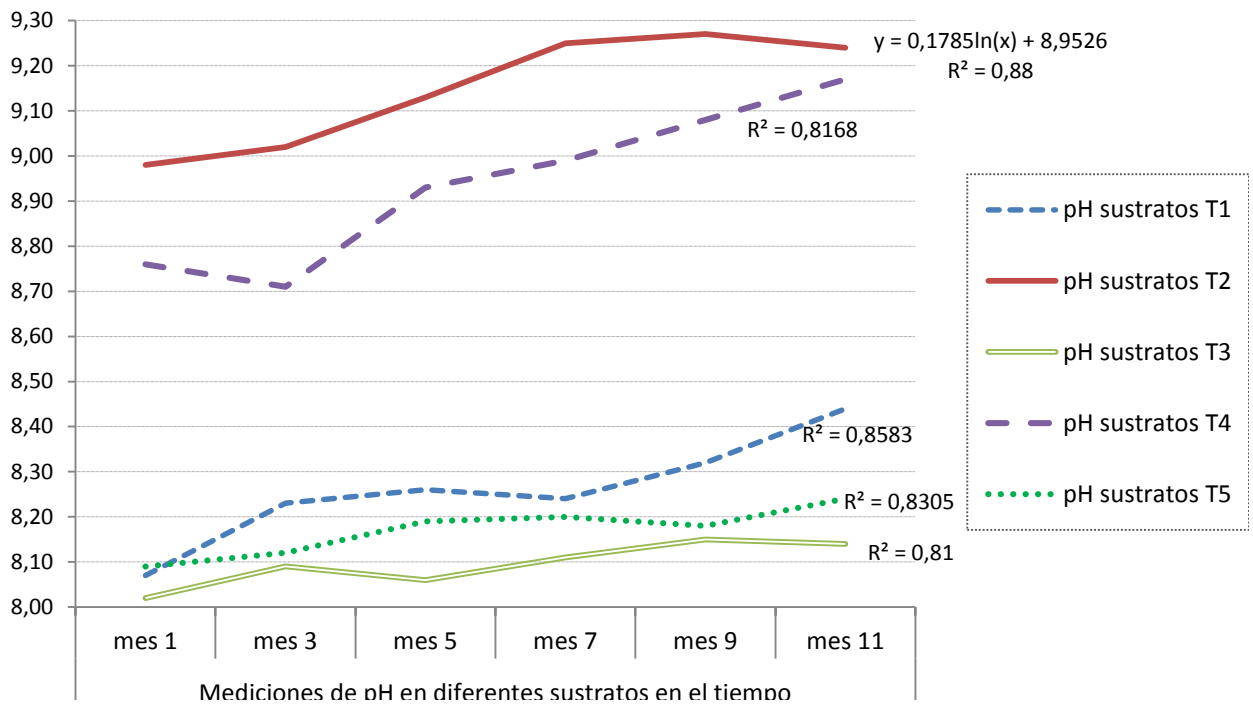


Figura 19 Cambios en pH de diferentes sustratos durante el tiempo de experimentación

Otro nutriente que puede estar influenciado directamente por el pH de los sustratos es el azufre (S), según Colacelli en 2001, la mineralización de este elemento depende de la influencia de la población y actividad microbiana; el mismo autor, indica que un aumento del pH determina una mayor mineralización del S, principalmente cuando hay altos contenidos de materia orgánica; esta situación se ilustra a través del anexo 23.1 e igualmente se podría estimar dicha relación con las características de los tratamientos T2, T5 y T3, que obtuvieron los mayores valores de carbono orgánico con 17.6, 5.74 y 5.65% respectivamente; Sin embargo, hay que tener en cuenta como el T2 obtuvo condiciones físicas desfavorables para el desarrollo de las plantulas y otras respuestas biológicas que se describen mas adelante.

Gardiazabal (1990) afirma que el pH influye en la velocidad de crecimiento y diámetros de raíces de aguacate, siendo más favorable un pH ligeramente ácido en comparación a uno ligeramente básico. Lo anterior coincide con lo reportado por Aburto en 2007, donde el tratamiento con turba, arena Compost y fibra de coco, logró los menores valores de pH (6.2 en promedio) y las mayores respuestas fisiológicas en la mayoría de los parámetros de crecimiento.

Con relación a la posible presencia de *Phytophthora* spp con el pH del suelo, Rodriguez *et al.* (2004), define un rango de 6.31 a 8.75 para la compatibilidad entre especies de este patógeno, sin embargo, no permite avalar la efectividad de los mismos y recomienda adoptar líneas de investigación encaminadas a discernir la posibilidad de que el pH sea un factor determinante sobre el tipo de compatibilidad sexual entre especies de *Phytophthora*.

Conductividad eléctrica (CE): La medida de CE resulta ser una forma de expresar el contenido de sales presentes en un sustrato. Según Martínez (2005) los valores de CE superiores al rango de 1,8-2,25 (dS.m⁻¹) reducirían el crecimiento en frutales, causarían problemas de marchites y quemadura apical de las hojas. Valores superiores a 3,4 dS/m causarían lesiones severas y pérdidas irreversibles de los cultivos.

Los resultados mostrados en la tabla 10 muestran como el T2 presentó los mayores valores de CE incrementándose en el tiempo, sin embargo, esta situación no generaría estrés para la planta según Bisono & Hernández (2008), quienes reportan que el caso del aguacate cuando se encuentra cultivado en suelos con una conductividad superior a 3 (dS.m⁻¹), comienzan a presentar efectos tóxicos de los cloruros de sodio y magnesio, provocando quemaduras en las puntas y bordes de las hojas y defoliaciones intensas.

Tabla 10 Cambios de la Conductividad eléctrica en sustratos para plántulas de aguacate.

Tratamiento	Meses de observación						Promedio
	1	3	5	7	9	11	
T1	0,92	0,94	0,94	0,97	0,95	0,99	0,95
T2	1,06	1,03	1,08	1,07	1,15	1,18	1,10
T3	0,63	0,68	0,65	0,71	0,69	0,69	0,68
T4	0,88	0,91	0,90	0,90	0,93	0,95	0,91
T5	0,79	0,79	0,82	0,83	0,83	0,87	0,82
Promedio	0,86	0,87	0,88	0,90	0,91	0,94	0,89

Unidades Expresadas en dS.m⁻¹

La tendencia de los sustratos a aumentar su CE en el tiempo se le puede atribuir también a la acumulación de sales por efecto de los riegos con aguas salinas; el monitoreo mensual registró un ascenso continuo hasta el séptimo mes con valores por encima de 1 dS.m⁻¹ (Anexo 22). Gil (2004), reporta que valores

superiores a 0.75 de CE en aguas de riego para aguacate, genera acumulación de sales en zona radical y posteriormente quemazón en las hojas.

Esto se refleja principalmente en el T2 donde el lento movimiento del agua y la alta retención de esta, permite la dilución y concentración de sales; adicional a esto, se generan condiciones de humedad favorables para el crecimiento de *P. cinnamomi* Rands.

Cationes de cambio de los sustratos: La tabla 9 presenta la mayor Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) en el T2 con $47,8 \text{ Cmol.kg}^{-1}$, siendo el tratamiento con un 100% de compost; en el segundo lugar esta el T3 con $41,5 \text{ Cmol.kg}^{-1}$ y el menor valor lo obtiene el T4 con $23,8 \text{ Cmol.kg}^{-1}$; todos los valores de los tratamientos estuvieron por encima de la norma (NTC 5167) exigida para enmiendas sólidas. Según Aguilar en 2002, los sustratos con alta capacidad de intercambio podrán disponer de mayores cantidades de N, P, K, elementos necesarios para el óptimo desarrollo de las plántulas, además que existe menor riesgo de exceso de estos elementos, ya que el complejo de cambio puede absorber la abundancia de estos. Con sustratos de baja capacidad de intercambio, las fertilizaciones deben ser tempranas y frecuentes (Pastor, 2000).

Disponibilidad de nutrientes: En la tabla 11 se destaca el mayor contenido de materia orgánica (MO) para el T2, el cual se caracterizó por tener el 100% compost de cachaza; los demás tratamientos T1 y T4 presentaron valores por debajo de 10%, sin embargo T3 y T5 fueron superiores en comparación con lo reportado por Messerer (1998) en sustratos para aguacate en Chile, cuyos máximos valores solo alcanzaron 9.19%; las diferencias se le pueden atribuir a la calidad del compost y al origen de los otros materiales de la mezcla.

Tabla 11 Caracterización química de los sustratos

Trat.	(1:1)	%		ppm		Cmol.kg-1				
	pH	MO	N - total	P ₂ O ₅	S	K	Ca	Mg	Na	CIC
T1	6,93	7,29	0,36	1,87	17,51	0,65	3,22	1,99	0,91	31,55
T2	7,96	30,61	1,53	3,23	9,44	0,81	14,66	9,76	1,58	47,88
T3	6,12	9,74	0,49	1,94	10,49	0,77	4,21	2,51	0,33	41,56
T4	7,45	7,01	0,35	1,88	10,23	0,74	3,97	1,67	0,15	23,87
T5	6,34	9,89	0,49	2,01	11,91	0,83	3,74	1,44	0,26	39,67

Ansorena (1994) indica que un rango óptimo de materia orgánica en sustratos con porcentajes superiores al 8%, favorece el desarrollo fisiológico de plántulas de aguacate.

Estudios en California (California Environmental Protection Agency, 1999) han mostrado resultados positivos a corto plazo con el uso compost de origen vegetal con mas de 30% de MO, los cuales mejoraron el crecimiento de plantulas de aguacate variedad Hass, reduciendo la infección de *P. cinnamomi*, sin embargo su impacto ha sido negativo cuando no se controla de la humedad y drenaje del suelo, Hermoso, (2011).

La relación C/N en todos los tratamientos tuvo un rango entre 10 y 12, lo que indica que se encuentra en un nivel bajo según Soto y Muñoz (2002), quienes señalan que una relación C:N en sustratos menor de 25 se clasifica como muy baja, lo cual hace que se pierda N por falta de estructuras de carbono que permitan su retención.

De igual manera con la disponibilidad nutricional, el T2 de obtuvo los mas altas cantidades de fósforo (P₂O₅: 3,23 ppm), Calcio (CaO:14,66 Cmol.kg⁻¹), magnesio (MgO:9,76 Cmol.kg⁻¹) y sodio (Na:1,58 Cmol.kg⁻¹); para el potasio, el mayor valor se encontro en el T5 (K₂O:0.83 Cmol.kg⁻¹) y en cuanto al azufre el T1 presentó la mayor disponibilidad (S: 17.51 ppm).

Según Cavins et al (2000), los problemas de poca disponibilidad de nutrientes como el N y P, la baja saturación de bases de K, Ca y Mg, son una de las principales causas para una baja calidad del desarrollo fisiológico y pérdida de plántulas en invernaderos y viveros, sin embargo, solo los contenidos de N total

se consideran bajos en todos los tratamientos (tabla 9) ya que la norma NTC 5127 requiere como mínimo 2%.

Para el caso del azufre (S), los tratamientos arrojaron valores menores a 12 ppm, siendo el nivel crítico en el suelo para diferentes cultivos reportado por Blair, 1979 a excepción del T1 con 17.51 ppm; se podrían clasificar preliminarmente como cantidades poco disponibles para las plántulas; No obstante, un sustrato con un pH cercano a la neutralidad, favorece la buena disponibilidad de elementos como el S (Palencia *et al.*, 2007), como se puede apreciar en el pH del T3.

La baja disponibilidad de este elemento en zona de raíces puede deberse a la poca mineralización de formas orgánicas presentes en el sustrato en condiciones de mal drenaje como por ejemplo el T2, ahí se puede esperar compuestos poco solubles y formas reducidas del S según Colacelli, en 2001; por el contrario en sustratos con buen drenaje como el T3 que obtuvo los mayores valores de conductividad hidráulica, las formas reducidas son fácilmente oxidadas a $SO_4^{=}$ siendo esta forma inorgánica predominante para la absorción via sistema radical (Colacelli, 2001).

En este mismo sentido, este mismo autor afirma que las altas condiciones de mineralización en el trópico, el contenido de S total no es un parámetro adecuado para indicar disponibilidad para las plántulas a corto plazo, sin embargo, probablemente puede ser un potencial de abastecimiento de S al sustrato.

Por otro lado, el anexo 23 muestra como el T2 presenta la mayor saturación de las bases, sin embargo el calcio y magnesio fueron las bases de mayor aporte (tabla 12); en consecuencia, de acuerdo con Garcia (2003), el alto contenido de calcio podría generar limitantes en la solubilidad de iones metálicos y su disponibilidad para las plántulas debido a la efecto generado por la formación excesiva de carbonatos.

Tabla 12 Saturación de bases en sustratos

Tratamientos	% Saturación
--------------	--------------

	K	Ca	Mg	Na	Bases totales
T1	2,06	10,21	6,31	2,88	21,46
T2	1,69	30,62	20,38	3,30	55,99
T3	1,85	10,13	6,04	0,79	18,82
T4	3,10	16,63	7,00	0,63	27,36
T5	2,09	9,43	3,63	0,66	15,81

En la tabla 10 también se puede considerar deseable la saturación de Na intercambiable para el desarrollo de las plántulas de aguacate, dado su gran susceptibilidad a este elemento de acuerdo con Garcia (2003), en el cual establece niveles para este cultivo con una tolerancia relativa de saturación de sodio intercambiable menor a 15%.

Medir el pH del agua de drenaje, o de la solución del sustrato permite inferir que nutrientes se están absorbiendo y hacer el correctivo de más iones amonio o más iones nitrato dependiendo de la necesidad de equilibrar el pH, sin embargo el pH también se puede corregir usando ácidos o hidróxidos y es donde el monitoreo del pH y la conductividad eléctrica (CE) de medios de crecimiento (sustratos) nos da la posibilidad de corregir este tipo de inconvenientes antes de que se conviertan en problemas que pudieran perjudicar a los cultivos ya establecidos en campo.

Se destaca alta disponibilidad de nutrientes en el T2, pero este presentó las mayores limitantes en las propiedades físicas, lo que hace necesario ajustar combinaciones con los otros materiales de los tratamientos para encontrar un sustrato adecuado que evite condiciones propicias para el desarrollo de Oomycetos como *P. cinnamomi* Rands.

6.4 Relación con respuestas biológicas

Poblaciones de Bacterias en sustratos: En cuanto a bacterias de vida libre, fijadoras de nitrógeno, oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito en sustratos, estas presentaron los valores más altos en los tratamientos T3 y T5 (tabla 13); teniendo en cuenta las funciones metabólicas de estos microorganismos, prácticamente se destacan las bacterias oxidantes de nitrito en T3 y T5, donde el elemento en común para la composición final del sustrato fue la cascarilla de arroz y las macroporosidades fueron las más altas.

Mora (1999), reporta a la cascarilla de arroz como un material liviano e ideal para la mezcla con arenas finas para generar una baja capacidad de retención de humedad; la principal función de este en la mezcla es favorecer la oxigenación del sustrato, el cual favoreció las bacterias oxidantes de nitrito.

Este resultado es importante para la disponibilidad de nitrógeno en plántulas según McNeill y Unkovich, (2007), quienes afirman que en condiciones de buena aireación y sin fertilización nitrogenada, la oxidación autotrófica del NO_2^- hasta NO_3^- generalmente ocurre a una tasa más rápida que la oxidación del NH_4^+ a NO_2^- .

Para cada tratamiento evaluado, las poblaciones bacterias oxidantes de nitrito fueron superiores a las oxidantes de amonio; las condiciones físicas del T3 y T5 se puede comparar con suelos bien drenados, en los que se puede encontrar una proporción de 3:1, ya que las oxidantes de nitrito son muy dinámicas, sensibles y deben mantener altas poblaciones para poder mantener la máxima actividad de producción de nitrato disponible para las plantas (Milton, 2001).

Tabla 13 Tipos de bacterias presentes en sustratos de crecimiento de plantulas de aguacate.

Tratamiento	Unidades formadoras de colonias* (UFC.g-1 sustrato seco)			
	Bacteria Vida libre	Bacterias Fijadoras Nitrógeno	Bacterias oxidantes Nitrito	Bacterias oxidantes Amonio
T1	9,87E+06	1,49E+06	4,53E+03	8,91E+02
T2	2,01E+07	1,04E+06	1,28E+03	4,53E+02
T3	3,12E+07	1,51E+06	2,36E+04	1,25E+04
T4	3,66E+06	1,30E+06	5,44E+03	9,44E+02
T5	3,05E+07	9,50E+05	9,37E+03	2,65E+03

* Expresión numérica científica

En este contexto y como se observa en la figura 20, las propiedades físicas relacionadas con la disponibilidad de oxígeno (O₂) comienzan a tener relevancia con la abundancia de especies bacterianas, por ejemplo, la distribución de poros del sustrato cumple una función importante no solo para evitar condiciones favorables para *P. cinnamomi*, sino también favorecer el desarrollo de las bacterias oxidantes del nitrito, las cuales tuvieron un crecimiento exponencial a partir del 55% de la macroporosidad del sustrato.

Las menores poblaciones de las bacterias oxidantes de amonio y nitrito se registraron en el tratamiento T2, el cual obtuvo mayor microporosidad y retención de humedad; en ese mismo sentido, Gallego (2012) argumenta que las poblaciones de nitrificantes puede estar reducidas por la poca capacidad de infiltración del suelo, generando condiciones anaeróbicas que limitan e inhiben el proceso de nitrificación en un momento dado.

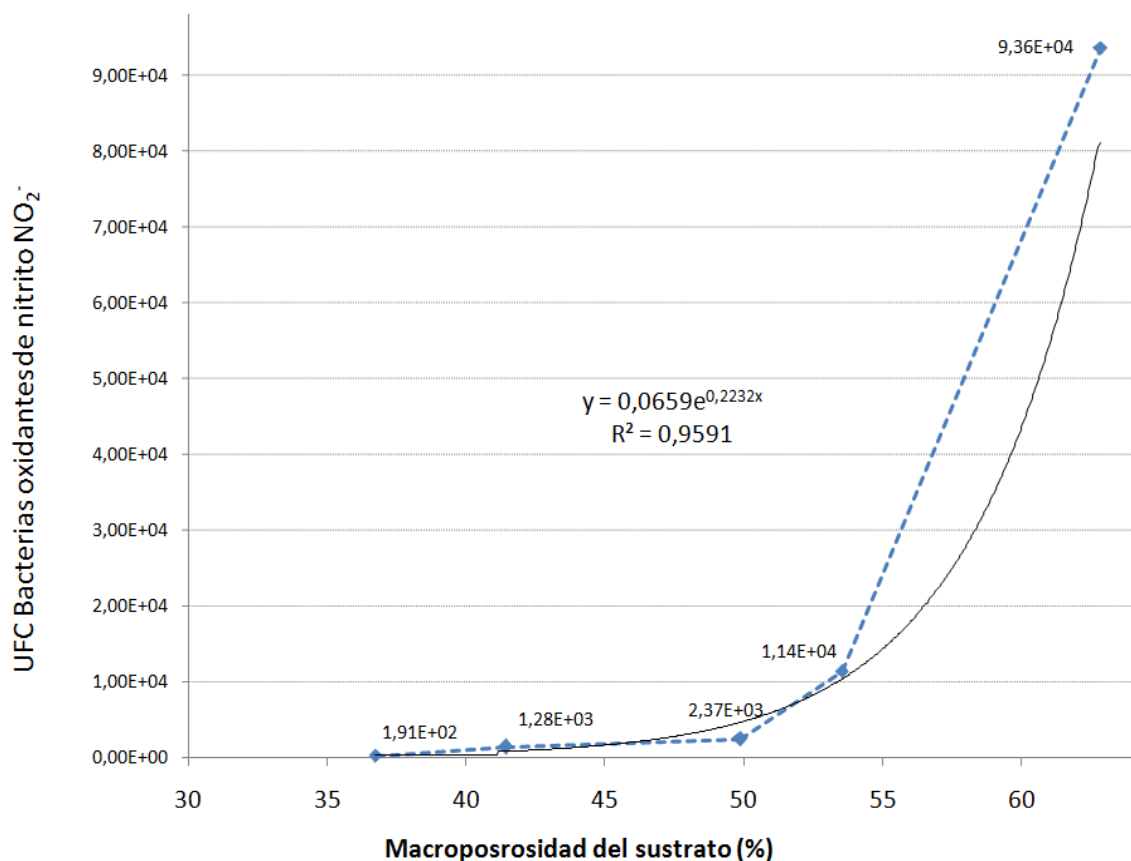


Figura 20 Relación entre el aumento del número de bacterias oxidantes de nitrito (NO₂) y la macroporosidad de sustratos

En otras palabras, se confirma el efecto positivo de las propiedades físicas del sustrato (macro porosidad y baja densidad aparente) sobre las bacterias oxidantes de nitrito, reportado por Sullivan en 2003.

Poblaciones de actinomicetos en sustratos: La tabla 14 muestra que el tratamiento con mayor población fue T4 seguido del T3; las condiciones físicas desfavorables en el T2 como la alta retención de humedad, puede influir en la presencia de este microorganismo, lo que coincide con lo reportado por Tate (2000), quien argumenta que bajo condiciones extremas adversas en el suelo, disminuyen las concentraciones de la población. Es común encontrarlos en suelos fértiles bien aireados con concentraciones de 10^6 UFC·gss⁻¹; en general el tamaño de la comunidad depende del tipo del suelo, particularmente de algunas de las características físicas, del contenido de materia orgánica y del pH del medio (Tate 2000).

Con relación a las mayores poblaciones actinomicetos y a los menores valores de mortalidad de plántulas en T4 y T3 respectivamente, existen reportes que conciernen la actividad antagónica de este grupo de microorganismos sobre el género *Phytophthora*, donde han mostrado ser efectivos según Zentmyer (1994 y 1980).

Tabla 14 Presencia de actinomicetos en sustratos de crecimiento de plántulas de aguacate.

Tratamiento	Unidades formadoras de colonias (UFC) de actinomicetos
T1	1,01,E+03
T2	0,00,E+00
T3	2,60,E+03
T4	4,20,E+03
T5	1,01,E+03

Actividad enzimática en sustratos: Otra variable que puede definir el concepto de calidad del sustrato, es el estudio de indicadores bioquímicos como la determinación de la actividad enzimática de celulasas; En la tabla 15, se muestra que el mejor tratamiento en las dos épocas de muestreo (antes y después del injerto de las plántulas) es el T3 con los mayores valores; coincidentalmente obtuvo el mas alto contenido de celulosa en el sustrato (9,71%), teniendo en cuenta que en su composición, tenía la mayor proporción de cascarilla de arroz (50%) frente a las otras mezclas de sustratos; contrario a esto, el T4 presentó los bajos valores de actividad enzimática de celulasas y el mas bajo contenido de celulosa en T4 (4.54%), ya que la composición de este sustrato fue en un 50% carbonilla y ausencia total de cascarilla de arroz (anexo 24).

Tabla 15 Actividad enzimática rizosférica de celulasas y el contenido de celulosa en sustratos para plántulas de aguacate

Tratamiento	Actividad enzimática rizosférica de celulasas* (μg de glucosa g^{-1} . sustrato seco h^{-1})		Celulosa del sustrato (%) (Metodología Van Soest)
	Antes del injerto (20 días de germinación)	Después del injerto (240 días de germinación)	
T1	0.0351 (b)	0.0388 (b)	6,71
T2	0.0260 (c)	0.0336 (b)	7,03
T3	0.0967 (a)	0.1173 (a)	9,71
T4	0.0062 (e)	0.0071 (c)	4,54
T5	0.0153 (c)	0.0312 (b)	6,73

(*): Letras diferentes significan promedios estadísticamente diferentes según la prueba de Duncan (0.05).

Lo anterior se explica considerando la composición y participación de materiales celulolíticos en cada uno de los tratamientos, la figura 21 ilustra el incremento de la actividad enzimática de celulasas a medida que aumenta el contenido de celulosa de los sustratos; según Montoya en 2008, esto ocurre debido a la gran cantidad de rupturas de puentes de hidrogeno para producir la disolución de la estructura de la celulosa. La hidratación y separación de las cadenas de celulosas fuertemente ligadas, es un requisito para la descomposición de las uniones glicosídicas por enzimas extracelulares.

Para los sustratos evaluados, el tipo de material celulolítico empleado, como en el T3 con un 50% de cascarilla de arroz, comienza a tener importancia la acción de microorganismos como *Trichoderma* como agentes biocontroladores también, los cuales excretan metabolitos dentro de ellos enzimas (celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas) que participan en la lisis de la pared celular de las hifas microorganismos fitopatógenos, facilitando la inserción de estructuras especializadas, que absorben nutrientes del interior del hospedante (Eveleigh *et al* 1986). Adams (1990), definió el micoparasitismo como la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del hospedante; El citoplasma sobrante quedaría rodeando por las hifas dominadoras, mostrando síntomas de desintegración, lo que disminuye la actividad patogénica del mismo.

Asimismo, es importante resaltar que la celulosa también es descompuesta por otros microorganismos como los actinomicetos (caso del *Streptomyces* spp), pero a una tasa baja (IGAC, 1995), siendo T3 el que obtuvo las mayores cantidades en UFC.

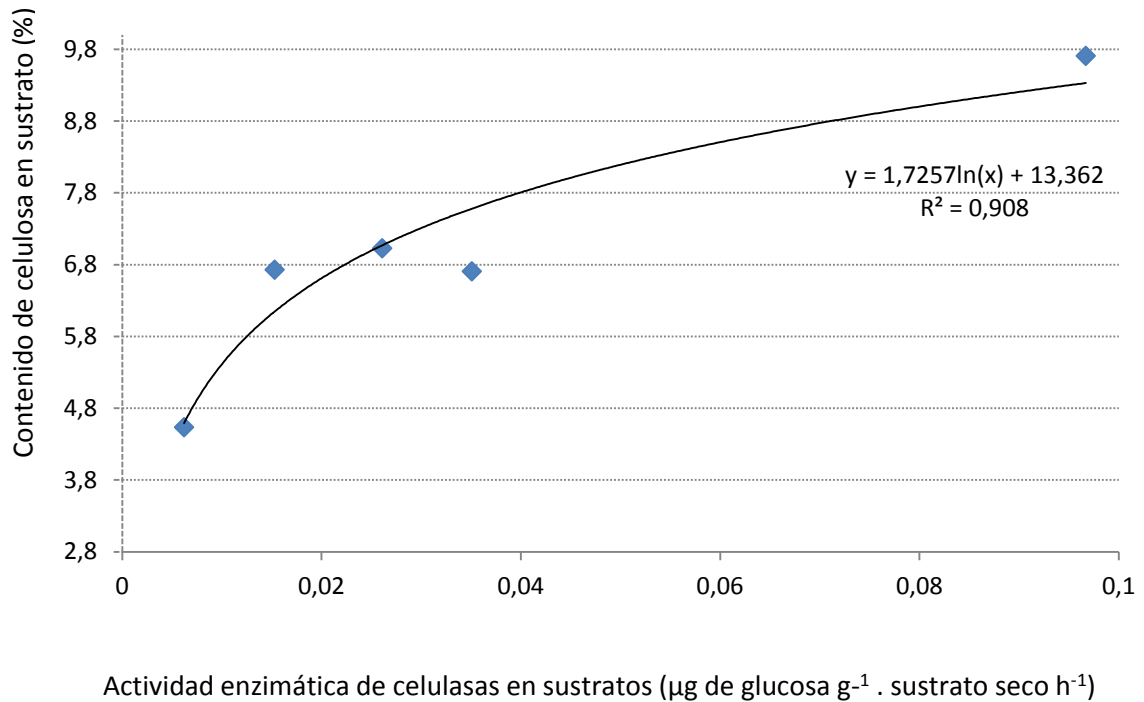


Figura 21 Incremento de la actividad enzimática de celulasas en función del contenido de celulosa en sustratos

Estos valores de actividad de celulasas son menores comparados con los efectos obtenidos por Albarran (2008), con promedios de $0,92 \mu\text{g de glucosa g}^{-1} \text{ sustrato seco h}^{-1}$ en partículas sin moler y $1,54 \mu\text{g de glucosa g}^{-1} \text{ sustrato seco h}^{-1}$ en partículas molidas, afirmando que la molienda de la muestra conduce a mayor sensibilidad y precisión; además, resalta que la disminución de la actividad de celulasas es debido al aumento del pH del suelo (cercano a 8,0) como lo representa la figura 22.

Este comportamiento puede explicar la baja actividad de esta enzima, dada la tendencia del incremento del pH, principalmente en T2 y T4, además que no contenían material celulolítico en la mezcla (cascarilla de arroz).

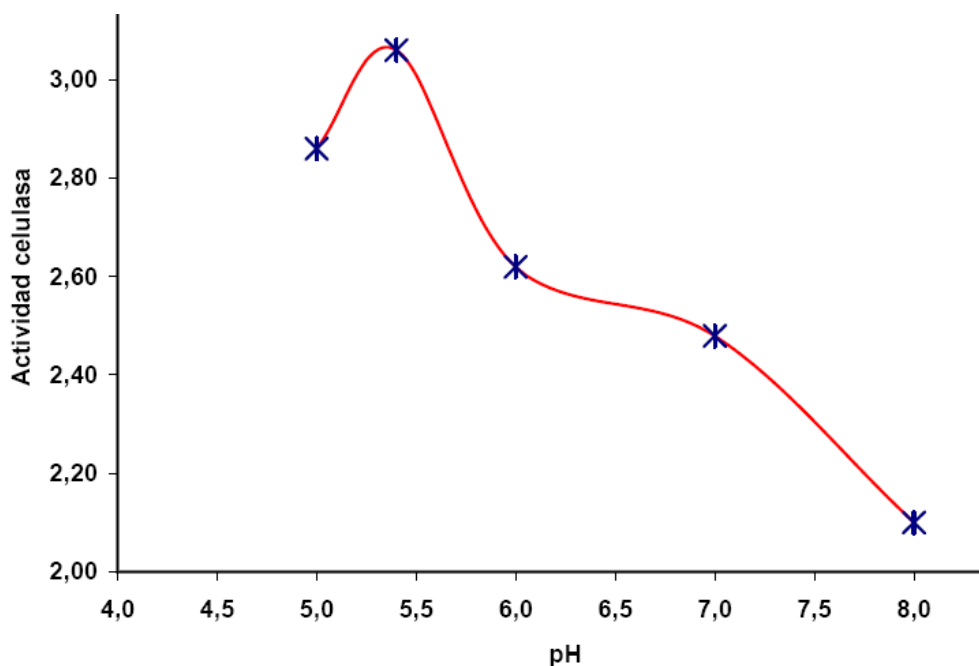


Figura 22 Valores determinados de Calulasas del suelo en función del pH (Tomado de Albarran, 2008)

Con estas relaciones, se considera que los altos valores de densidad aparente, la reducción de macroporos y menor el contenido de celulosa reportados anteriormente en T2, presentan condiciones desfavorables para la actividad enzimática de celulasas; esto coincide con Colberg y Beale (1991), quienes afirman que con el aumento de la densidad aparente del suelo y en consecuencia la baja aireación, se reduce el transporte de sustancias solubles y se inhibe la degradación de lignocelulosa, que tiene gran influencia en la degradabilidad de los residuos vegetales, por tanto, esto contribuye a condiciones físicas favorables para el desarrollo de *P. cinnamomi*.

Respuesta fisiológica de plántulas de aguacate: las variables de desarrollo vegetativo, principalmente en la longitud de las raíces se vieron afectadas por el sustrato; en la figura 23 se muestra como en la medida que disminuye la densidad aparente, se incrementa la longitud de raíces, resaltandose los optimos valores encontrados en T3 (50% cascarilla de arroz) con 48.88 cm y los menores valores en T2 (100% compost) con solo 18.56 cm. Según Donoso (1992), los valores bajos de densidad aparente son propios de suelos porosos, bien aireados, con buen drenaje y buena penetración de raíces, lo que permite un buen desarrollo de las raíces; Los valores altos de densidad aparente indican

suelos compactos y poco porosos, con aireación deficiente e infiltración lenta, lo cual puede provocar anegamiento, anoxia y que las raíces tengan dificultades para elongarse y penetrar hasta alcanzar el agua y los nutrientes necesarios. Se puede considerar entonces esta propiedad como una de las principales condiciones físicas que influyen en el desarrollo radical en sustratos, así, las condiciones del T2 impiden o retardan el crecimiento de las raíces plántulas de aguacate en la etapa de vivero.

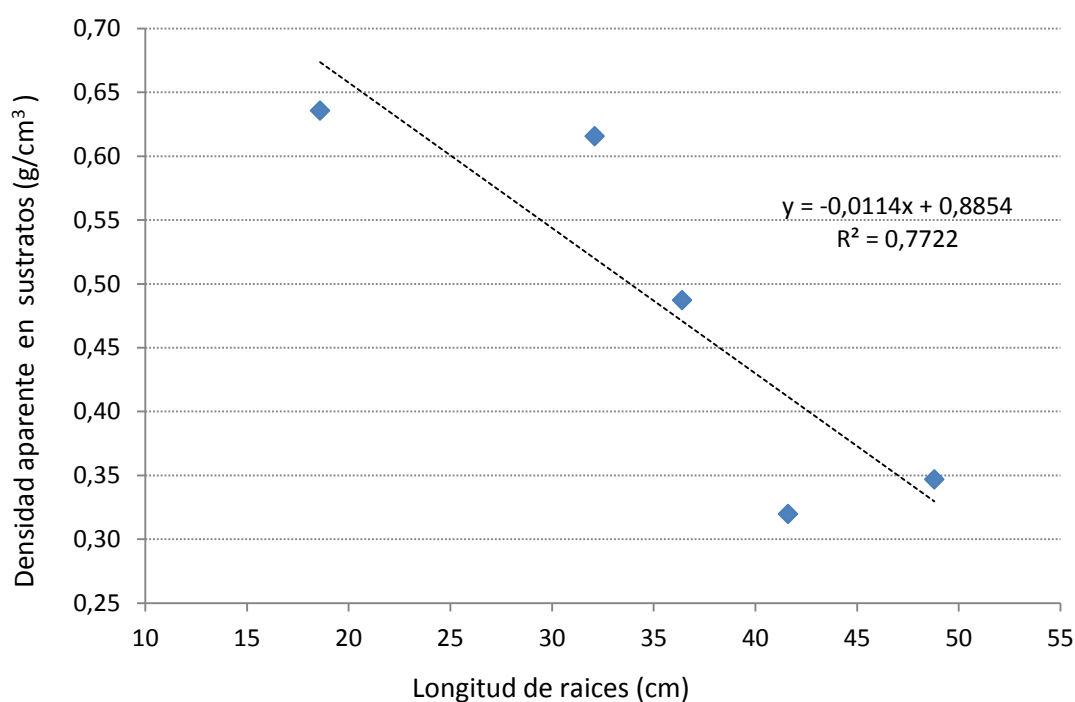


Figura 23 Relación entre la longitud de raíces de plantulas de aguacate y la densidad aparente de los sustratos

Otro factor que puede atribuírsele a un menor crecimiento de raíces del T2 es el exceso de humedad del sustrato, según Cossio *et al* (2008), reportan efectos no favorables para la producción de raíces jóvenes secundarias de aguacate (variedad Hass) cuando el suelo alcanzó un 65% de humedad gravimétrica.

Con relación a la materia seca (MS) y como se observa en la tabla 14, el T3 resultó tener un efecto favorable en tejido foliar antes y después de la injertación con 23.47% y 28.89% respectivamente; de igual manera este tratamiento obtuvo los mayores valores de MS en raíces, a diferencia del T2 que presentó los menores valores en hojas y raíces, antes y después del injerto. La materia seca

según Salazar (2002), nos permite relacionar de forma preliminar la cantidad de carbono en forma de carbohidratos, proteínas, aceites y de otros nutrimentos empleados durante el desarrollo y crecimiento estructuras vegetativas

Según Slowik *et al.* (1979), en portainjertos de aguacate (variedad Duke) con parametros de optima oxigenación y buen drenaje en suelos, los niveles foliares adecuados de MS estan por encima de 22% y para las raices superior a 31%; comparando los resultados obtenidos, el T2 fue el unico tratamiento que obtuvo menos del 20% de MS en hojas en los 2 muestreos; para el caso de las raices, todos los tratamientos estan por debajo del nivel de referencia citado (tabla 16).

Tabla 16 Porcentajes de materia seca a los 20* y 240** dias en plantulas de aguacate, variedad Hass.

Tratamientos	Hojas (*)	Hojas (**)	Raíz (*)	Raíz (**)
T1	21,77	22,04	17,99	19,63
T2	14,81	15,87	13,47	14,21
T3	23,47	28,89	19,76	21,89
T4	22,91	23,65	17,65	18,93
T5	22,23	24,98	18,68	19,65

(*) Momento antes de injertar

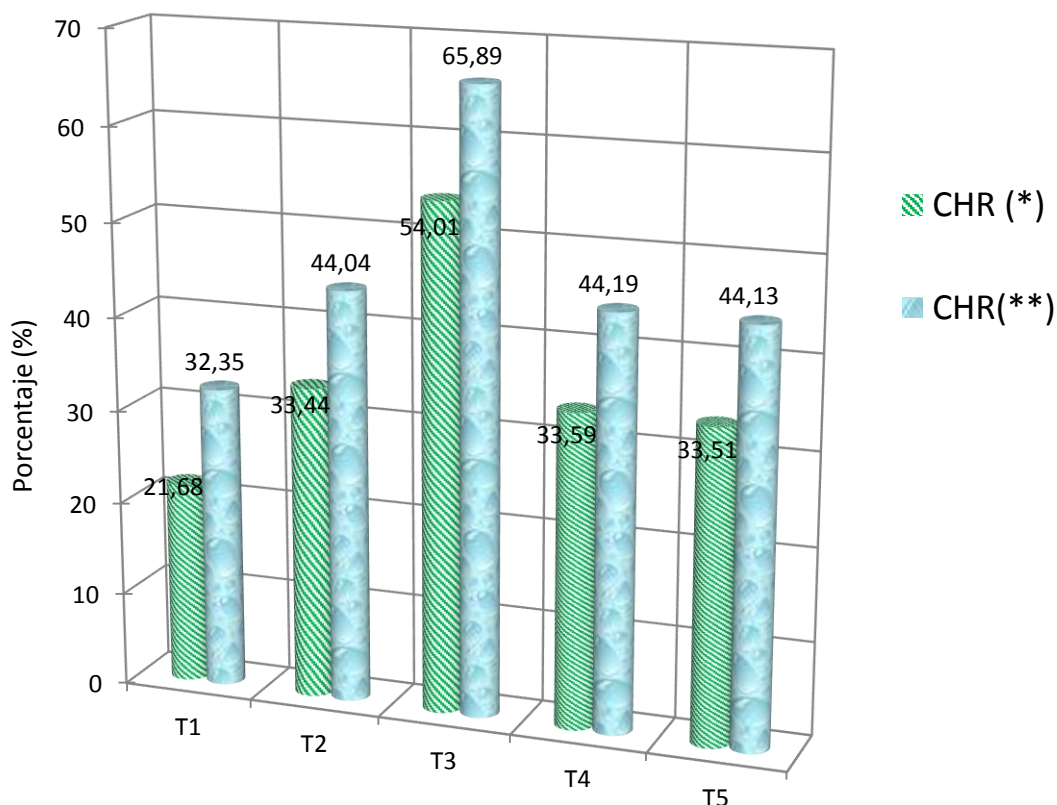
(**) Momento para trasplante en suelo

%MS: porcentaje de materia seca

En la cuantificación del contenido hidrico relativo (CHR) de los tejidos foliares, la tendencia fue similar al registrar el mas alto contenido en T3 y el menor valor en T1 para los dos muestreos (Figura 24).

El CHR es muy importante, ya que puede considerarse como un indicador de la deshidratación de la planta, siendo un parámetro que integra componentes aéreos y subterráneos que le confieren a la planta la capacidad de tolerar el déficit hídrico Villalobos *et al.* (1990); para el caso de los sustratos con portainjertos de aguacate, es trascendental evitar no solo el exceso de agua o altas retenciones de humedad como por ejemplo en T2, sino también, evitar estrés hídrico por exceso de drenaje como se evidenció en las determinaciones físicas del T3.

Por tanto, se reconoce la posibilidad de que algunas propiedades físicas (distribución de poros y la densidad aparente), químicas (disponibilidad de macronutrientes) y biológicas (microorganismos benéficos de la rizósfera) del T3, puedan mantener niveles de agua foliar superior a los demás tratamientos.



(*) Momento antes de injertar
 (**) Momento para trasplante en suelo

Figura 24 Contenido hídrico relativo (CHR) en hojas

En cuanto a la acumulación de nutrientes en tejido foliar, la tabla 17 muestra como el T3 obtuvo las mejores respuestas en los contenidos de N, P, K y Ca; el T2 fue el que obtuvo los menores contenidos de estos nutrientes además del Mg, sin embargo el T1 obtuvo el menor contenido de S.

Tabla 17 Contenido de macronutrientes en hojas de plántulas de aguacate después del injerto (180 días).

Muestra	N	P	K	Ca	Mg	S
T1	1,59	0,35	1,91	0,37	0,29	0,14
T2	1,02	0,28	1,20	0,22	0,18	0,16
T3	2,94	0,39	1,99	0,51	0,27	0,26
T4	1,61	0,35	1,79	0,45	0,28	0,15
T5	1,77	0,38	1,86	0,41	0,27	0,16

Unidades Expresadas en Porcentaje (%)

De los valores reportados, solo N se encuentra en el nivel óptimo según Lovatt (1988), quien definió valores mínimos de N 1.85% para huertos sanos de aguacate variedad Hass.

Esto se relaciona con el estado fenológico de las plántulas de aguacate, ya que el contenido total de N es mayor en los tejidos jóvenes foliares y en aquellos que crecen activamente como los brotes de las yemas. Cuando las concentraciones de nitratos (NO_3^-) en estos tejidos son altos, también se espera esta tendencia en las raíces de aguacate, Lovatt, (1998); por tanto, se tiene la expectativa que todos los tratamientos evaluados favorezcan la removilización de este nutriente dentro de la planta de acuerdo con Salazar-García (2002), en la cual describe como el N tomado, beneficia la actividad de las raíces de aguacate para la absorción de otros nutrientes y finalmente el suministro de carbohidratos.

Sin embargo, el T3 fue el único que presentó los resultados foliares de N, P, K y Ca por encima de los valores estándar utilizados por Salazar y Lascano en 1999, dicho reporte fue desarrollado para calcular los Índices de balance nutricional en aguacate "Hass" (N: 2.35%, P: 0.14% y K: 1.37%).

Las limitaciones físicas de los sustratos evaluadas anteriormente como la alta retención de humedad y el alto contenido de microporos, tendría relación con la baja concentración de nutrientes foliares en T2, en concordancia con lo obtenido por Slowik (1979), quien estableció los parámetros baja oxigenación y mal drenaje en zona de raíces, con efectos negativos para la acumulación de N, P, K, Ca, Mg y B tanto en hojas como en raíces de plantas jóvenes de aguacate (Variedades Hass, Duke y Topa).

Para el caso del S, y como se ilustra en la figura 25, a pesar de que todos los tratamientos no presentaron deficiencia, solo el T3 estuvo arriba del nivel mínimo adecuado que es 0.2%; esto podría limitar algunas funciones de las plántulas

como el incremento a la tolerancia de estrés abiótico y control de patógenos del suelo, Benavidez, (1998).

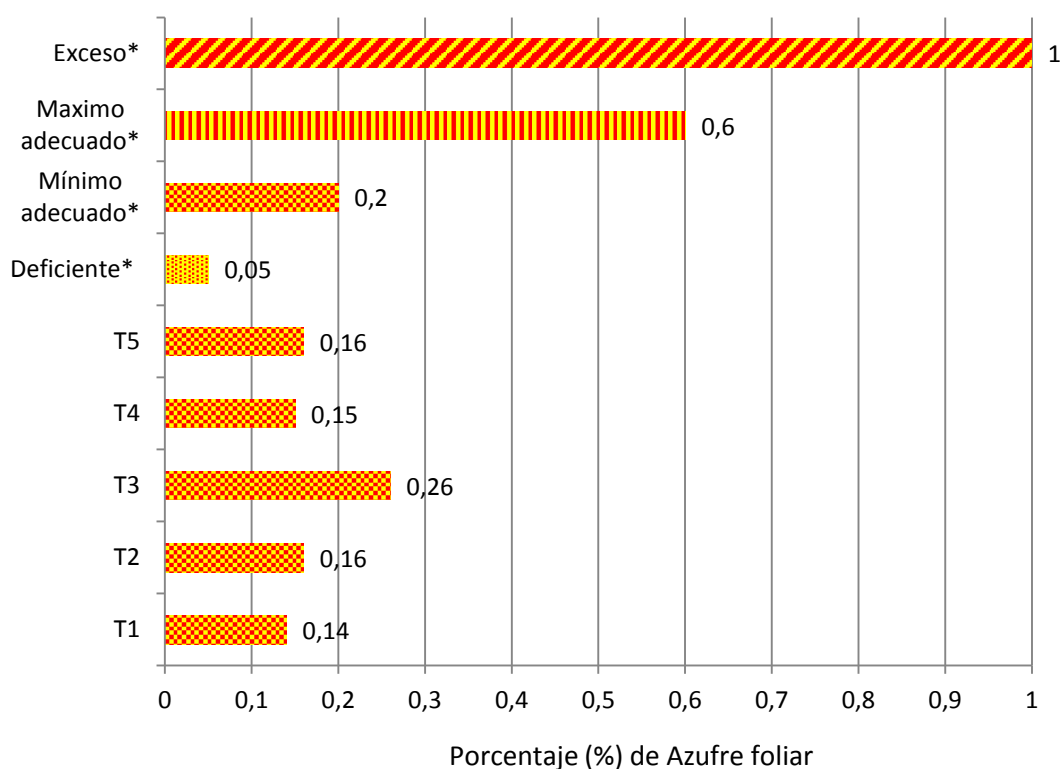


Figura 25 Comparación del contenido de azufre foliar de plántulas de aguacate con los niveles de referencia (*)Lahav, 1980 y Embleton 1984.

Al final del ciclo de desarrollo de las plántulas, se determinó la mortalidad de cada tratamiento antes del injerto (20 días), donde T2 mostró el mayor porcentaje con más del 13%, mientras que los demás tratamientos no superaron el 6% (anexo 25).

6.5 Pruebas de aislamiento e inoculación de *P. cinnamomi* Rands

Los resultados de las pruebas antagónicas *in vitro*, mostraron que existen diferencias significativas con respecto al desarrollo de los microorganismos, donde T1 superó la tasa de crecimiento diario con respecto a T2; en la tabla 18, se explica el avance del crecimiento máximo de *Trichoderma* hasta el séptimo día, lo cual fue superior a *Phytophthora cinnamomi*.

Tabla 18 Crecimiento de microorganismos en pruebas de biocontrol in vitro.

Tratamientos	Milímetros de avance del crecimiento				
	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
T1 (<i>Trichoderma</i>)	33,01(a)	41,77(a)	55,27(a)	57,51(a)	60,27(a)
T2 (<i>Phytophthora</i>)	10,77(b)	14,88(b)	16,22(b)	17,35(b)	19,02(b)
R - cuadrado	0,87	0,87	0,89	0,87	0,89
Coef. Variación	20,29	20,07	21,11	22,62	20,85

Este resultado son similares a reportados por Papavizas *et al* (1982), quienes afirman que las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores. En la figura 26 se muestra el crecimiento y control obtenido de *T. harzianum* sobre *P. cinnamomi*, generando una zona de antibiosis⁷ alrededor del patógeno.

En particular, *T. harzianum* Rifai, es la especie con mas alto espectro de control bajo diferentes condiciones ambientales; entre los enzimas líticas que producen se reportan las quitinasas, proteasas y celulasas que están relacionadas con el fenómeno de atibiosis y micoparasitismo al degradar la pared celular del hospedero, Bruce *et al*, (1995).

Ezziyyani *et al* (2004), resume los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan fitopatógenos fundamentalmente de tres tipos: Competición directa por el espacio o por los nutrientes (Elad & Baker 1985, Chet & Ibar 1994, Belanger *et al.* 1995), producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Chet *et al.* 1997, Sid Ahmed *et al.* 2003) y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia *et al.* 1999, Ezziyyani *et al.* 2003).

⁷ La antibiosis es el fenómeno mediante el cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas líticas (Baker y Griffin, 1995) los cuales disuelven polímeros estructurales como quitina y β -1-3 glucanos de la pared celular en la mayoría de hongos fitopatógenos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación. Entre mayor sea la cantidad de productos metabólicos, el poder de antagónico se incrementa (Goldman *et al*, 1994).

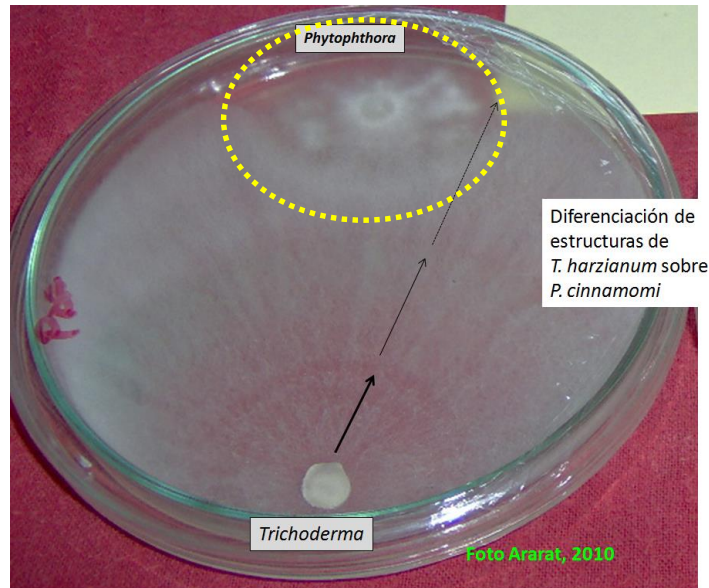


Figura 26 Diferenciación visual de estructuras de *T. harzianum* sobre *P. cinnamomi*
(Línea punteada refiere la zona de antibiosis)

La dinámica de crecimiento de estos 2 microorganismos evaluados se puede apreciar en la figura 27, donde se logro establecer una tendencia de mayor crecimiento logarítmico de *T. harzianum*, que alcanzo la mayor distancia que el patógeno en los 7 días de observación.

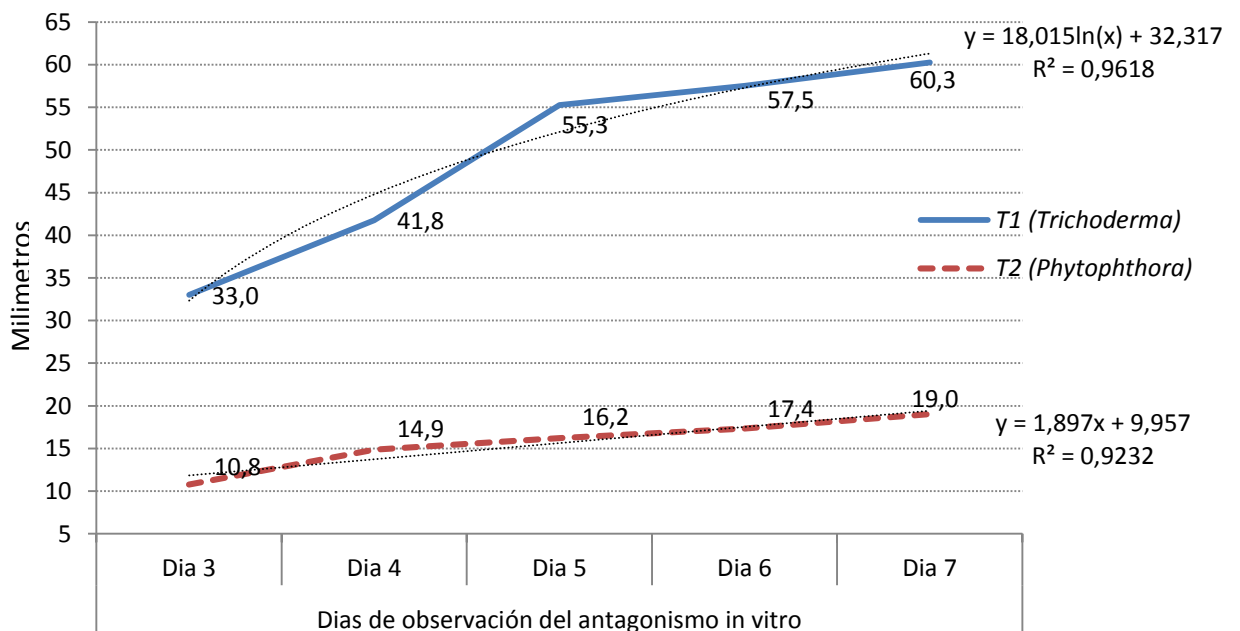


Figura 27 Avance del crecimiento de microorganismos en pruebas de biocontrol *in vitro*

Esta apreciación permitió definir el uso de *Trichoderma harzianum* como control preventivo en los sustratos para la fase dos de la investigación y también se pudo identificar estructuras de *P. cinnamomi*, como esporangios, oosporas y clamidiosporas (figura 28).

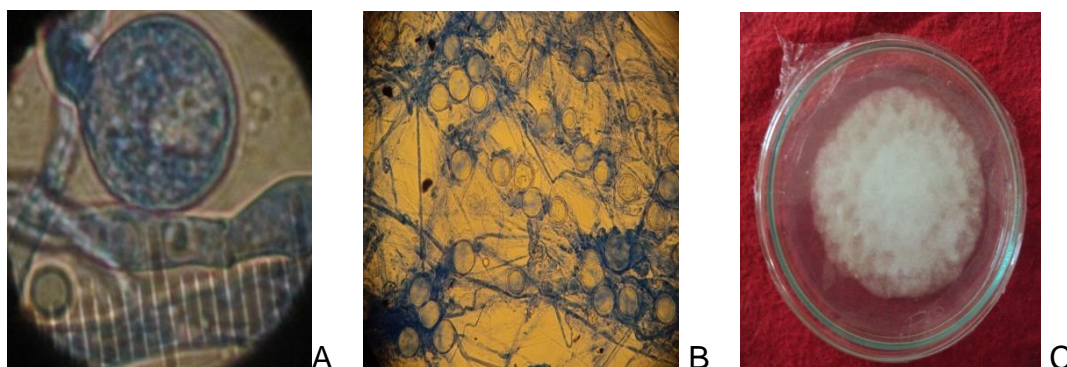


Figura 28 Estructuras de *Phytophthora cinnamomi* Rands (A= Esporangio; B= Claidiosporas y Oosporas; C= Micelio cepa CIAT CAA-003.

La prueba de inoculación *in vivo* (invernadero), mostró que sintomatología de las plántulas inoculadas a través del método mecánico (T1) obtuvo un nivel de daño de 3 (tabla 19) que correspondiente a follaje amarillo y con 20% de hojas secas; para el T2 y T3 la escala de daño se puede definirse entre 2 y 3 (figura 29). A través de esta metodología propuesta por Zentmyer (1984), se define el método del T2 de inoculación para la fase dos de la investigación, para evitar que las heridas de T1 que puedan ocasionar otras infecciones.

Tabla 19 Nivel de daño de *P. cinnamomi* en plántulas de aguacate con diferentes métodos de inoculación.

TRATAMIENTO	Método de inoculación	Nivel de daño
T1	Herida por daño mecánico	3
T2	Aplicación sólida (sin herida)	2,5
T3	Aplicación líquida (sin herida)	2,25

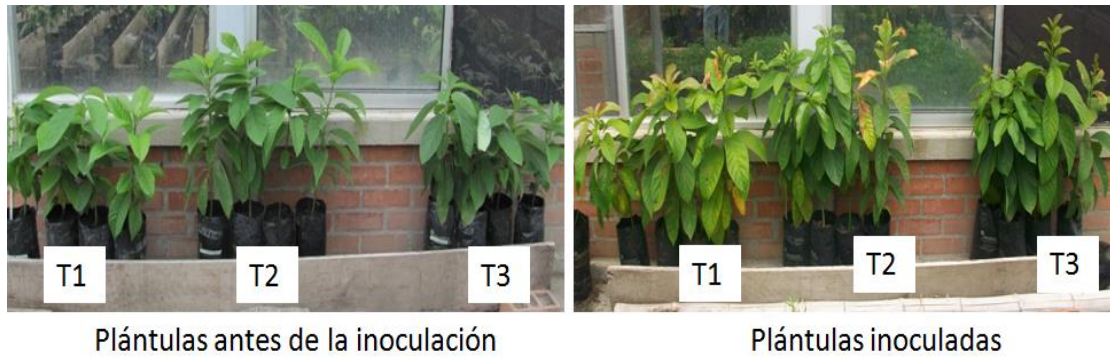


Figura 29 Diferentes métodos de inoculación de *P. cinnamomi* en plántulas de aguacate Hass (foto Ararat, 2010)

6.6 Conclusiones fase uno

Los sustratos mostraron ser diferentes en densidad aparente, conductividad hidráulica, retención de humedad y distribución de poros de las diferentes mezclas de sustratos.

Las respuestas fisiológicas de las plántulas como: materia seca, longitud de raíces, contenido hídrico relativo y la actividad de bacterias fijadoras de nitrógeno oxidantes de nitrito fueron favorecidos por la proporción equilibrada del compost de cachaza y cascarilla de arroz en la mezcla del sustrato **T3** con mayor macro porosidad.

La máxima retención de humedad y una alta cantidad de micro poros se registró en T2 (que contenía un 100% de compost), presentando el mayor porcentaje de mortalidad, esto probablemente puede tener una alta relación con la pudrición en las raíces secundarias de las plántulas (figura 30).

Raíz de plántulas de aguacate con pudrición (a) y completamente sana (b)



Foto Ararat, 2010

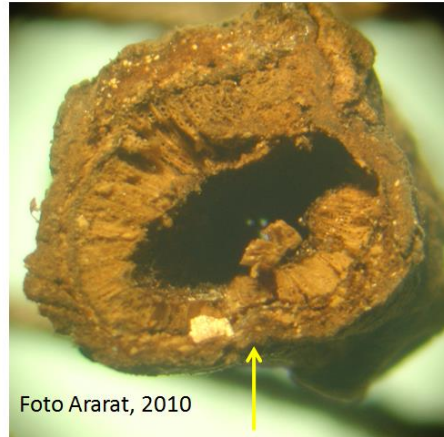


Foto Ararat, 2010

Corte transversal de una raíz secundaria de plántulas de aguacate con pudrición

Figura 30 Identificación de raíces secundarias de plántulas de aguacate con pudriciones obtenidas de sustratos con alta retención de humedad (Foto izquierda a: raíz con pudrición; b: raíz sana)

Estas condiciones de alta humedad (>30%) en zona rizosférica, favorecen la supervivencia de especies de oomicetos del genero *Phytophthora* y *Phytium* en forma de micelios, esporangios, quistes, clamidiosporas y oosporas (Coffey, 1992). Según Weste (1994), el micelio es un propágulo muy vulnerable de fácil control por las bacterias, por ello el periodo de supervivencia varía entre 1 – 60 días, mientras que para esporangios es de 3 – 45 días; con relación a las clamidiosporas y oosporas, estas pueden permanecer viables hasta 360 días ya que son estructuras de latencia con gruesa pared y pueden tolerar bajos contenidos de humedad.

El ambiente de los organismos se ve afectado por el tipo de sustrato; microorganismos como las bacterias oxidantes de nitrito pueden adaptarse y aumentar exponencialmente sus poblaciones debido a la macroporosidad del sustrato.

De acuerdo a lo anterior, es indispensable la presencia de otros organismos benéficos controladores y un ambiente adecuado de aireación y movimiento del agua en el sustrato para evitar alta mortalidad de las plántulas.

El propósito principal de manejar el sustrato como un sistema dinámico es que garantice una fuente de nutrientes y una adecuada retención de agua y movimiento de gases; Se reconoce las interacciones de las propiedades físicas de los sustratos como una técnica que contribuye al manejo de la pudrición de raíces, una de las principales problemáticas de aguacate.

La evaluación de diferentes mezclas busca obtener eficiencia en el desarrollo de raíces y nutrición de la plántula, rentabilidad, disponer de materiales en el área y conseguir un óptimo manejo y almacenamiento; sin embargo, la calidad de estos sustratos puede variar en el tiempo, dando importancia a la determinación y correlación de parámetros de calidad para su selección.

7. Resultados y discusión fase 2.

Para la segunda fase de la investigación se definió el T3 como el sustrato óptimo en el cual se establecería el plan de manejo preventivo y las variables de respuesta frente a una inoculación con *P. cinnamomi*.

7.1 Actividad enzimática rizosférica

- **Actividad de celulasas:** el análisis de varianza (Anexo 26) muestra que existe diferencias altamente significativas por efecto de los tratamientos en los valores de Celulasas, en las tres épocas de muestreo; En el primer muestreo, los promedios más altos fueron en T16 y T17 con 0.0497 y 0.0416 μg de glucosa g^{-1} sustrato seco h^{-1} respectivamente (Tabla 20); estos tratamientos tuvieron el control preventivo de *Trichoderma* e inoculados con *P. cinnamomi*); después de estos valores, se encuentra el T6 (con *Trichoderma* pero sin inoculó del patógeno) con 0.0403(b) μg de glucosa g^{-1} sustrato seco h^{-1} (anexo 27).

En el segundo muestreo, se incrementa la actividad enzimática pero cambia la tendencia de estos tratamientos, siendo el T7 el de mayor valor con 0.505 seguido del T16 con 0.0503 y T7 con 0.0419 μg glucosa g^{-1} .sustrato seco h^{-1} .

En el último muestreo, se observó la misma tendencia de celulasas que los anteriores pero con un aumento altamente significativo de esta enzima en el T7 0,0663 μg de glucosa g^{-1} sustrato seco h^{-1} (tratamiento sin la presencia del *P. Cinnamomi*); en todos los muestreos, los testigos tuvieron los registros de

actividad de celulasas mas bajos, notandose diferencias significativas cuando estuvo presente el patógeno como en T18 con 0.0011 μg de glucosa g^{-1} sustrato seco h^{-1} .

Tabla 20 Prueba de comparación de promedios para la actividad enzimática rizosférica

Tratamientos	Promedios de actividad enzimática rizosférica				
	Celulasas época 1	Celulasas época 2	Celulasas época 3	Fosfatasa acida	Fosfatasa alcalina
T1	0,0011(k)	0,0013(j)	0,0019(m)	1,9210(j)	0,9930(f)
T2	0,0044(j)	0,0045(i)	0,0046(lk)	1,9133(j)	0,9740(g)
T3	0,0228(e)	0,0247(e)	0,0286(e)	2,8463(e)	1,7180(d)
T4	0,0167(g)	0,0194(f)	0,0200(g)	2,2117(ef)	1,1187(e)
T5	0,0114(h)	0,0192(f)	0,0208(gf)	1,9490(i)	0,8937(j)
T6	0,0091(i)	0,0093(h)	0,0096(j)	1,9173(j)	0,8297(lk)
T7	0,0403(b*)	0,0505(a*)	0,0663(a*)	3,9267(a*)	2,1130(a*)
T8	0,0293(d)	0,0293(d)	0,0293(e)	3,3540(b*)	1,9733(b*)
T9	0,0042(k)	0,0010(k)	0,0011(n)	1,1233(l)	0,7783(m)
T10	0,0042(j)	0,0048(i)	0,0055(k)	1,7927(k)	0,9353(h)
T11	0,0034(j)	0,0035(i)	0,0037(l)	1,6203(l)	0,9140(i)
T12	0,0160(g)	0,0164(g)	0,0169(h)	2,1023(g)	0,9713(g)
T13	0,0106(ih)	0,0116(h)	0,0121(i)	1,9913(h)	0,9567(g)
T14	0,0208(f)	0,0211(f)	0,0213(f)	1,9163(j)	0,8453(k)
T15	0,0327(c)	0,0345(c)	0,0354(d)	1,9107(j)	0,8270(l)
T16	0,0497(a*)	0,0503(a*)	0,0508(b*)	3,1290(c*)	1,8117(c*)
T17	0,0416(b*)	0,0419(b*)	0,0428(c)	3,0257(d)	1,1203(e)
T18	0,0009(k)	0,0009(k)	0,0011(n)	1,1203(l)	0,7767(m)

(*): Letras diferentes significan promedios estadísticamente diferentes según la prueba de Duncan (0.05)

En el muestreo 1, la alta actividad enzimática del T16 (con *P. cinnamomi* en el sustrato) se puede originar por una intensa degradación de la pared celular del patógeno como lo muestra Downer (2001), en el cual define la celulosa como un componente importante de la pared celular de oomicetes, por tanto es probable que las celulasas producidas en sustratos con *muclh* actúen sobre *Phytophthora*, haciendo un ambiente inadecuado para este patógeno ya que las enzimas producidas puedan desintegrar las membranas celulares del patógeno.

Sin embargo, este tratamiento no alcanzó lo registrado por T7 (sin *P. cinnamomi*) (figura 31), en el cual se logra determinar una alta correlación en función del

tiempo (R^2 de 0.98), que corresponde un crecimiento lineal mayor con respecto a las primeras 2 épocas de muestreo de los otros tratamientos.

Estos registros de celulasas resultaron menores que en la primera fase de la investigación, lo que podría indicar que a nivel de sustratos, se presentan cambios dinámicos y/o sensibles del metabolismo de los microorganismos involucrados en la descomposición de celulosa.

Se puede considerar entonces la posibilidad de que la inoculación de *Trichoderma harzianum*, aumentó su acción degradadora a través del tiempo solo en materiales del sustrato ricos en celulosa originada en este caso a partir de la cascarilla de arroz.

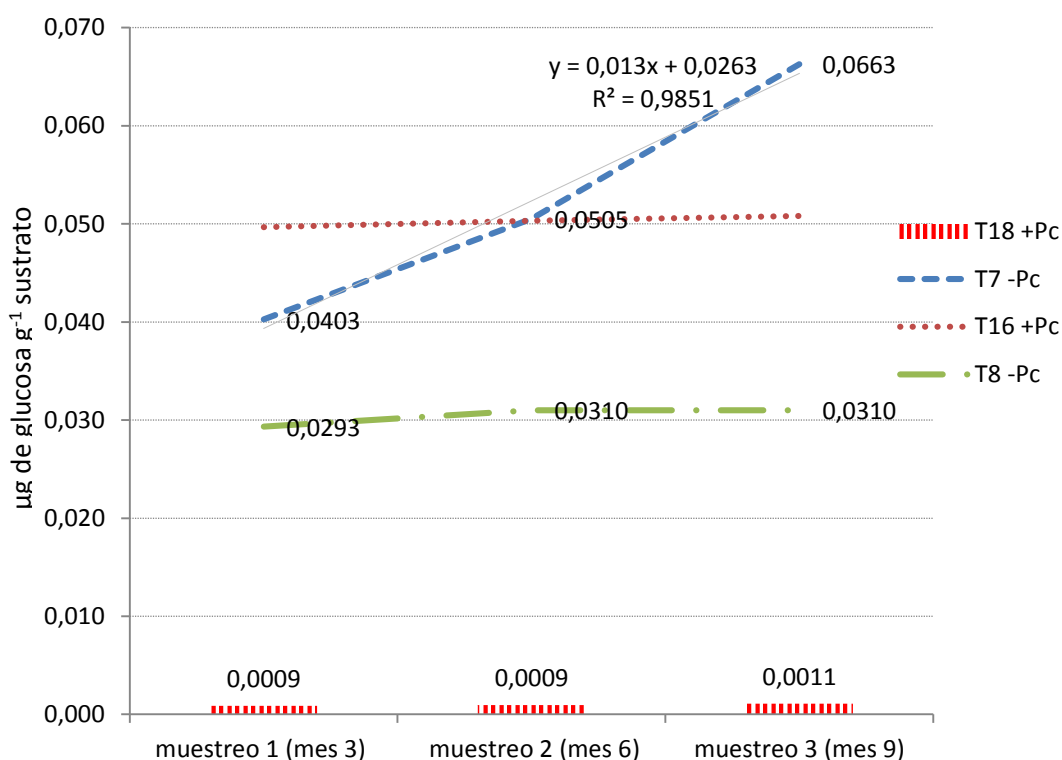


Figura 31 Comportamiento de celulasas en sustratos de aguacate (Valores en μg de glucosa g^{-1} sustrato seco h^{-1}).

- **Actividad de fosfatasa:** La tabla 16 describe que la mayor actividad enzimática de fosfatasa alcalinas, en su orden se presentó el T7, T8, 16 y T17 con valores de 3,9267, 3,3540, 3,1290 y 3,025 $\mu\text{-moles}$ de paranitrofenol PNF. g.h^{-1} respectivamente; en el caso de las fosfatasa ácidas, la mayor actividad se

presenta en T7 mientras que T9 y T18 (testigos), mostraron los valores mas bajos.

En la figura 32 se observa el comportamiento de las fosfatasa, siendo evidente que las acidas presentan mayor actividad que las alcalinas; esto se podría explicar por el efecto de aplicación de los productos acidificantes que permitieron un descenso temporal del pH del sustrato como es el caso de los tratamientos con vinazas o sulfato de amonio (anexo 29); según Lehninger (1982), las concentraciones de H⁺ pueden afectar la ionización de grupos de enzimas o causar inactivación irreversible de enzimas alcalinas.

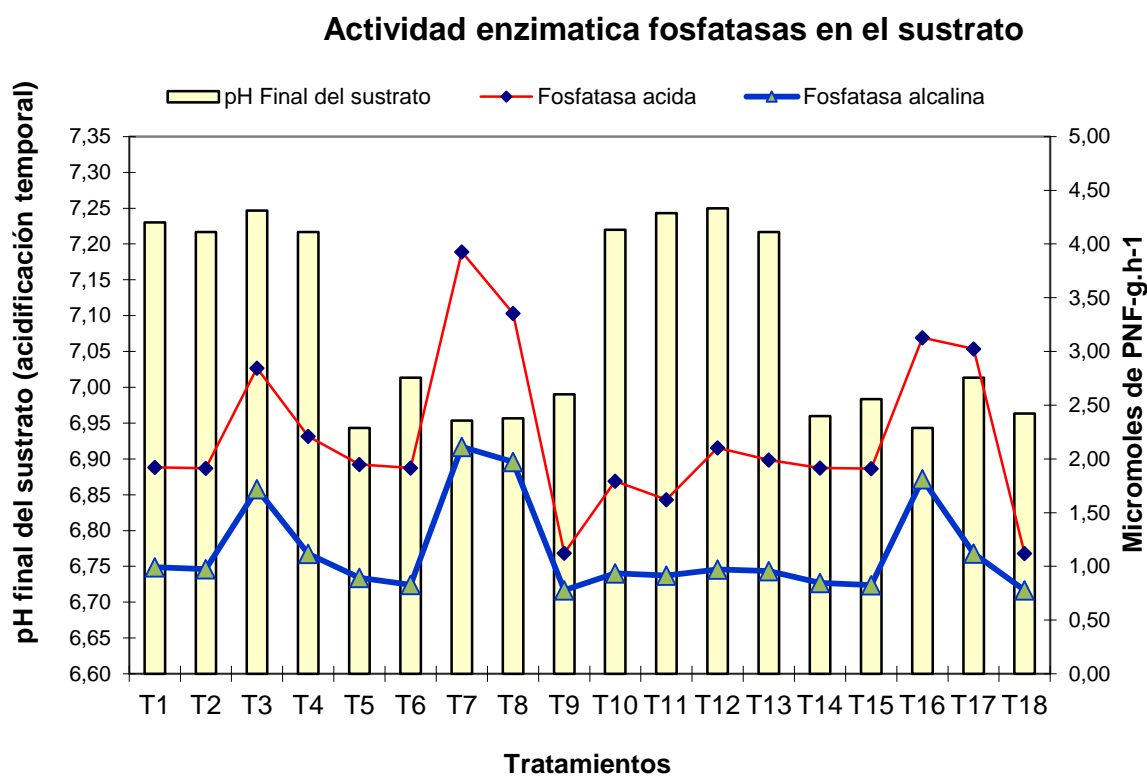


Figura 32 Comportamiento de la actividad de fosfatasa en sustratos de enraizamiento de plántulas de aguacate *Persea americana* Mill

Se puede considerar que la actividad de fosfatasa ácida para todos los sustratos evaluados es muy baja en comparación a lo registrado por Sánchez (2003), Yoshioka (2005), Bolaños (2006), Mijangos *et al.* (2006), quienes reportaron valores superiores a 20 µmoles de P-nitrofenol en suelos de vocación agrícola.

Sin embargo, los valores de fosfatasas acidas se consideran altos si se comparan con Narvaez (2008), con promedios de $1.68 \mu\text{-moles de paranitrofenol PNF.g.h}^{-1}$ en suelo un rizosférico de uso agrícola y con adiciones de vinaza, no obstante, observó que en general prevalecen las fosfatasas alcalinas con pH de suelos de 7.2 cercanos a la neutralidad.

La baja actividad de fosfatasas de un suelo puede ser atribuido a altos contenidos de P edáfico que pueden inhibir los mecanismos de acción de la enzima al existir una mayor disponibilidad de nutrientes en forma lábil en el suelo (Zamora, 2003), lo cual no es una condición similar a los sustratos de esta experimentación, ya que sus contenidos de P son muy bajos (menor de 4 ppm), lo que presume según Tabatabai (1994), alguna condición físico-química que pueda estar afectando la catálisis en procesos como la hidrólisis de ésteres y de anhídridos de H_3PO_4 , de ahí su importancia en la nutrición de plántulas de aguacate y la tolerancia al ataque de patógenos.

7.2 Microorganismos asociados a la rizósfera.

Los resultados estadísticos muestran que las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias nitrificantes presentaron diferencias significativas entre el grupo de las oxidantes de amonio (NH_4) y las de nitrito (NO_2^-) (tabla 21); Para cada tratamiento las mayores poblacionales correspondieron a las oxidantes de nitrito, destacándose el T12 con 1.210×10^4 , seguido del T13 con 9.15×10^3 y T11 3.460×10^3 UFC.gss⁻¹; de nuevo los testigos (T9 y T18) resultaron con los valores mas bajos (5.63×10^2 y 5.59×10^2 UFC.gss⁻¹ respectivamente).

Con relación a las oxidantes de amonio, la reducción del pH de sustratos pudo influir aumentando este tipo de bacterias, ya que los mayores promedios se presentaron en los tratamientos T12, T11, T10 y T13 en los cuales se aplico sulfato de amonio: $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4^-$ como fuente acidificante (tabla 21); como lo indica Sylvia (2005), la fertilización nitrogenada de síntesis química industrial, usualmente, incrementa este tipo de poblaciones a 100×10^4 UFC gss⁻¹

Okano *et al* (2004), estableció un monitoreo para medir el efecto de aplicación de tratamientos modificados con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4^-$ sobre poblaciones de bacterias nitrificantes en un suelo obtenido de parcelas de tomate, encontrando un

aumento de las oxidantes de amonio con densidad inicial de 4×10^6 células / g.ss a los valores pico de 35×10^6 y 66×10^6 células / g.ss en los tratamientos 1,5 y 7,5 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente.

Tabla 21 Prueba de comparación de promedios para las poblaciones de bacterias oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito

Tratamientos	(UFC/gramo de suelo)	
	Bacterias Oxidantes Amonio	Bacterias Oxidantes Nitrito
T1	1036,1(d)	16794,3(a)
T2	1008,5(d)	11243,8(e)
T3	1303,4(bcd)	15819,8(b)
T4	1105(cd)	14995,3(b)
T5	308,2(e)	526,5(i)
T6	134,4(e)	255,8(i)
T7	191,7(e)	2692,4(h)
T8	155 (e)	563(i)
T9	57,09(e)	90,84(i)
T10	1367,6(bc)	3897,6(g)
T11	1546,2(a)	3459,5(hg)
T12	1735,9(a)	12144,2(d)
T13	1306,2(bcd)	9148,6(f)
T14	264,3(e)	648,9(i)
T15	179,7(e)	511,4(i)
T16	168,5(e)	307,9(i)
T17	145,8(e)	276,2(i)
T18	55,89(e)	189,22(i)

Se encontró una alta correlación positiva de 0.69 entre las variables bacterias oxidantes de amonio y de nitrito (anexo 29), permitiendo la interpretación de los procesos derivados del ciclo del nitrógeno y por ende la disponibilidad de este nutriente para las plántulas; según Abbott (2001).

En la actividad microbiana se encontraron los valores más altos en el T7 y T8 ($510,33$ y $483,67 \mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ sustrato día⁻¹ respectivamente); las estimaciones mas bajas correspondieron a T11 con $266,67$ y T15 con $255 \mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ sustrato día⁻¹, los cuales estuvieron inoculados con *P. cinnamomi* (figura 33).

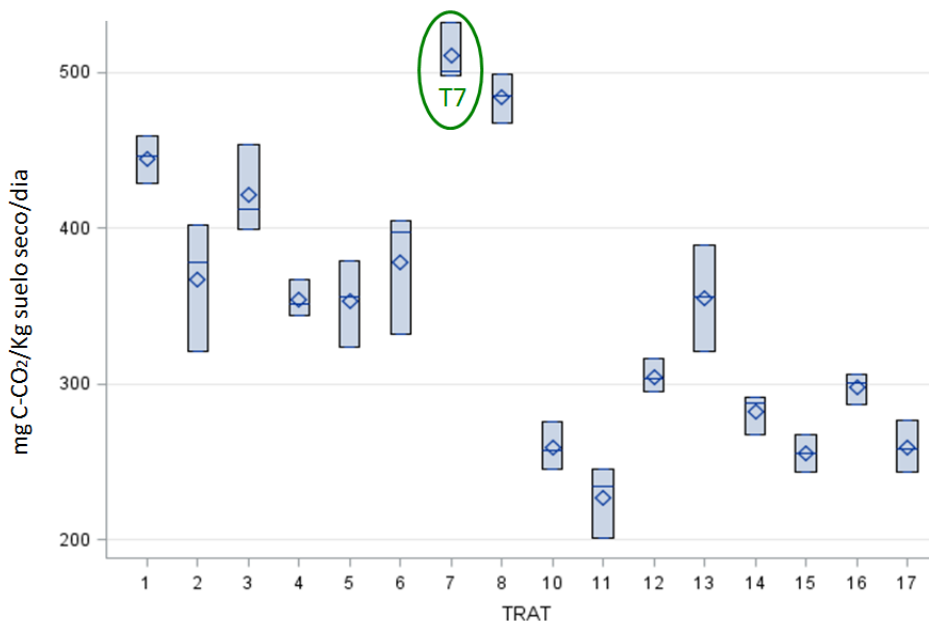


Figura 33 Actividad microbiana (Respirometría) en sustratos

Estos niveles se pueden considerar altos comparados con determinaciones logradas por Montenegro (2008), en suelos agrícolas con un contenido de materia orgánica de 7,88%, cuyo valor maxino fue de 126,70 $\mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}$ suelo día⁻¹. Gasca (2011), en otros suelos del Valle del Cauca pero con menor contenido de materia organica (2-3%) y con aplicaciones de vinazas, registró promedios superiores a 290 $\mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}$ suelo día⁻¹. Por tanto, esta situación concide con los tratamientos T7 y T8, los cuales se les aplicó este producto.

Lo anterior lo confirman Korndörfer *et al* (2004), quienes argumentan que el aumento de la actividad microbiana se debe al contenido de fuentes orgánicas provenientes de la vinaza que proporcionan energía para los microorganismos, y a su vez aumenta el crecimiento acelerado de la masa microbiana, por ende, se debe destacar que la principal característica de estos sustratos fue la inoculación de *Trichoderma* y la aplicación de vinazas

Gasca (2008) encontró similar tendencia en el suelo con algunas diferencias según los tratamientos, resaltando que el CO₂ se incrementa, principalmente en los tratamientos con mayor contenido de vinaza, lo que indica menor eficiencia en la utilización del carbono, resultado de mayor liberación de CO₂ por unidad de sustrato, (Lopez De A, S., y Da Silvieira, A. 2004).

La actividad microbiana de T7 y T8 generaría un efecto positivo de disponibilidad de nutrientes a nivel de rizósfera de plántulas de aguacate basado en los resultados de Burbano (1989), quien dice que la alta tasa de respiración edáfica indica un nivel elevado de actividad biológica y puede señalar la descomposición rápida de materia orgánica y liberación de nutrientes.

Por otra parte, de acuerdo con los datos obtenidos en relación a la colonización de micorrizas en raíces secundarias, los tratamientos con mayor valor fueron aquellos donde no se inoculó el patógeno *P. cinnamomi* Rands, siendo el T1 y T7 quienes mostraron los mayores porcentajes (50,6% y 47,3% respectivamente). Los resultados coinciden con los reportados por Orozco (2009) con promedios de colonización cercanos a 53% en aguacate variedad Lorena.

Los menores efectos de colonización se presentaron en los Testigos (T9 con 18,66% y T18 con 20,66%); Estas colonizaciones se consideran altas según lo reportado por Melo (2010), quien encontró valores de intensidad de colonización de hongos micorrizico arbuscular (HMA) en plántulas de aguacate que oscilaron entre 4,96 y 12,95% con contenidos de fósforo en sustratos de entre 938 mg/kg los cuales reflejan un elevado contenido de este elemento.

En aquellos tratamientos donde se inoculó el patógeno *P. cinnamomi* y que presentaron altos porcentajes de colonización de micorrizas como T16 con 44,3% y T12 con 40,3%, probablemente se vieron favorecidos por el manejo integrado en la que se aplicó estimuladores de crecimiento de raíces (Auxinas: Acido Indol-butírico - AIB) (figura 34); además se puede relacionar también lo reportado por por Alvarez y Ferrera-Cerrato (1994), quienes consideran que los hongos micorrízicos poseen amplio potencial como agentes de biocontrol en las enfermedades radicales como por ejemplo la endomicorriza que muestra un efecto aminorante sobre patógenos como *Fusarium oxysporum* (Vargas, 1991).

Matare y Hattingh (1978), realizaron las observaciones preliminares para reconocer que la presencia de hongos micorrízicos sobre las raíces de plantas de aguacate tienen efecto aminorante del daño provocado por *Phytophthora cinnamomi* encontrando resultados satisfactorios; de esta manera, las plántulas con las mayores colonizaciones en presencia del patógeno como T10, T12 y

T16, estarían abarcando mejores condiciones de tolerancia y biocontrol frente a condiciones ambientales adversas.

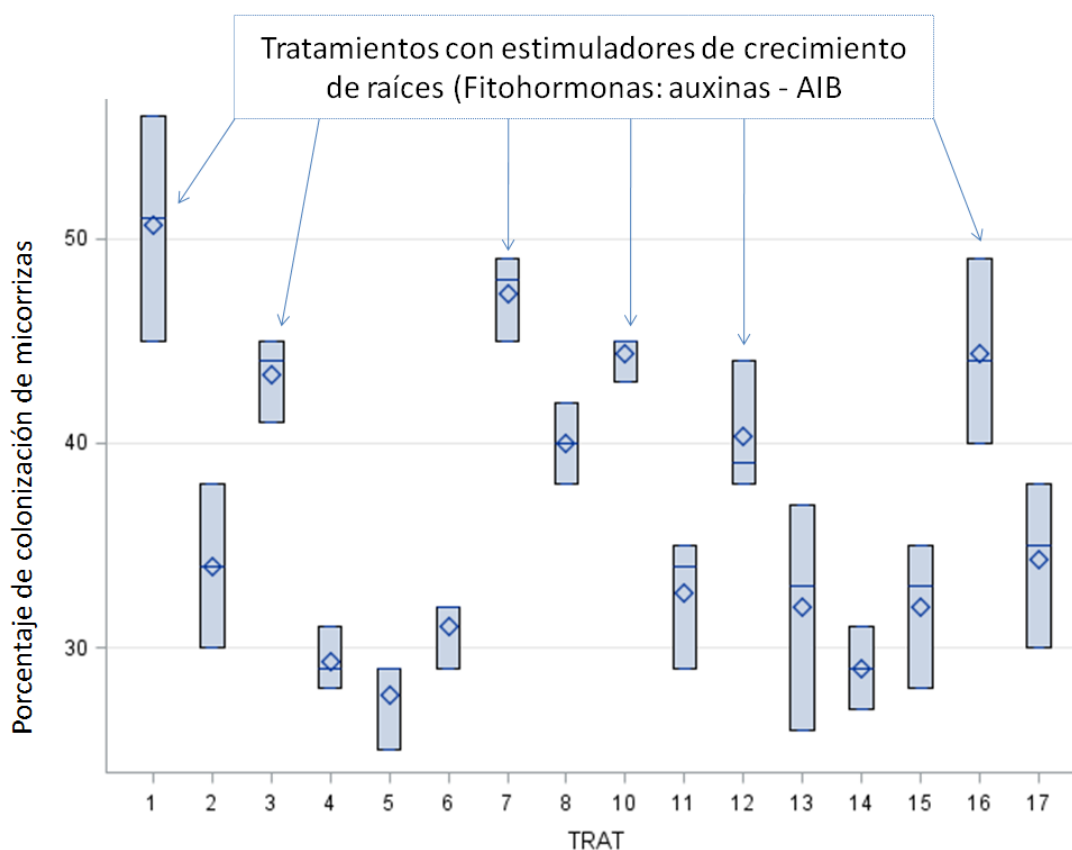


Figura 34 Colonización de micorrizas en plántulas de aguacate

Roveda y Polo (2007) encontraron que plantas bajo condiciones de estrés por poca disponibilidad de fósforo en la solución del suelo ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) presentaron mayor concentración de proteína foliar, que plantas no estresadas ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); De acuerdo a la caracterización química del sustrato evaluado, se encontró una poca disponibilidad de fósforo ($1,94 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), siendo este un ambiente propicio para que se exprese una alta respuesta a la colonización, como lo argumentan Karaki y Clark (1999), quienes afirman que la colonización de las micorrizas está también determinada muchos factores, entre ellos, la cantidad de fósforo (P) que se encuentra en el suelo.

A mayor concentración de fósforo en el suelo, menor porcentaje de infección en las raíces de la planta. Así mismo se han tenido resultados donde el fósforo tuvo influencia sobre la concentración de proteínas y lípidos en la planta, como lo

presenta un estudio hecho con dos genotipos de trigo con varios niveles de fósforo en el suelo y que dio como resultado que a mayor concentración de fósforo en el suelo, hubo menor colonización de micorrizas (*Glomus* spp) en las raíces y que las concentraciones de lípidos y proteínas fueron más altas en las plantas que tenían mayor presencia de micorrizas.

Igualmente otros autores como Barea (2001), López-Gutiérrez *et al.* (2001), reportan la presencia de micorrizas vesículo arbuscular está relacionada con el contenido de fósforo en el suelo; generalmente bajos contenidos de fósforo en el suelo favorecen el establecimiento de la simbiosis micorrízica incrementando la colonización de las raíces de las plantas y favoreciendo la reproducción de las esporas; por el contrario, un alto contenido de fósforo en el suelo incide en la disminución de la simbiosis en las raíces de las plantas (Bowen y Rovira, 1999; Barea, 2001); lo anterior se relaciona con los testigos del experimento, donde parte del fosforo disponible corresponde a los productos de síntesis química especificados en la fase 1 de la investigación (Diagnóstico del sistema de producción).

Para el caso de la rizósfera de plántulas de aguacate, los principales procesos que llevan a cabo los microorganismos en los sustratos son los siguientes:

- Descomposición de materia orgánica (por ejemplo, *Trichoderma* materiales con alto contenido de celulosa)
- Asociación en simbiosis con las raíces (por ejemplo, las micorrizas arbusculares).
- Asociación indirecta relacionada con la descomposición de la materia orgánica (por ejemplo, la nitrificación).
- La liberación de amonio durante mineralización proporciona una sustancia para bacterias nitrificantes para utilizar como fuente de energía.
- Asociación indirecta relacionada con el control biológico de enfermedades principalmente de raíces ocasionada por Oomicetos.
- Degradación de los productos químicos aplicados al sustrato (por ejemplo, la degradación de los plaguicidas).

- Inmovilización (por ejemplo de nutrientes en organismos que dejan de estar disponibles para las plantas temporalmente).

Se podría suponer que la asociación simbiótica de algunos géneros de micorrizas en estos sustratos contribuye con la síntesis de proteínas de estrés, las cuales forman parte de la respuesta al déficit de fósforo en el suelo. Según Usuda y Shimogawara (1995), el estrés por deficiencia de fósforo, conduce a la expresión diferencial de la información genética, produciendo cambios en los productos génicos, incluyendo mRNA y proteínas; es así como aumenta la síntesis de nuevas proteínas en plantas estresadas y disminuye el nivel de centenares de proteínas existentes. Estas proteínas específicas de estrés, posiblemente dotan a las plantas con la capacidad de adaptarse al estrés medioambiental por medio de ajustes fisiológicos y bioquímicos.

7.3 Respuestas fisiológicas de las plántulas de aguacate

Los mayores contenidos de materia seca en las raíces se obtuvieron en los tratamientos donde no estuvo presente el patógeno y con la aplicación de la auxina o estimulador de crecimiento radical (Acido Indol Butírico: AIB), siendo los mas altos T1, T3, T5 y T7 con 40.42, 33.73, 30.17 y 27,15% respectivamente (figura 35).

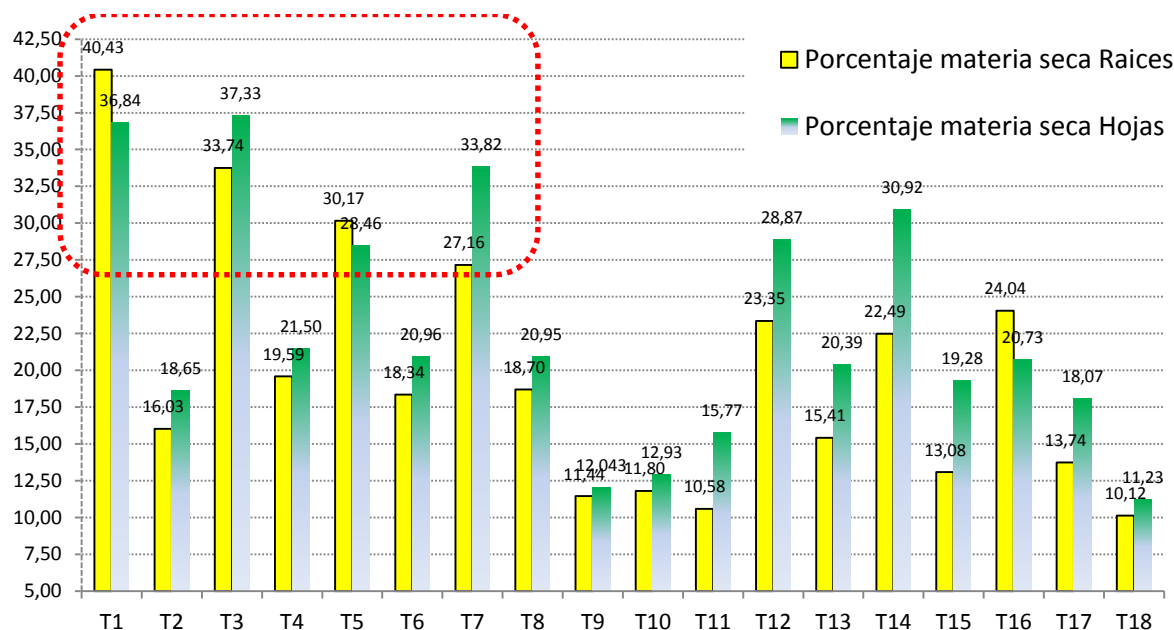


Figura 35 Porcentaje de materia seca en plántulas de aguacate (área delimitada con trabamientos con aplicación de auxinas: ácido indol-burítico AIB)

Fuentes *et al* (2007), encontró respuestas fisiológicas similares con la aplicación de AIB sobre brotes de *Aloe vera* (L.) Burm, suministrándoles una dosis de la hormona ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), respondieron de manera favorable en la generación de raíces y actividad microbiana rizosférica; Pedrottf y Voltolini (2001), encontraron resultados similares a estos, al observar que la dosis de AIB ($500, 1000$ y 1500 mg.L^{-1}) en plántulas de manzana, afectaba la longitud de la raíz en el enraizamiento pero sin diferencias significativas.

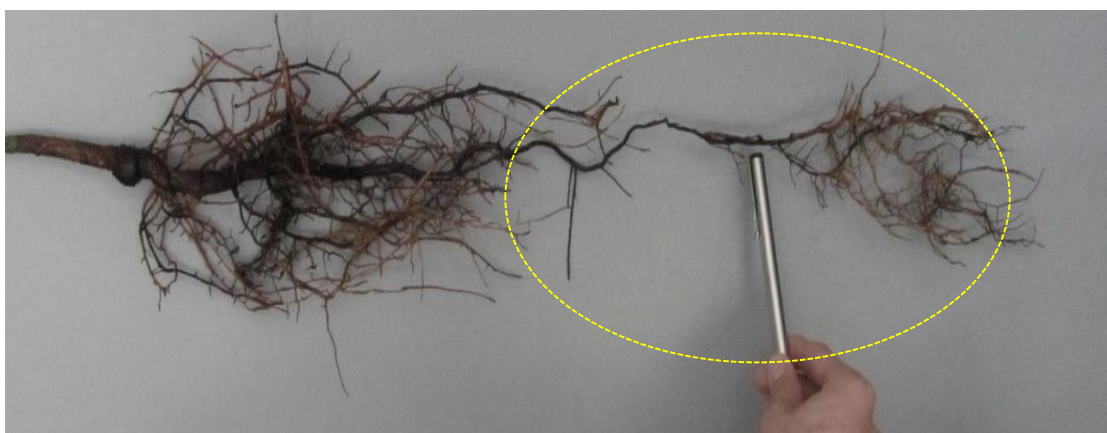


Figura 36 Efecto de auxina (AIB) sobre la elongación de raíces de plántulas de aguacate (Tratamiento: T1+ácido indol-butírico) (Fuente Ararat 2012).

En la figura 36 se puede ilustrar como el AIB por su efecto auxínico induce el proceso de rizogénesis como tal en T1, aunque Fuentes (2007), resalta que en condiciones de campo la calidad de las raíces nuevas, así como la longitud de las mismas puede verse afectada por otros factores físicos, químicos o biológicos.

Pedrotti y Voltolini (2001), afirman que el efecto auxínico del AIB, induce el proceso de rizo génesis como tal, encontrando resultados similares a estos, al observar que esta auxina, afectaba la longitud de la raíz en el enraizamiento de estacas de manzana.

En cuanto a la materia seca foliar, los menores valores se obtuvieron en el T18 (testigo 2 con *P. cinnamomi*) (figura 35); de forma contraria, el mayor contenido de materia seca en hojas lo ocupa T3 con 37.33%, seguido de T1 con 36.84% y T7 con 33.82%, los cuales coinciden con la aplicación de la fitohormona AIB;

estos datos son similares a los reportados por Lovatt (1998) en huertos de variedad Hass injertado sobre Duke, cuyo promedio para raíces fue de 37% y para hojas de 40%.

Este patrón de respuesta ha sido encontrado en gran cantidad de otras especies por Ruiz y Mesén (2010), donde normalmente se dió un aumento en la capacidad de enraizamiento en plántulas de *Plukenetia volubilis* L., al aplicar dosis de AIB a 0,15 y 0,20% obtuvo el mayor porcentaje de enraizamiento (92,59 y 87,65%), número de raíces (25,94 y 20,05) y longitud de raíz mayor (4,25 y 4,57 cm).

Un efecto importante evidenciado, es la correlación entre la concentración de materia seca en raíces con la foliar (0.89), (ver anexo 30), lo que podría considerarse trascendental a la hora de realizar diagnósticos visuales en las hojas relacionados con el estado nutricional cuando se han realizado aplicaciones de fitohormonas.

Al igual que la materia seca foliar, el índice de área foliar también tuvo diferencias significativas con los mayores valores en T7, T1 y T3 (2153, 2140 y 1899 cm²/plántula respectivamente) como se muestra en la figura 37, los cuales tuvieron la aplicación de AIB; los registros mas bajos se presentaron en los testigos T9 con 308 y T18 con 296 cm²/plántula; para este último, se puede citar a Schaffer y Ploetz (1989), que relacionan como la presencia y alta incidencia de *Phytophthora cinnamomi* podría implicar una disminución en la conductancia estomática al CO₂ y una disminución en la fotosíntesis neta, conllevando a un menor crecimiento del área foliar, y en este caso, una menor longitud de brotes y yemas en general.

Arenas (1998), también reporta como la inoculación de *P. cinnamomi* afectó área foliar, es decir, obtuvo una disminución del 39% en esta variable; para el peor de los tratamientos (T18: manejo convencional inoculado con *P. c*), la reducción fue mucho mas drástica (86%) con respecto al máximo valor (Figura 36).

Los tratamientos T7, T1 y T3 tuvieron también la particularidad de que estaban en ausencia de *P. cinnamomi* Rands. Esta respuesta se explica mediante correlaciones altas con las variables: materia seca de raíces, materia seca de

hojas y contenido hídrico relativo foliar (0.65, 0.72 y 0.74 respectivamente) (ver anexo 30).

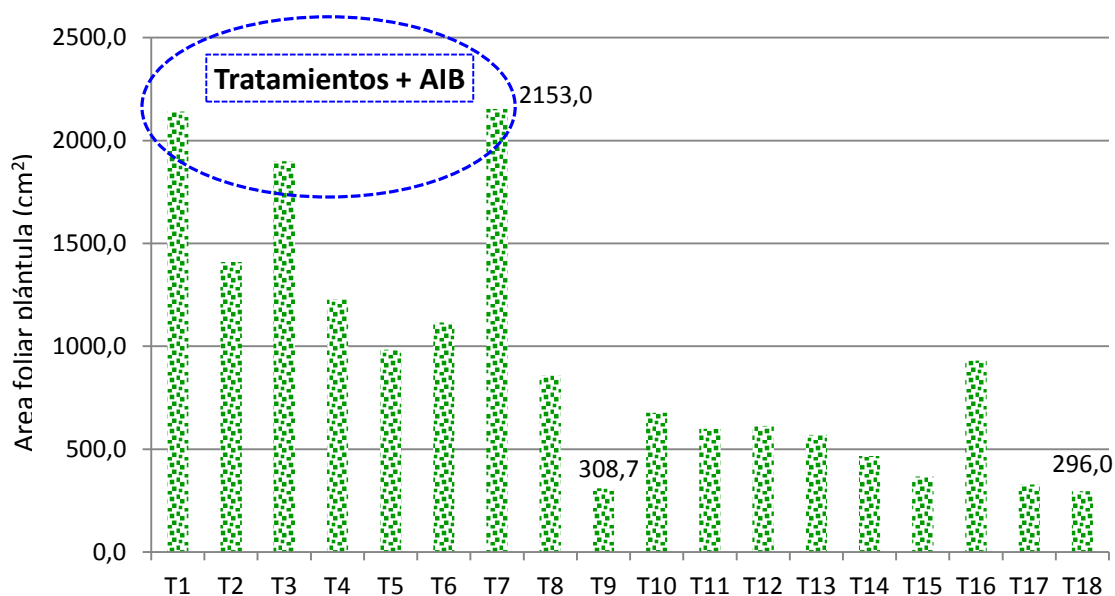


Figura 37 Área foliar de plántulas de aguacate (área delimitada en tratamientos con la aplicación de estimuladores de crecimiento radical: auxina AIB).

El contenido hídrico relativo (CHR) obtuvo los mayores valores para T1 y T3 (42.43% y 40.86%) y los mas bajos para los testigos (T9 con 12.86% y T18 con 13.6%); el CHR tuvo alta correlación con las variables: materia seca ($r=0.73$), área foliar ($r=0.72$), P ($r=0.67$), K ($r=0.67$) y Mg foliar (0.69), que podría ser una respuesta de la actividad rizosférica y de la buena calidad del sustrato seleccionado; este efecto probablemente conlleva la alta colonización de micorrizas, disponibilidad de K_2O , respuesta a la optima porosidad para la aireación o flujo de gases y la ausencia de agentes fitopatógenos que puedan generar estrés biótico a la planta como es el caso de *P. cinnamomi* Rands.

La prueba de comparación de promedios relacionadas con los elementos nutricionales foliares (tabla 22), muestra altas concentraciones de macro nutrientes en aquellos donde no hubo presencia de *P. cinnamomi*, como en T7 y T1, donde el nitrógeno (N) presenta valores de 2.8% y 2.5% respectivamente; en cuanto al P el mas alto fue T1 con 0.69% y luego el T7 con 0.57%; esta misma

tendencia para el comportamiento del K donde T1 con 1.0% y T7 con 0.94% fueron los de mayor acumulación.

Un comportamiento contrario se evidenció en los testigos (T9 y T18), quienes presentaron los mas bajos valores de P foliar; la figura 38 muestra una sintomatología típica de deficiencia de este elemento en estos tratamientos, según de Salazar-Garcia (2002), la descripción visual consiste en un bronceado y necrosis en las hojas⁸.



Figura 38 Deficiencia de fósforo en injertos de aguacate Hass (Fuente, Ararat 2012).

Los tratamientos que tuvieron manejo con estimuladores de crecimiento con AIB y $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4^-$ para reducir el pH, están por encima de los niveles nutricionales de N y P propuestos por Salazar y Lazcano (1999) quienes trabajaron con valores estándar (S) y coeficientes de variación (C.V.) utilizados para calcular los

⁸ En deficiencias leves, el follaje es escaso y localizado en el ápice del brote. Los brotes vegetativos son cortos y delgados y suele ocurrir defoliación temprana. Las hojas de mayor edad son coriáceas y pueden adquirir un tono bronceado. Se observan manchas necróticas sin patrón determinado en la lámina de la hoja. Por la parte inferior de la hoja las nervaduras pueden tornarse moradas, incluyendo al pecíolo de la hoja (Salazar-Garcia, 2002).

índices de balance en huertos de aguacate variedad Hass (como se referenció en la fase 1 de la investigación).

Tabla 22 Resultados de la prueba de comparación de promedios para los nutrientes foliares.

Agrupamientos tratamientos	Nutrientes foliares en plántulas de aguacate				
	N	P	K	Ca	Mg
T1	2,52 (a)	0,69 (a)	1,00 (a)	0,95 (b)	0,92 (a)
T2	2,03 (cb)	0,57 (b)	0,81 (efg)	0,73 (e)	0,81 (b)
T3	1,85 (cbd)	0,57 (b)	0,93 (bac)	0,90 (cbd)	0,79 (b)
T4	1,67 (ced)	0,37 (dfce)	0,81 (efg)	0,71 (fe)	0,78 (b)
T5	1,23 (fg)	0,37 (dfce)	0,98 (ba)	1,15 (a)	0,81 (b)
T6	1,39 (feg)	0,36 (dfce)	0,91 (bdc)	0,83 (d)	0,73 (c)
T7	2,80 (a)	0,57 (b)	0,94 (bac)	0,95 (bc)	0,73 (c)
T8	2,03 (cb)	0,41 (dc)	0,87 (edc)	0,83 (d)	0,72 (c)
T9 testigo1	1,03 (g)	0,25 (g)	0,44 (j)	0,31 (h)	0,34 (k)
T10	1,19 (fg)	0,35 (dfce)	0,85 (ed)	0,87 (cbd)	0,69 (d)
T11	1,03 (g)	0,32 (f)	0,70 (hi)	0,63 (feg)	0,58 (j)
T12	1,03 (g)	0,34 (dfe)	0,75 (hg)	0,65 (feg)	0,61 (hi)
T13	1,08 (g)	0,39 (dce)	0,68 (i)	0,61 (g)	0,60 (ji)
T14	1,50 (fed)	0,38 (dfce)	0,96 (ba)	0,85 (cd)	0,68 (ed)
T15	1,05 (g)	0,33 (fe)	0,83 (ef)	0,62 (fg)	0,63 (gh)
T16	2,0633 (b)	0,41 (c)	0,85 (ed)	1,07 (a)	0,66 (ef)
T17	1,03 (g)	0,36 (dfce)	0,76 (hfg)	0,67 (feg)	0,64 (gf)
T18 testigo2	1,02 (g)	0,29 (g)	0,42 (j)	0,34 (h)	0,36 (k)

(*): Letras diferentes significan promedios estadísticamente diferentes según la prueba de Duncan (0.05)

En La figura 39, la interacción del estado fitosanitario (ausencia y presencia del patógeno) con el manejo del pH del sustrato (aplicación de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4^-$ y vinaza), muestra evidencia que los tratamientos “sin inoculación de *P. cinnamomi*” acumularon mayor contenido de N, P y K foliar, principalmente cuando se acidificó el pH del sustrato con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4^-$, lo que permite relacionar la sanidad de las plántulas con la eficiente toma de nutrientes.

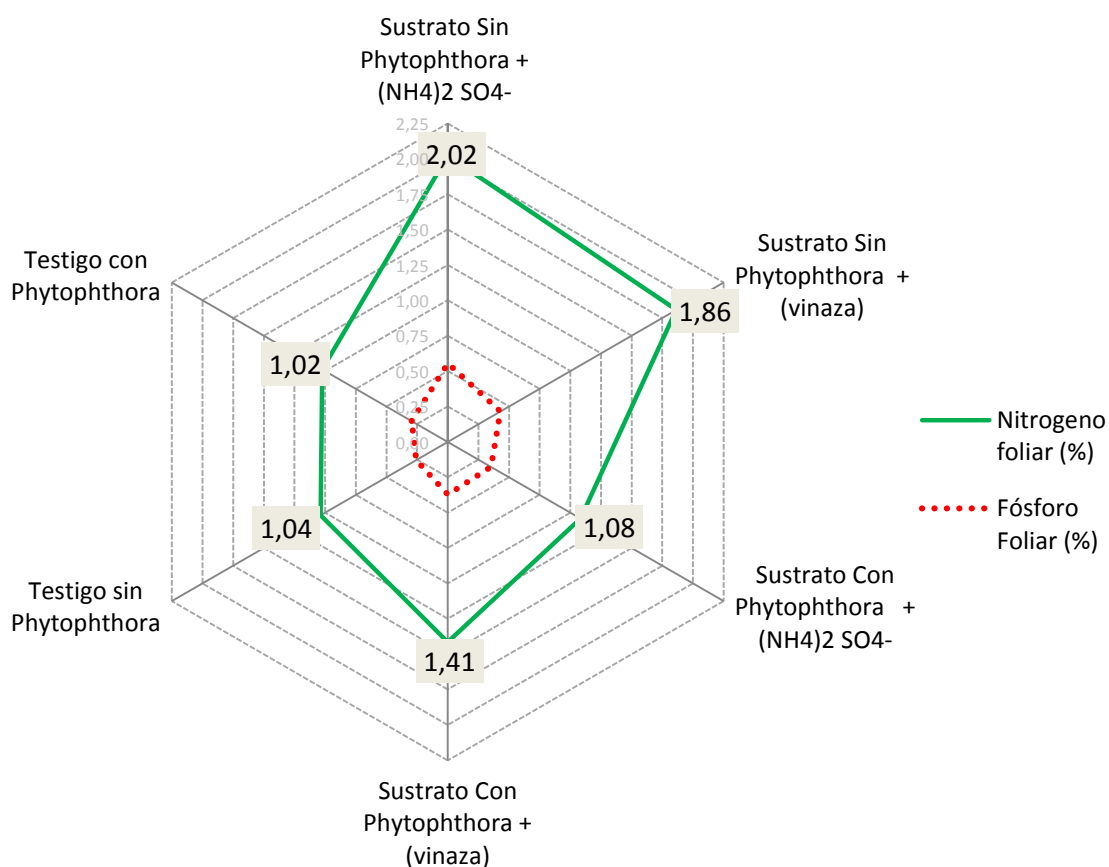


Figura 39 Comportamiento de N y P de acuerdo a la interacción: estado fitosanitario (SinPC: sin *P. cinnamomi*; conPC: con *P. cinnamomi*) con el manejo del pH del sustrato (aplicación de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4^-$ y vinaza).

En el anexo 30 se encontró una alta correlación entre el P foliar con la colonización de micorrizas ($r=0.53$) y las bacterias oxidantes de nitrito ($r=0.53$), lo que puede tener efecto favorable con la absorción de nutrientes en aquellos tratamientos donde no se inoculó *P. cinnamomi* como el caso de T1 y T7; según Siqueira (1988), citado por (Novella 2001), además de su efecto sobre el crecimiento y absorción de fósforo los hongos micorrizicos (HMA) favorecen el

crecimiento radical y la fijación biológica del nitrógeno. Así que también favorece a las plantas que forman simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, que ayudan y contribuyen a elevar los contenidos de nitrógeno del suelo.

Otra correlación importante fue entre la actividad microbiana rizosférica con el contenido foliar de N, P y Mg ($r= 0.73, 0.65$ y 0.60 respectivamente) (anexo 30), el cual se puede explicar según lo reportado por Chuang *et al.* (2007), donde la mayoría de las bacterias del suelo tienen la capacidad de Solubilización del P inorgánico y está estrechamente relacionada con la producción de ácidos orgánicos, los cuales pueden solubilizar fosfatos a través de la liberación de protones y su habilidad para quelatar iones Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} y Al^{3+} .

En cuanto al comportamiento del potasio, puede notarse como en los tratamientos con mayor acumulación de este nutriente, tienen una directa relación con la aplicación de silicato de Potasio, que fue el producto preventivo para *P. cinnamomi* (figura 39); Según Salazar-Garcia (2002), esta situación estimula y promueve el crecimiento radicular y mejora la resistencia del aguacate a las enfermedades y a los efectos adversos del clima y es esencial para la formación de azúcares y almidones para la planta, ya que está ligado directamente con la fotosíntesis; este resultado también se sustenta a través de la alta correlación con la materia seca foliar (0.61) (anexo 30).

En el caso de los tratamientos con silicato de potasio, además del aporte de K como hidrorregulador, tuvieron menor incidencia de la enfermedad, los cuales generaron un probable efecto fungistático (anexo 34); Bekker en 2007, recomienda la aplicación de silicato de potasio en los árboles de aguacate como tratamiento eficaz del suelo para suprimir la pudrición radicular ocasionada por *P. cinnamomi* Rands.

Seebold *et al.*, en 2004 encontraron que la aplicación de varias fuentes de Silicato en suelos deficientes durante varios años, redujo la aplicación de fungicidas y referenció este elemento como un componente preventivo a enfermedades radicales, afirmando que esta molécula forma una barrera física en las raíces favoreciendo la expresión de compuestos fenólicos y otros compuestos fungitóxicos confinados en la rizósfera de la planta.

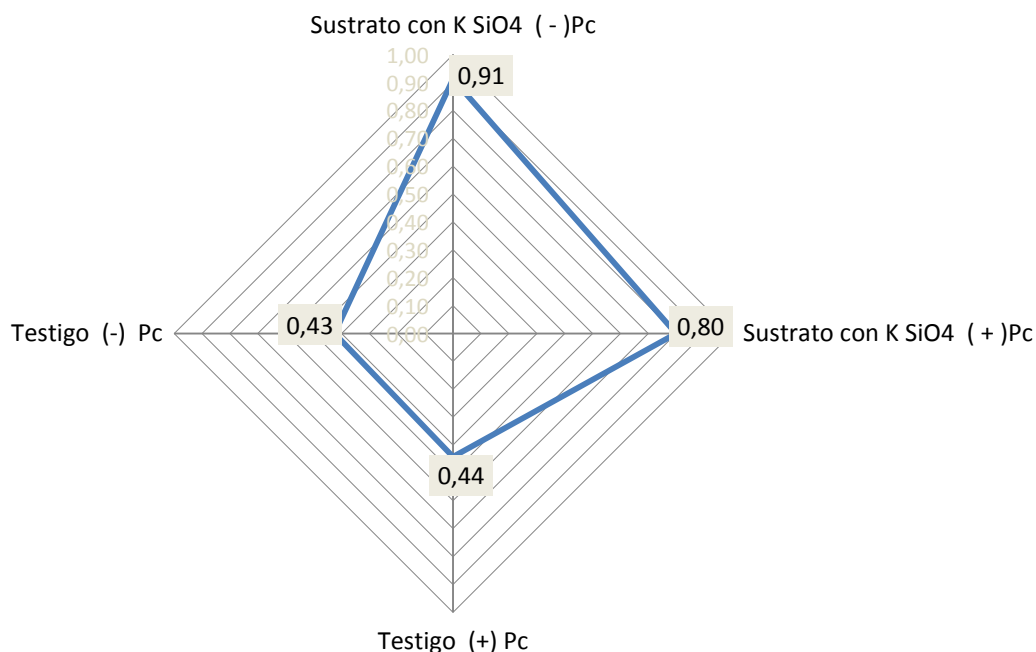


Figura 40 Potasio foliar de acuerdo a la aplicación de silicato de potasio (K-SiO₄) (Insumo de uso preventivo para control de *P. cinnamomi* Rands).

Con relación al Silicato de potasio sobre el control del patógeno, se cita a Chérif *et al* (1994), quienes indicaron que esta supresión se hace posible por la mayor silicificación de las células epidérmicas. Demostraron que el Silicio impide la inicial penetración de los tubos germinales de esporas, posteriormente se da lugar a una reducida penetración de los haustorios. Datnoff *et al* (1997) propusieron el concepto de la asociación de silicio con constituyentes de la pared celular, haciendo que estas sean menos accesible a la degradación enzimática por hongos.

En un inicio se pensó que este mecanismo del silicio proporciona sólo protección efectiva contra enfermedades fúngicas foliares, pero en la actualidad se ha demostrado que es igualmente supresora en patógenos que infectan raíces (Bowen *et al.*, 1992).

Según Fauteux *et al.* (2005) el enlace entre la deposición de Silicio y de la resistencia a patógenos se deriva del hecho de que el Silicio se acumula en sitios de infección. Este autor sugiere interpretar este tipo de procesos como un

sistema de transporte activo por parte del silicio, al menos como sucede en plantas de arroz, que es debido a una mayor tasa de transpiración en los sitios donde se daña la cutícula dando lugar a un transporte activo como sistema de defensa.

El uso de silicato de potasio no solo contribuye a la prevención contra el ataque de *P. cinnamomi*, sino también a la disponibilidad de potasio en la rizósfera y para regular efectos enzimáticos en la planta, de acuerdo a lo planteado por Chérif *et al* (1994), quien afirma que el Silicio soluble activó los mecanismos de defensa del pepino frente al ataque de *Pythium*, reflejado por la mayor actividad de las peroxidasas, quitinasas y polifenoloxidasas, y aumento de la acumulación de compuestos fenólicos.

Después de realizar la prueba de rango múltiple de Duncan que relaciona la interacción de los 2 tipos de control preventivo (con silicato de potasio y con *Trichoderma* spp), se encontró que no hubo diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad registrados, como se representa en la figura 41.

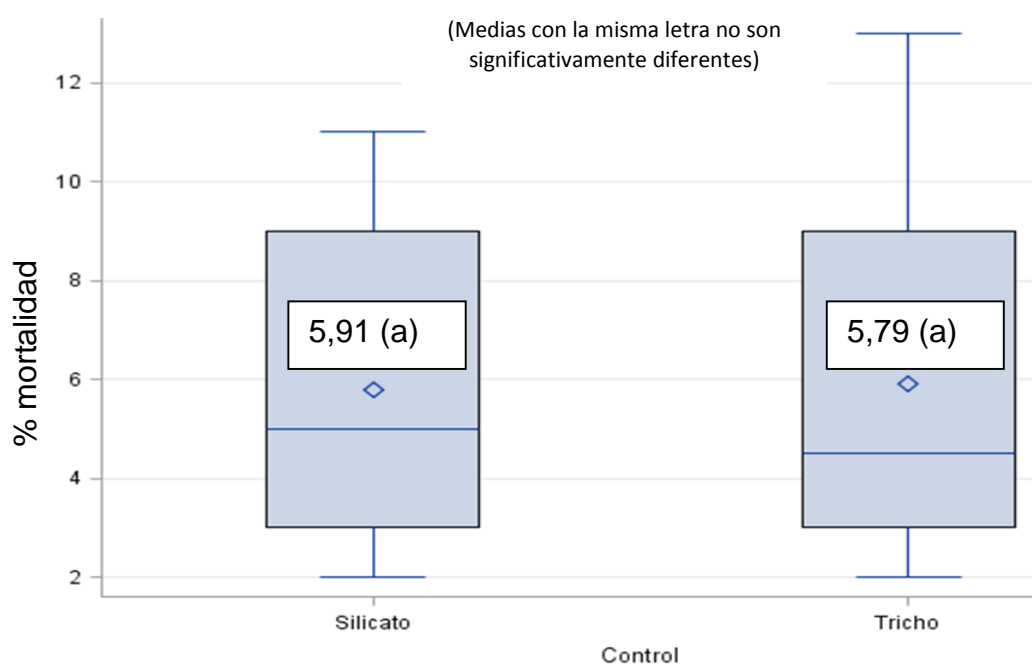


Figura 41 Interacción de la mortalidad de plántulas de aguacate con el control preventivo fitosanitario (con silicato de potasio y *Trichoderma harzianum*)

De acuerdo a la interacción entre el estado fitosanitario del sustrato y el control preventivo de *P. cinnamomi* Rands, se puede observar que la presencia de este patógeno influye negativamente en la actividad microbiana como lo ilustra la

figura 42, donde los valores de respirometría están por debajo de $300 \mu\text{g C-CO}_2\cdot\text{g}^{-1}$ sustrato día⁻¹).

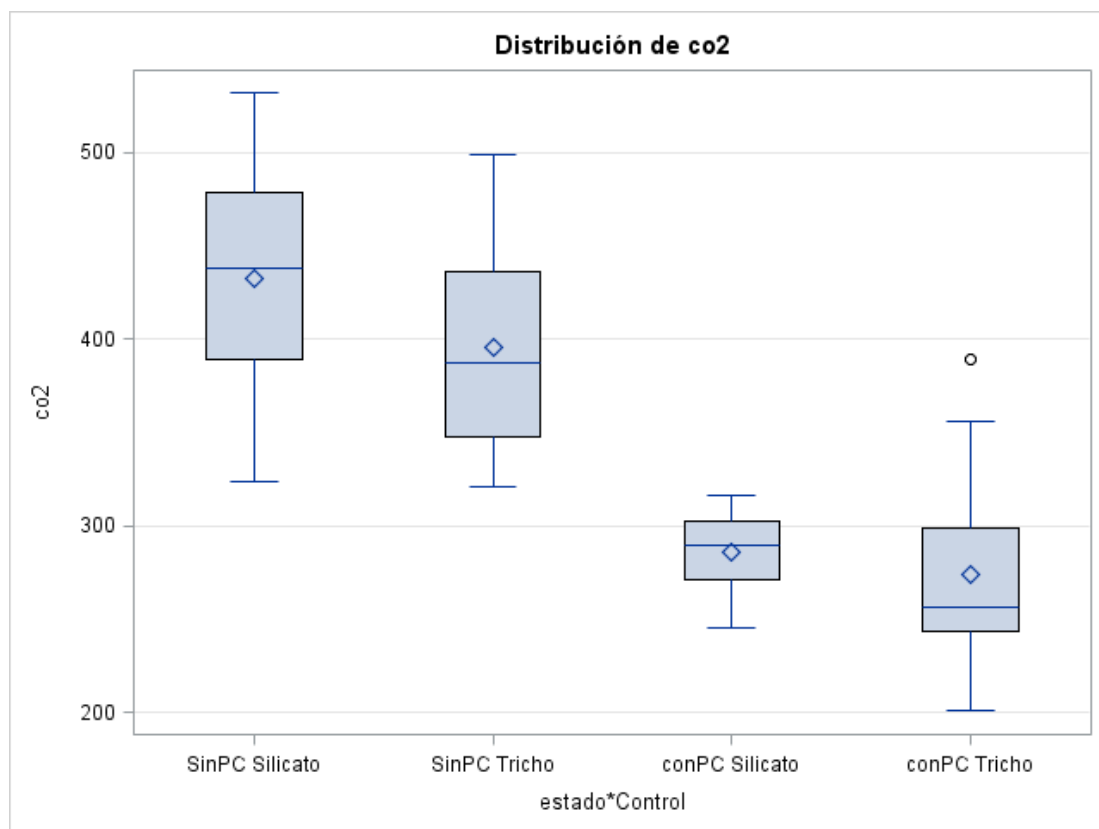


Figura 42 Distribución del porcentaje de mortalidad de plántulas de aguacate de acuerdo a la interacción con manejo preventivo fitosanitario (silicato de potasio y con *Trichoderma* spp.)

No obstante, los tratamientos con la inoculación de *Trichoderma* en presencia de *P. cinnamomi*, obtuvieron bajos porcentajes de mortalidad de plántulas en comparación con el testigo, el cual no tenía manejo preventivo y presentó la mayor incidencia de la enfermedad (19,33 % de mortalidad).

Jimenez *et al.* (2009), atribuyen que la estimulación de *Trichoderma* sp., con las plantas está relacionada con su capacidad lítica y por inducir síntesis enzimática, es decir, que los incrementos de estas enzimas, parecen ser producto de la activación temporal de diferentes mecanismos de defensa por colonización en la rizodermis del hongo, induciendo la síntesis transitoria de peroxidasas, provocando cambios bioquímicos sistémicos favorables en la rizósfera; Los mismos autores sugieren que la interacción directa planta-hongo puede ser

tomada como criterio de selección de cepas promisorias y de elementos de calidad para estudios de control biológico o relaciones simbióticas.

En cuanto a elementos secundarios como el Ca, T5 y T16 fueron los de mayor contenido (1.15% y 1.07% respectivamente), pero por debajo del nivel de referencia; En cambio los valores de Mg fue el único nutriente por encima del nivel de referencia (0.58%) en todos los tratamientos, donde T1 con 0.92% y T5 con 0.81% fueron los mas altos y testigos T9 con 0.34% y T18 con 0.36% los mas bajos (este último se encontraba en presencia del patógeno) (Tabla 18).

Según el análisis de comparación de promedios en la variable “mortalidad de plántulas” (anexo 32), la inoculación de *P. cinnamomi* Rands tuvo el mayor efecto en el T18 (testigo de manejo convencional) con un 19.3% de mortalidad, seguido del T17 con 11.66%; estos tratamientos no presentaron respuesta al control por parte de *Trichoderma* y además tuvieron contenidos de Ca foliar por debajo de los niveles de referencia⁹, lo que pudo generar mayor incidencia del patógeno (figura 43).

Lo anterior es destacado por Guerrero (2012), que afirma que el Ca constituye un componente importante de la laminilla media de las células vegetales, asimismo regula la presión osmótica de estas; su deficiencia afecta el crecimiento de los meristemas, la absorción de nitratos y favorece procesos de pudrición como en el caso de hortalizas y frutales.

⁹ Niveles de suficiencia en las hojas de aguacate expresado en porcentaje: N=2.35, P=0.14, K=1.37, **Ca=1.86**, Mg=0.58 y S=0.40 (Salazar-García, 1999).

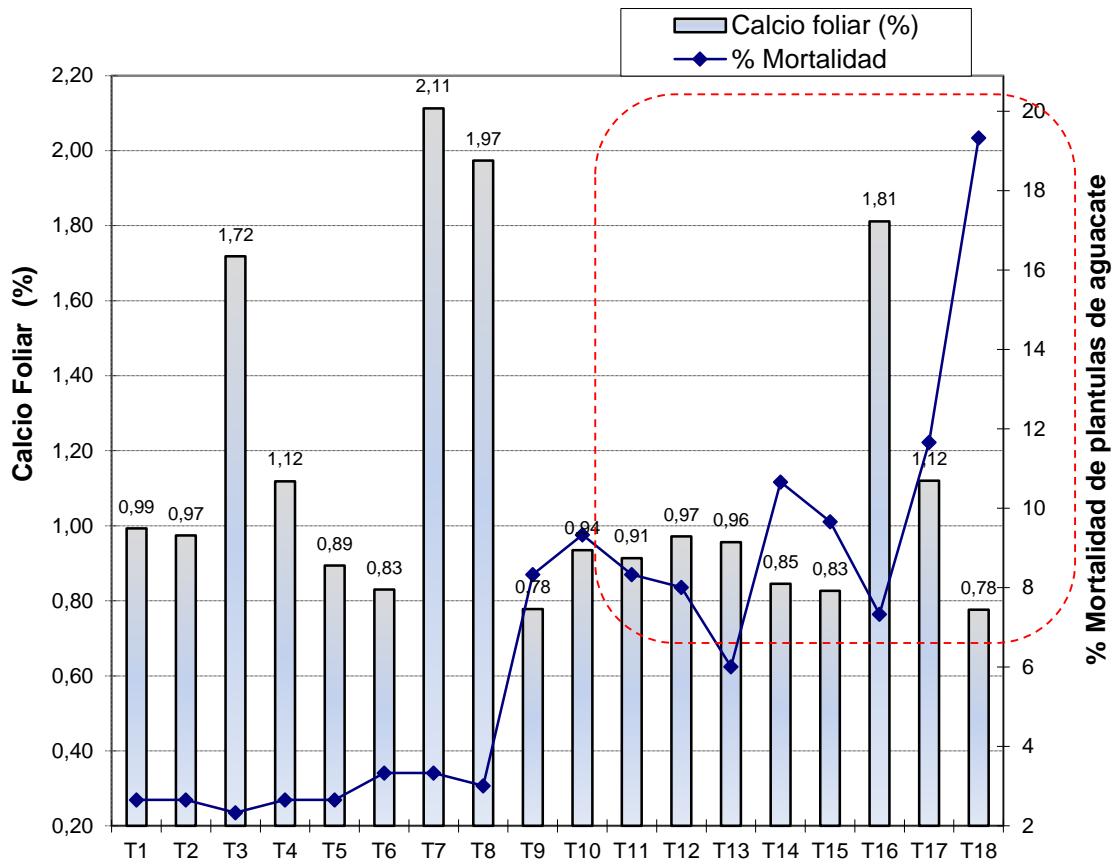


Figura 43 Relación del contenido de Calcio foliar con la mortalidad de plántulas de aguacate (La zona delimitada ilustra los tratamientos inoculados con *P. cinnamomi* Rands)

En las plantas del T18 (con mayor incidencia de *P. cinnamomi* Rands), se realizaron aislamientos de raíces secundarias; se usó PDA+ en los cuales se identificaron las estructuras del patógeno similares a las ilustradas en la fase 1.

La figura 44 muestra efectivamente que el mayor número de propagulos de *P. cinnamomi* Rands se encontraron en el T18, lo que lo hace bastante vulnerable a las plántulas presentes es ese sustrato para adquirir la enfermedad de la pudrición de raíces. También se destacan los tratamientos con *T. harcianum*, en los cuales la densidad de inóculo fué menor comparada con los tratamientos con silicato de potasio.

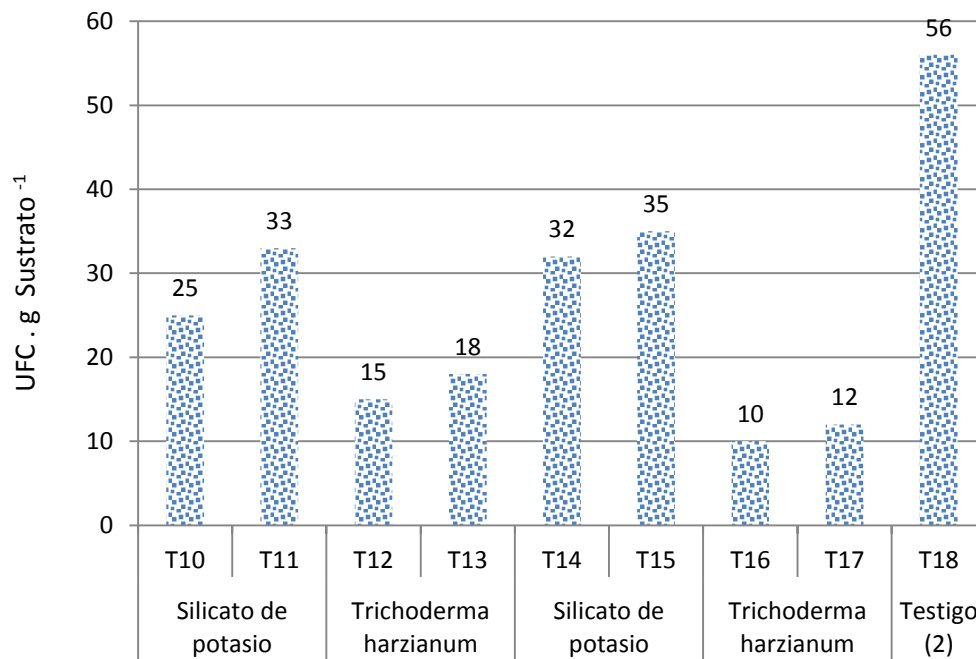


Figura 44 Densidad de inóculo de *Phytophthora cinnamomi* Rands presentes en el sustratos con diferentes manejos preventivos

7.4 Conclusiones fase dos.

La acidificación temporal del pH del sustrato tuvo una influencia directa con la actividad enzimática de las fosfatasas ácidas, obteniendo los mayores valores en los tratamientos donde no se inoculó *P. cinnamomi*.

La actividad enzimática de celulasas alcanzó los mayores promedio en aquellos tratamientos donde estuvo presente *T. harzianum*, con una relación de incremento proporcional en función del tiempo.

La adición de los productos químicos para el manejo del pH, el uso de enmiendas y la calidad de los materiales orgánicos, influyeron en las poblaciones de bacterias y hongos, como el caso del efecto del sulfato de amonio sobre las poblaciones de bacterias oxidantes de amonio y nitrito.

En el caso de las micorrizas, a pesar de que todas las plántulas estaban con una baja disponibilidad de fósforo en el sustrato, las mayores colonizaciones de micorrizas se obtuvieron en los tratamientos donde se realizó la aplicación de estimulador de crecimiento radical (auxina: ácido indol butírico – AIB), incluyendo aquellos donde se inoculó con *P. cinnamomi* Rands.

A pesar de que la presencia de *P. cinnamomi* Rands influyó negativamente en la actividad microbiana (respirometría), hubo una marcada reducción de este patógeno por la fungistasis en tratamientos con silicato de potasio; en este sentido, también se encontró una alta correlación de los valores mas bajos de mortalidad de plántulas con los mas altos contenidos de calcio en tejido foliar.

8. Bibliografía

Abad, M; Noguera, P y Carrión, C. 2004. Los sustratos en os cultivos sin suelos. pp. 113- 158. In: Urrestarazu, M. Tratado de cultivo sin suelo. Ediciones Mundi-Prensa, Barcelona, España. 911p.

Abad, M; Martínez, M; Martínez, P. y Martínez, J. 1992. Evaluación agronómica de los sustratos de cultivo. I Jornada de sustratos. Actas de Horticultura 11: 141-154.

Abad, M. 1991. Los Sustratos Hortícolas. In: II Congreso Nacional de Fertirrigación. Almería, 18 - 20 septiembre. Fundación para la Investigación Agraria en la provincia de Almería, pp 1 - 15 .

Abbott, Lynn 2001. Soil Biological Fertility. University of Western Australia. Soils are Alive Newsletter. University of Western Australia. Vol 2, n 1.

Aburto Guerrero, Felipe Andrés (2007); Evaluación de sustratos obtenidos a partir de la mezcla de un residuo orgánico bioprocesado con materiales comunes para la propagación de Palto. Universidad de Chile

Adams, P. B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 28: 59-72.

Aguilar, R. 2002. Producción de Sustratos para Viveros. Proyecto Regional de Fortalecimiento de la Vigilancia Fitosanitaria en Cultivos de Exportación no Tradicional. Costa Rica. 46 p.

Albarran, Maria. 2008. Ajuste y validación de un procedimiento de determinación de actividad enzimática de celulasas en suelos a partir de la valoración espectrofotométrica de azúcares reductores. Universidad de los Andes, Merida Venezuela.

Álvarez, Elizabeth; Ceballos, Germán; Llanos, Germán. 2009. Actividad antagónica de bacterias biocontroladores y filtrados de *Trichoderma* spp contra *Ralstonia solanacearum* en plátano. XXIX congreso ASCOLFI, Medellín Colombia.

Álvarez G. A. 2003. Determinación de actividades de celulasa e invertasa del suelo. En: Garcia, I. C., Gil, S. F., Hernández, F. T., Trasar, T. T., Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos. Medidas de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Madrid, ES. Mundi-Prensa. 153 -160 p

Álvarez S, J.D. y R. Ferrera-Cerrato. 1994. Los microorganismos del suelo en la estructura y función de los agroecosistemas. Cuaderno de Edafología 25. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. pp. 24-31.

Anderson J. 1982. Soil respiration. En Page, A.L., Miller, R.H., Keeney. D.R (Eds). Methods of soil Analysis, part 2. Chemical and microbiological properties. 2nd. Edition. American Society of Agronomy Soil Science society of America, Madison, pp. 831-871.

Ansorena, J. 1994. Sustratos. Propiedades y Caracterización. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Ararat Orozco, Milton Cesar. 2010. Aspectos técnicos para la obtención de Plántulas de Aguacate. BIOTEC - COLCIENCIAS. ISBN: 978-958-99329-3-3

Arenas Z., Cynthia. 1998. Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad tristeza del palto causada por *Phytophthora cinnamomi* en plantas de palto cv. Mexícola cultivadas en maceta, en relación a distintos períodos de inundación del suelo. Quillota, Chile.

Arredondo Ceballos, Leidy; Restrepo Salazar, José Pablo. 2012. Producción de acondicionadores para suelos con base en residuos orgánicos sólidos mediante un proceso de compostaje. Corporación Universitaria Lasallista Facultad de Ingenierías, Antioquia

Ayala J.; Barrientos A.; Colinas M.; Sahagun J.; Reyes J. 2010. Relaciones injerto-interinjerto y características anatómicas y fisiológicas de la hoja de cuatro genotipos de aguacate. Revista Chapingo Serie Horticultura 16(2): 147-154, 2010.

Azcón-Aguilar, C., A. Barceló, M. T. Vidal, and G. de la Viña. 1992. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropopagated avocado plants. Agronomie. 12: 837-840.

Avilán Luis., Marín R., Carlos, Rodríguez Margot., Ruiz José. 1999. Efecto del patrón e injerto intermedio sobre el "tipo" del fruto de aguacate cv. Nelan, Agronomía Tropical 49(4):475-489. 1999.

Baker, R., Griffin, G., 1995. Novel approaches to integrated pest management, pp 153 – 182. In: molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens. Reuveni, R. (ed). CRC press. Boca Ratón Florida, USA

Barea, J. M. 2001. Interacciones ecológicas de los microorganismos en el suelo y sus implicaciones en agricultura. In: Labrador Moreno, J. y Altieri, M.A. Agroecología y desarrollo. Aproximación a los fundamentos agroecológicos para la gestión sustentable de agroecosistemas mediterráneos. Ediciones Mundiprensa, Cáceres, 165-184 p.

Bekker, Theo Frederik. 2007. Efficacy of water soluble silicon for control of *phytophthora cinnamomi* root rot of avocado. Faculty of Natural and Agricultural Sciences University of Pretoria

Belanger R, Dufuor N, Caron J & Benhamou N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. Biocontrol Science Technology 5: 41-54.

Benavides, Adalberto. 1998 El azufre en las plantas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Saltillo 25315 México.

Bernal E., J.A.; Díaz D., C.A. 2007. Generalidades del cultivo. En: Tecnología para el cultivo de aguacate. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Centro de Investigación La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia. Manual Técnico 5. 241p.

Bisonó, P. Sixto; Hernández, J. 2008. Guía Tecnológica Sobre El Cultivo Del Aguacate. Consejo nacional de competitividad, Republica Dominicana

Bissani, H. Bohnen., Tedesco M.J., C. Gianello, C.A. y S.J. Volkweiss. 1995. Análises de solo, plantas e outros materiais. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 174 p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

Borie y Rubio, 2003. Total and organic phosphorus in chilean volcanic soils. En: Gayana Bot. 60 (1): 69 -78.

Bolaños, M. 2006. Evaluación de actividad enzimática (deshidrogenasa, proteasa, fosfatasa y arilsulfatasa) en la rizosfera de plátano Musa AAB: relación con propiedades de un andisol. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia, Palmira. pp 230.

Bowen, G. D. and Rovira, A. D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66:1-102 p.

Bowen, P.A., Menzies, J., Ehret, D., Samuels, L. & Glass, A.D.M., 1992. Soluble silicon sprays inhibit powdery mildew development on grape leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117(6), 906-912.

Brady, Nyle And Weil, Ray. 2004. Elements Of The Nature And Properties Of Soils. Second Edition. New Jersey: Pearson-Prentice Hall. 606 P. Isbn 0-13-048038-X

Broadley, R.H. 1992. Protect your Avocados. Department of Primary Industries, Queensland. Nacional Library of Australia. Queensland Governmant. 140 págs.

Bruce, A., Srinivasan, U., Staines, H., Highley, T., 1995. Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp and their role in biocolntrol of Wood decay fungi. *Intern. Biodet & Biodeg* 23: 337-353

Burés, S. 1997. Sustratos. Ediciones Agrotecnicas S.L. Madrid, España. 342p.

Burns, R.G. (1982) Enzyme activity in soil. Some theoretical and parctical considerations. Pp. 295-340. En: Soil enzymes, Burns R.G. (Ed.), Academic Press, New York..

Cavins Todd J., Whipker Brian E., Fonteno William C., Harden Beth, McCall Ingram, and Gibson James L. 2000. Monitoring and Managing pH and EC Using the Pour Thru Extraction Method North Carolina State University Horticulture Information Leaflet 590.

Charpentier, M. 1968. Degradation de la cellulosa dans le sol. Mechamismes enzymatiques (Rapport general), annales du Institut Pasteur. 115: 487-537

Chérif, M., Asselin, A. & Bélanger, R.R., 1994. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathol.* 84(3), 236-242.

Chet I, Ibar J & Hadar I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships* (Wicklow DT & Soderstrom B, eds.). New York: Springer Verlag, pp. 165-192.

Chet I & Ibar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry & Biotechnology* 48: 37- 43.

Chuang, C.; Kuo, Y. L.; Chao, C. and Chao, W. 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biol. Fert. Soils*, 43: 575–584.

Coffey, Michael .D., 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. Cp 19, p. 423-444, *Plant Diseases o Internacional Importance. Vol III: Diseases of Fruit Crops.* Por Kumar, J. H. Chaube, U.S. Singh y A. N. Mukhopadhyay. Prentice Hall, New Jersey, pp 456.

Coffey, Michael .D. and Gabor, B.K. 1991. Comparison of rapid methods for evaluating resistance to *Phytophthora cinnamomi* in avocado rootstocks. *Plant Diseases*: 118-129.

Coffey, Michael D., 1987. *Phytophthora* root rot of avocado: An integrated approach to control in California. *Plant Dis.* 71, 1046-1052.

Colacelli, Norberto. 2001. Azufre en el suelo. Biblioteca electrónica Alsina. Librería y editorial Alsina, Buenos Aires, Argentina.

Colberg, O.; Beale, A. 1991. 4 Levels of nitrogen – fertilization in 2 onion *Allium cepa* varietis. *Journal agric. University P. R.* 75 (1): 1-10

Corporación Biotec, 2010. Informe final proyecto “Diseño de estrategias para la obtención de plántulas sanas de aguacate en condiciones de vivero”; COLCIENCIAS

Cossio, Vargas L; Salazar García S., González Durán J. L.; Medina Torres R. 2008. Fenología del aguacate ‘hass’ en el clima semicálido de Nayarit, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3): 319-324

Coyne, Mark. 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio.* Madrid: Editorial Paraninfo, 416 p.

Crozon, J. & Neyroud, J. 1990. Etude des caractéristiques physiques de quelques substrats en horticultures. *Review Suisse. Viticulture, Arboriculture, Horticulture* 22(6): 441-446.

Davies, F.S; Albrigo, L.G.1994. *Citrus.* Cab International. Wellington, United Kingdom. pp. 95-123.

Datnoff, L.E., Deren, C.W. & Snyder, G.H., 1997. Silicon fertilisation for disease management of rice in Florida. *Crop Prot.* 16(6), 525-531.

Díaz-Zorita M. (2004); Impacto De La Fertilidad Del Suelo Sobre Las Enfermedades En El Cultivo De Soja. Conicet-Fauba, Dzd Agro Y Nitragin Argentina S.A.

Dick, W.A. & M.A. Tabatabai (1993) Significance and potential uses of soil enzymes. Pp. 95-127. En: Soil Microbial Ecology. Applications in agricultural and environmental management. Blaine, F. (Ed.) Marcel Dekker, New York.

Donoso Zegers, C. (1992) Ecología forestal. Editorial Universitaria, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Downer, A. J., Menge, J. A., and Pond, E. 2001. Association of cellulytic enzyme activities in eucalyptus mulches with biological control of *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 91:847-855.

Durán Barón Ricardo; Daza Enrique; 1999. Estado Actual Del Sistema De Producción Aguacate En La Costa Caribe Colombiana. Facultad de Ingeniería. Universidad Popular del Cesar. Valledupar, Cesar. Colombia.

Echemendia Medina Yamilé, 2002. *Phytophthora*: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical.

Elad Y & Baker R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamidospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. Phytopathology 75: 1053.

Epstein, E., 2001. Silicon in plants: Facts vs. concepts. In: L.E. Datnoff, G.H. Snyder & G.H. Korndorfer (Eds.), Silicon in Agriculture, Elsevier Science B.V., pp 1-15

Eveleigh D., Demain A., Solomon N. 1986. *Trichoderma*. Biology of industrial microorganisms. Biotech Ser. (Ed). Cap.16: 489-500.

Ezziyyani Mohammed, Requena M. Emilia, Pérez-Sánchez Consuelo & Candela M. Emilia; 2004. Anales de Biología 26: 35-45, Facultad de Biología, Universidad de Murcia -España.

Ezziyyani M, Requena ME, Pérez Sánchez C, Egea Gilabert C & Candela ME. 2003. Mecanismos de biocontrol de la «tristeza» del pimiento (*Capsicum annuum* L.) por microorganismos antagonistas. Actas de la XV Reunión de la Sociedad Española & VIII Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal.

Fauteux, F., Rémus-Borel, W., Menzies, J.G. & Bélanger, R.R., 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Letters* 249, 1-6.

Fenchel T, King GM, Blackburn TH. 2000; Bacterial Biogeochemistry: The ecophysiology of Mineral Cycling. 2°ed. Academic Press, San Diego, pp. 43-59, 117-161.

Forsythe, W. 1980. Física de suelos, manual de laboratorio. Instituto interamericano de ciencias agrícolas, San José, Costa Rica.

Franco Correa, Marcela; 2009. Use of actinomycetes in processes biofertilization. *Revista Peruana de Biología*. 16(2): 239 - 242

Franco-Correa, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral, Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Universidad de Granada. pp. 266

Franco-Correa M. 1999. Aislamiento, Caracterización y Evaluación de Actinomycetes inhibidores de algunos hongos fitopatógenos. Tesis de Maestría en Microbiología, Departamento de química, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. págs. 86

Fry, William E. and Grünwald, Niklaus J. 2010. Introduction to Oomycetes. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2012-0220-01

Fry, William E., Grünwald Niklaus. J., D. E. L. Cooke, A. McLeod, G. A. Forbes, and K. Cao. 2009. Population genetics and population diversity of *Phytophthora infestans*. Pages 139-164 in K. Lamour and S. Kamoun, editors, *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tool*. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.

Fuentes R., González, J., Vílchez, Albany, N. y Molina, M. 2007. Indole-butyric acid (IBA) and substrate effect on ex vitro rooting of Aloe (*Aloe vera* (L.) Burm. f). *Rev. Fav. Agron. (LUZ)*. 24 Supl. 1: 83-88.

García, Álvaro., 2003. Tipos de suelos salino sódicos. En: Manejo integral de la fertilidad del suelo, Sociedad Colombiana de la ciencia del suelo, Bogotá Colombia; p. 88

García, Álvaro., 1997. Uso de vinazas en la recuperación de suelos sódicos. *Acta Agronómica*; Vol. 47, no. 2 Abr – Jun. 1997; p. 39 – 44.

García, C; Hernández, Trasar, C. 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos. Medidas de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Madrid, ES. Mundi-Prensa. 153 -160 p.

García, C.; Hernández, T. Costa, F. Ceccanti, B. 1994. Biochemical parameters in soils rnerated by addition of waste Management an Research 12,457-466.

García, O., Rojas, C., 2004. Posibilidades de uso de la vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos. Nota técnica Técnicaña.

Gallego, Jose Miller. 2012. Efecto de dos abonos verdes sobre la mineralización del nitrógeno y la dinámica de bacterias oxidantes del amoniaco y del nitrito en un ciclo de cultivo de maíz *Zea mays* L. Universidad nacional de Colombia, sede Palmira.

Gaspar T., Hofinger M. 1988. Auxin metabolism during adventitious rooting, pp. 117-131. In: T.D. Davis, B.E. Haissig and N. Sankhla (eds). *Adventitious Root Formation in Cuttings*. B.E. Dioscorides Press, EE. UU.

Gardiazabal, F. 1990. Variedades e implantación. pp. C1-C25. In: Undurraga, P., De Kartzow, A., Soto, H., y Feito, X. Curso internacional, Producción,

postcosecha y comercialización de paltas. 2 al 5 de Octubre de 1990. Viña del mar, Chile. Universidad Católica de Valparaíso y FAO. 262p.

Gianfrenda, L y Bollag, J. 1996. Influence of Natural and Antropogenic Factors on Enzyme Activity in soil. In: Soil Biochemistry. Volumen 9. USA. 123-193 p.

Gil M., Pilar. 2004. Manejo del Cultivo del Palto; Proyec To De Validacion Y Transferencia En Tecnologia De Riego Y Alternativas Productivas En Areas Regadas. PROVALTT, Gobierno de Chile.

Gil Sotres, F., M.C. Trasar-Cepeda, C. Ciardi & B. Ceccanti. 1992. Biochemical characterization of biological activity in very young mine soils. Biol. Fertil. Soils 13: 25-30.

Goldman, G., Hayes, C., Harman, G. 1994. Molecula and celular biology of biocontrol by Trichiderma spp. Biotech. Tibtech. 12: 478-482

Guerrero, J. C. 2012. Métodos de control de Pudrición blanda en hortalizas. Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora, México.

Handreck, K. and Black, N. 2002. Growing Media for Ornamental Plants and Turf. UNSW Press. Tercera edición. 550p. Disponible en: <http://books.google.cl/>
Leído el: 27 de Septiembre del 2006.

Hartmann, H; Kester, D And Davdes, F. 1990. Plant propagation, principios and practices. New Jersey, Prentice Hall. 647p.

Hermoso J.M., Torres M.D.y Farré J.M. 2011.Effects of Organic Materials on Adult Hass Trees. In: Proceedings VII World Avocado Congress 2011 (Actas VII Congreso Mundial del Aguacate. Cairns, Australia. 5 – 9 September.

Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, 2009; RESOLUCIÓN No. 02407 Normas en materia de producción, distribución, comercialización, importación y movilización dentro del territorio nacional de material de propagación clonal de frutales.

Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. 1993. Manual de análisis de suelos, plantas y aguas para riego. Bogotá. 236p.

Ibáñez, Juan José 2006. La Compactación del Suelo: Exploración del Suelo por las Raíces. En: <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2006/12/25/55938>
Fecha de revisión: 28 abril de 2013.

Instituto Geográfico Agustín Codazzi – IGAC. 2006. Métodos analíticos de laboratorio. Bogotá, Colombia.

Instituto Geográfico Agustín Codazzi - IGAC . 1995. Caracterización de la génesis y evolución de los suelos. Bogotá Colombia.

Jorge, Pedro E. 2000. Pudrición Radicular o Muerte Descendente (*Phytophthora cinnamomi* Rands) en plantaciones de aguacate *Persea americana* (Mill). En:

Red de Desarrollo Tecnológico de Frutales Hoja Divulgativa N°4, 2000 Santo Domingo, República Dominicana.

Jimenez, M. Auxiliadora, Asdrubal Arcia, Hernández, Alexander. Méndez, Nayleth. 2009. XXI congreso venezolano de fitopatología, Isla de Margarita, 03 al 06 de noviembre.

Joinville S., M. Revault, H. Quiquampoix, M.H. Baron. 2004. Structural Effects of Drying and Rehydration for Enzymes in Soils: Kinetics-FTIR Analysis of Chymotrypsin Adsorbed on Montmorillonite. *Journal of Colloid and Interface Science*. 273: 414–425.

Karaki y Clark (1999) Karaki D., y Clark C. 1999. Mycorrhizal influence on protein and lipid of durum wheat grown at different soil phosphorus levels. Springer-Verlag Heidelberg. 1432-1890. Estados Unidos. Volumen 9, Numero 2. Facultad de Agricultura, Universidad de Jordan. 30 de agosto de 2004.

Kuan, T. L. And Erwin, D.C. 1980. Predisposition effect of wáter saturation of soil on Phytophthora root rot of alfalfa. *Phytopatology* 70 (10): 981-986.

Lahav, E. and A. Kadman. 1980. Avocado fertilization. International Potash Institute. Bern/ Switzerland. 23 p.

Leakey R.R.B., Mesén F., Tchoundjeu Z., Longman A., Dick J., Newton A., Martin A., Grace J., Munro C., Muthoka N. 1990. Low technology techniques for the vegetative propagation of tropical trees. *Commonwealth Forestry Review* 69(3):247-257.

Lehninger, A. 1982. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York

Lopez de A, S., De Silveria, A. 2004. Biomassa e actividade microbianas do solo sob influencia de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. *Pesq. Agropec.*, Brasilia, v 39, n 12 p 1191-1198.

López-Gutiérrez, J. C., Toro M. y López-Hernández D. 2001. Micorrizas arbusculares y actividades enzimáticas en la rizósfera de *Trachypogon plumosus* Ness en tres sabanas de suelos ácidos. *Acta Biológica Venezolana*. 21:49-57

Loach K. 1988. Controlling environmental conditions to improve adventitious rooting, pp. 248-273. In: T.D. Davis, B.E. Haissig and N. Sankhla (eds). *Adventitious Root Formation in Cuttings*. BE Dioscorides Press, EE. UU.

Lockwood JL. 1986. Soilborne plant pathogens: concepts and connections. *Phytopathology* 76: 20-27.

Lovatt. C.J. 1998 Nitrogen nutrition of the 'Hass' avocado: where does all the nitrogen go? *Proc. World Avocado Congr. III*. Tel Aviv, Israel, October 22-27, 1995. pp. 152-159.

Lovatt. C.J. 1998b. Nitrogen nutrition of the 'Hass' avocado: where does all the nitrogen go? *Proc. World Avocado Congr. III*. Tel Aviv, Israel, October 22-27, 1995. pp. 152-159.

Lucas, J. A. (1991). *Phytophthora* based on a symposium held at Trinity College, Dublin, Ireland. British Mycological Society, Cambridge University Press, Cambridge, UK. ISBN 0-521-40080-5

Madigan, Michael; Martinko, John and Parker, Jack, Brock, 2003. Biología de los microorganismos. 10ª. Edición. Madrid: Pearson- Prentice Hall editores. 1011 p.

Mckean, S. 1993. Manual de análisis de suelos y tejido vegetal. Guía teórica y práctica de metodologías. Laboratorio de servicios analíticos. CIAT. 103 p.

Malagón, D. y Montenegro H. 1990. Propiedades físicas de los suelos. Instituto Geografico Agustin Codazzi. 632p IGAC. Subdirección Agrológica. Bogotá D. E

Márquez M., M. Martínez, & M. Franco. 2003. Aislamiento de *Trichoderma* sp. y actinomicetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Revista Agronomía Colombiana. XIX (1-2): 81-88

Martínez, X. 2005. Identificación de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los sustratos y su relación con el crecimiento y desarrollo de las plantas. 20p En: Seminario internacional sobre sustratos para uso en agricultura. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile.

Matare, R., and M.J. Hattingh. 1978. Effect of mycorrhizal status of avocado seedlings on root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. Plant and Soil 49:433-435.

Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press Ltd., London. 2nd. Ed. 889 p.

Masaguer, A. & Lopez-Cuadrado, M. C. 2006. Sustratos para viveros. Revista Extra, Universidad Politécnica de Madrid.

Mc neill, Ann And Unkovich, Murray. 2007. The Nitrogen Cycle In Terrestrial Ecosystems In: Marschner, P And Rengel, Z. (Editors). Soil Biology, Volume 10. Nutrient cycling in terrestrial ecosystems. Berlin: Springer-Verlag editors. p. 37–64.

Melgarejo, M. L. 2004. Protocolos para determinar actividad enzimática de suelos. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá.

Melo Hernández, Yohana Patricia. 2011. Respuesta de la Inoculación de Micorrizas en Plántulas de Aguacate *Persea Americana* Mill Variedad Hass en diferentes Sustratos. Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira.

Menge, J. A. 1999. Enviromental factors and their relationship to avocado rot root. Memorias IV congreso mudial de aguacate. Urapan, Michoacan, Mexico.

Mesen f. 1993. Vegetative propagation of Central American hardwoods. Thesis Ph.D. University of Edinburgh, Scotland. 231 p.

Messerer, M. Daniel Antonio; 1998. Sustratos Alternativos en la propagación de

Palto (*Persea americana*). Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

Mijangos, I., Pérez, R. Albizu, I., Garbisu., C. 2006 effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. *Enzyme and microbial technology Science Direct* 40 p 100-106.

Milton, Nui. 2001. Bacteria transform ammonium to nitrate in soil. *Soils are Alive Newsletter*. University of Western Australia. Vol 2, n 1

Monkiedje A., M.O. Ilori, M. Spiteller. 2002. Soil Quality Changes from the Application of the Fungicides Mefenoxam and Metalaxyl to Sandy Loam Soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 34: 1.939-1.948.

Montenegro Gomez, Sandra Patricia. 2008. Influencia de la aplicación de vinaza sobre la presencia, actividad y biomasa microbiana del suelo en el cultivo de maíz dulce (*zea mays*). Universidad nacional de Colombia sede Palmira

Montoya Barreto, S. 2008. Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifola frondosa*. Universidad nacional de Colombia sede Manizales

Morales A., Godshall M.A. y Larrahondo. J.E. 2004. Identificación de compuestos orgánicos en vinaza. 5 -10

Nannipieri, P., S. Grego & B. Ceccanti (1990) Ecological significance of the biological activity in soil. Pp. 293-355. En: *Soil Biochemistry*, Vol. 6. Bollag J-M. and G. Stotzky (Eds.), Marcel Dekker, New York.

Narvaez, M. 2008. Evaluación de actividad de fosfatasas y deshidrogenasas por efecto de la aplicación de vinazas en suelos cultivados con maíz dulce *zea mays* L. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Tesis de Maestría.

Novella, R. 2001. Participación de las micorrizas arbusculares y la fertilización nitrogenada en el crecimiento y la nutrición del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en un suelo. CU (en línea). Consultado el 12 de mar 2010. Disponible en: www.inca.edu.cu/redmicorrizasdocsposgradosresultados13.pdf.

Novo B. Microbiología del suelo y biofertilización. En: *Fundases. Memorias de la Fundación de Asesorías para el Sector Rural*. Santa fe de Bogotá: Fundases; 1993. p. 101.

Okano, Yutaka; Hristova, Krassimira R.; Leutenegger, Christian M.; Jackson, Louise E., Denison, Ford.; Gebreyesus, Binyam.; Lebauer, David and Scow, Kate. 2004. Application of Real-Time PCR To Study Effects of Ammonium on Population Size of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil En: *Applied and Environmental Microbiology* 2004, 70(2):1008. DOI

Orozco, M. B. 2009. Efecto de la micorrización en plantas de aguacate (*Persea americana* L.) durante la fase de vivero en suelos provenientes de los Llanos Orientales. Tesis Magíster Science – Área de énfasis Suelos y Aguas. Universidad Nacional de Colombia.

- Osipi, E.A.F. & J. Nakagawa. 2005. Efeito da temperatura na avaliação da qualidade fisiológica de sementes do maracujá-doce (*passiflora alata dryander*). *Rev. Bras. Frutic.* 27(1), 179-181.
- Palencia G., Gomez R., Mejia L. A., Producción y desarrollo de patrones de cacao en la zona productora de Santander y Cesar. CORPOICA, Bucaramanga Colombia.
- Papavizas G. C. & Lumsden R. D. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology* 18: 389-413.
- Pastor, J. 2000. Utilización de sustratos en vivero. Universidad de Lleida, Dpto. de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería. Madrid, España. pp. 231-235.
- Patiño T, Carlos O., 2010; Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del valle del cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia. Tesis Doctorado, Universidad Nacional de Colombia – sede Palmira.
- Pedrotff E. y J. Voltolini. 2001. Enraizamento ex vitro e aclimatização do portra-enxerto de macieira M.9. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal–SP,* 23:234– 239.
- Pegg K. G., Coates L. M., Korsten And Harding R. M. 2002. Foliar, fruit and soilborne diseases. In: *The avocado: Botany, producción and uses.* Pp 299-331. Walligton.Cabi Publishing. 432p.
- Phillips J. 1975. Apical dominance. *Annual Review of Plant Physiology* 6:341-367.
- Philippot, Laurent And Germon, J. 2005. Contribution of Bacteria to Initial Input and Cycling of Nitrogen in Soils. In: *BUSCOT François and VARMA Ajit (Editors.) Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions.* Leipzig, New Delhi: Springer-Verlag, p. 159 – 172.
- Pinzón Pinto, Ángela. 2003. Análisis e interpretación de propiedades físicas determinadas en laboratorio. En: *Manejo integral de la fertilidad del suelo,* Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, Bogotá Colombia, 1^{era} edición.
- Portilla, C., Molina, E., Cruz Florez, E., Manske, G. 1998. Mycorrhizal arbuscular colonization, phosphatase activity and root length as response to the phosphorus stress in wheat and triticali cultivated in an Andisol. *Terra* 16(1), 55-61.
- Quero, Edgar. 2008; La Biosilificación Proceso biológico fundamental en la productividad vegetal. Fecha de revisión: 28 de marzo de 2013 en: http://www.loquequero.com/portal/index.php?option=com_content&task=view&id=27&Itemid=1
- Restrepo, J., 1996. *Abonos Orgánicos Fermentados. Experiencias de Agricultores en Centroamérica y Brasil,* Cedeco- OIT (1 ed.), San José, C. R., 52 pp.
- Rheims H., C. Spróer, F.A. Rainey & E. Stackebrandt. 1999. Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the Actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology.* 142:2863-2870

- Riccardi, F., P. Gazeau, D. Vienne y M. Zivy. 1998. Protein Changes in response to progressive water deficit in maize. *Plant Physiol.* 117, 1253-1263.
- Ríos, C. Danilo; Corrales, M. Diego; Daza, G. Gerardo; Aristizábal, G. Alfonso. 2005. Aguacate variedades y patrones importantes para Colombia. Candelaria Valle. 221 p.
- Rodríguez, R., Toro, C., Martínez, M. Y Mercado, M. 2007. Estandarización de condiciones para la prueba cuantitativa del nmp con bacterias nitrificantes y denitrificantes usando como matriz compost. En: *Universitas scientiarum*. Julio-Diciembre, vol. 12. no. 2. p. 69- 81.
- Rodríguez, V., Luna, J., Valle, P. Tiscareño, M., Ruiz, A.; 2004. Caracterización patogénica y sexual de *Phytophthora capsici* Leonian y análisis de distribución espacial en el centro-norte de Mexico. En: *Revista Mexicana de Fitopatología*, enero-junio, Vol. 2, numero 001.
- Roveda, Gabriel., Polo, Cristina. 2007. Mechanisms of maize adaptation associated with *Glomus* spp in soils with low phosphorus availability. *Revista Agronomía Colombiana* 25(2), 349-356.
- Ruiz Solsol Henry; Mesén, Francisco. 2010. *Agronomía Costarricense* 34(2): 259-267. ISSN: 0377-9424
- Salazar-García, Samuel. 2002. Nutrición del aguacate, principios y aplicaciones. INPOFOS, INFAP. Querétaro, México.
- Salazar-García, Samuel; Lazcano Ferrat, Ignacio. 1999. Nutritional Diagnosis Of The 'Hass' Avocado (*Persea americana* Mill.) Under Rainfed Conditions. Nayarit, México.
- Samuels, A.L., Glass, A.D.M., Ehret, D.L. & Menzies, J.G., 1993. The effects of silicon supplementation on cucumber fruit: Changes in surface characteristics. *Ann. Bot.* 72, 433-440.
- Sánchez De Prager Marina. 2003. Actividad biológica en la rizósfera del maracuyá (*pasiflora edulis* var. *Flavicarpa*) en diferentes sistemas de manejo, estados de desarrollo y condiciones fitosanitarias. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. Tesis Doctoral. 261 P.
- Schaffer, B. and Ploetz, R.C. 1989. Net gas exchange as a damage indicator for *Phytophthora* root rot of flooded and non flooded avocado. *HortScience* 24:653-655.
- Seebold, K.W. Jr., Datnoff, L.E., Correa-Victoria, F.J., Kucharek, T.A. & Snyder, G.H., 2004. Effects of silicon and fungicides on the control of leaf and neck blast in upland rice. *Plant Dis.* 88(3), 253-258.
- Sid Ahmed A, Ezziyyani M, Pérez Sánchez C & Candela ME. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109: 418-426

Sierra Aguilar, Jaider; 2009. Alternativas de aprovechamiento de la cascarilla de arroz en Colombia. Universidad de Sucre, Facultad de Ingeniería Departamento De Ingeniería Agrícola Sincelejo

Sieverding, E. 1991. Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management. Revisión de traducción Kathryn Mulhern. Editoras Honrad Vielhauerm, Hartmut Bremen; Druckerei und Verlag, Atelier Niedernjesa. Republica Federal de Alemania. 371p.

Sanclemente, Oscar. 2009. Efecto del cultivo de cobertura: *Mucuna pruriens*, en algunas propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo *typic haplustalfs*, cultivado con maíz (*zea mays* L.) en zona de ladera del municipio de Palmira, valle. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

Siqueira, J.O. And Franco, A.A. Biotecnología do solo. Fundamentos e perspectivas. Brasilia Editora Gráfica, 1988. 235 p

Siqueira, J. O.; Moreira, F. M. de S.; Grisi, B. M.; Hungría, M.; Araújo, R. S. 1994. Microorganismos e processos biológicos do solo. Perspectiva ambiental. Brasília: Embrapa. 142p.

Schmidt, E. And Belser, L. 1994. Nitrifying bacteria. Chapter 10. In: SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA (SSSA). Methods of soil analysis: Part 2. Microbiological and biochemical properties. Soil Science Society of America book series no. 5. Madison: SSSA, p. 159 – 177.

Slowik, K., Labanauskas, C. K., Stolzy, L. H. and Zentmyer G. A. 1979. Influence of Rootstocks, Soil Oxygen, and Soil Moisture on the Uptake and Translocation of Nutrients in Young Avocado. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104(2): 172-175

Soto G., Muñoz C. 2002. Consideraciones teóricas y prácticas sobre el compost, y su empleo en la agricultura orgánica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. No. 65 p. 123 - 129 Costa Rica

Speir, T.W., Lee, E. A., Pansier, A. y Cairns, A. 1980. A Comparison of Sulphatase, Urease and Protease Activities in Planted and in Fallow Soils. En: Soil Biol. Biochem. Vol. 12. pp: 281 – 291.

Sullivan, Preston. 2003. Overview of cover crops and Green manures; Fundamentals of sustainable agriculture. National Center for Appropriate Technology. Arkansas: July, p. 1 – 16.

Swisher M.E. 1999. Manual para los estudios de campo. Mod 1. La ecología de la parcela, Universidad de la Florida, p. 29 - 31.

Sylvia, David., Harter, Peter., Fuhrmann, Jeffrey and Zuberer, David. 2005. Principles and applications of soil microbiology. 2nd Edition. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 640 p. ISBN 0-13-094117-4.

Tabatabai, M. A. 1994. Soil enzymes In: Weaver, R W., Angle, J. S., Bottonmley, D. S. (Eds), Methods of soil analysis Part 2. Microbiological and Biochemical properties Soil Science Society of America, Madison W. I. USA. 775-833.

Tabatabai, M.A. 1982. Soil Enzymes. In : Page AI, Miller R.H, Keeney DR (eds). Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties.

American Society of Agronomy, Soil Science Soc. Am, Madison, Wisconsin, pp. 903 – 947

Tabatabai M. A. and Bremner J M 1969 Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301–307.

Tate R.L. 2000. *Soil Microbiology* (second edition), Wiley, New York, pp.47-56

Taylor, J.P., B. Wilson, M.S. Mills & R.G. Burns. 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol. Biochem.* 34: 387-401

Téliz, Daniel. 2000. *El aguacate y su manejo integrado*. Primera edición. Mundi Prensa, México S.A. de CV. México, D.F. 219 Págs.

Terés V. 2001. Relación aire agua en sustratos de cultivos como base para el control de riego. *Metodología de laboratorio y modelización*. Escuela técnica superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, España. 531p.

Tokala K., C. Strap, D. Jung, et al. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*. 68:2161–2171

Trasar, C.; Gil, F.; Leirós C., 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Ediciones Mundi Prensa, España. pp 370.

Usuda H. y K. Shimogawara. 1995. Phosphate deficiency in maize. VI: Changes in the two-dimensional electrophoretic patterns of soluble proteins from second leaf blades associated with induced senescence. *Plant Cell Physiol.* 36(6), 1149-1155.

Valdés M., N. Perez, P. Estrada, et al. 2005. Non-Frankia Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 1:460 466

Valverde, A., Sarria, L., Monteagudo, J. 2007. Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz. *Scientia et Technica* Año XIII, No 37. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701.

Vargas, R. 1991. Control of *Corticium* in tomato and *Fusarium* in strawberry by antagonistic microorganisms and/or vesicular arbuscular mycorrhizae (VAM). *Agronomia Costarricense*. 15:1-6.

Vidal, M.T., C. Azcon-Aguilar, and J.M. Barea. 1992. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. *Hortscience* 27: 785-787.

Villalobos E., Umaña C., Sterling F. 1990. Determinación del contenido relativo de agua en progenies de palma aceitera (*Elaeis guineensis*), durante la época seca en quepos, Costa Rica. *Agronomia Costarricense* 14(1): 73-78.

Waissbluth R.; Valenzuela J. 2007. Determination of the minimum percentage of dry matter to authorize the harvest of hass avocado pears for export. Proceedings VI World Avocado Congress , Viña Del Mar, Chile. 12 – 16 Nov.

Wagner, H. K., 1940. The effect of silicic acid on powdery mildew infection of wheat plants. *Phytopathol. Z.*12, 427-479.

Whiley, A; Peeg, K; Saranah, J. and Forsberg, L. 1986. The control of Phytophthora root rot of avocado with fungicides and the effect of this diseases on water relations, yields and ring neck. Australian Journal of Experimental Agriculture, 26: 249-253.

Whiley, A. 1990. Nutrición-Una herramienta estratégica para lograr una alta productividad y calidad en el cultivo del palto. En: X Curso internacional, Producción, postcosecha y comercialización de paltas. 2 al 5 de Octubre, Viña del mar, Chile. Universidad Católica de Valparaíso y FAO. 262p.

Wolstenholme, B. 2002. Ecology: Climate and the edaphic environment. pp.71-99. In: Whiley, A. Schaffer, B. and Wolstenholme, B. (Ed). 2002. Avocado: Botany, production and uses. CAB International. 416 p.

Wolstenholme, B. and Whiley W. 1999. Ecophysiology of the avocado (*Persea americana* Mill.) tree as a basis for pre-harvest management. Revista Chapingo. Serie horticultura. Número Especial V: 77-88.

Wolstenholme, B. 1987. Theoretical and applied aspects of avocado yield as affected by energy budgets and carbon partitioning. South African Avocado Growers' Association Yearbook 10, 58-61.

Yedidia I, Benhamou N & Chet I. 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 65: 1061-1070.

Yoshioka, I.C., Bolaños, B. M. M.; Sánchez, M.; Melgarejo, L.M. 2005. Actividad de fosfatasas en suelo rizosférico de plátano (*Musa AAB*) estimada mediante dos metodologías. En: Resúmenes XXVI Congreso ASCOLFI. Bogotá, octubre 5 -7 de 2005. pág: 4.

Zamora, F. 2003. Identificación de indicadores de sostenibilidad en los sistemas de producción hortícola de Barrio Nuevo, municipio de Federación Estado de Falcón. Trabajo de Maestría. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro, Estado Falcón, www.ceniap.gov.ve/jornadasfalcon/zamora_f2.htm; consulta: febrero, 2008.

Zentmyer, G. A. Menge, J. & Ohr, H. 1994. Phytophthora root rot. In: Compendium of tropical fruit disease. Series of the American Phytopathological Society St. Paul, APS Press. Pp.77-79.

Zentmyer, G.A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. The American Phytopathological Society, Monograph No 10, St. Paul

9. Anexos

Anexo 1. NTC 5167, Norma Técnica Colombiana, Materiales Orgánicos Utilizados como fertilizantes acondicionadores de Suelos.

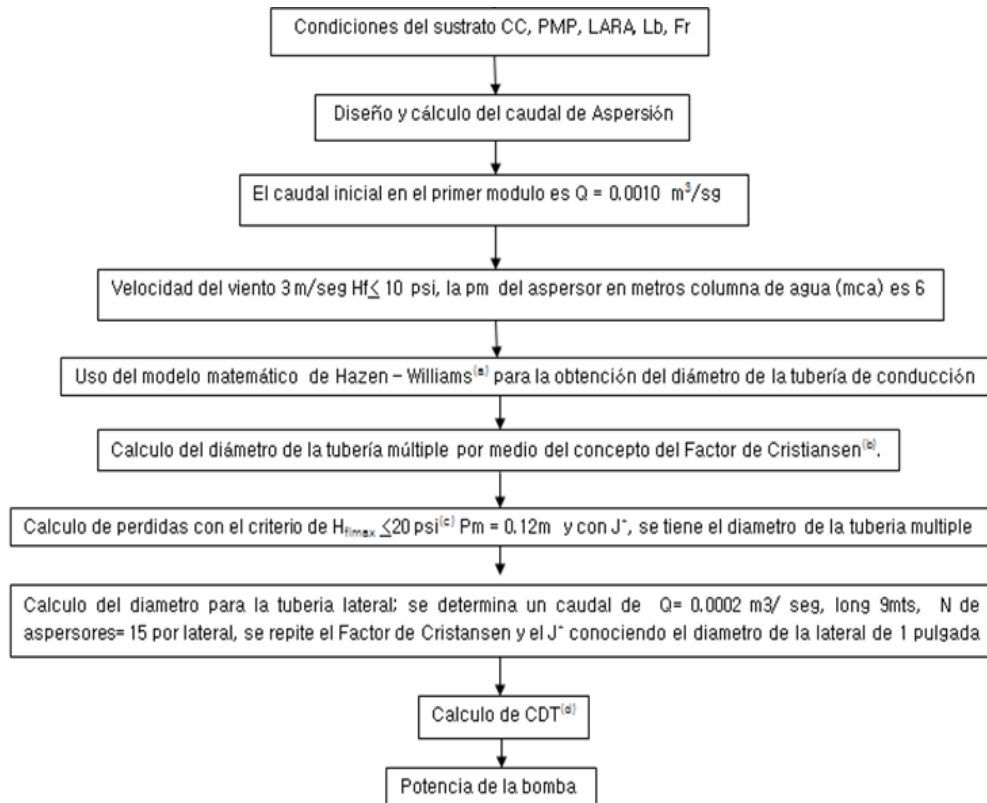
Material	Requisito específico
----------	----------------------

<p>Abono orgánico sólido: Producto sólido obtenido por mezcla o combinación de abonos minerales y orgánicos de origen animal, vegetal, pedogenético (geológico) o provenientes de lodos de tratamiento de aguas residuales, que contiene porcentajes mínimos de materia orgánica expresada como carbono orgánico oxidable total y de los parámetros que se indican.</p>	<p>pH: mayor de 4, menor de 9 Contenido de cenizas máximo 60% Humedad para materiales de origen vegetal: 35% Carbono orgánico: mínimo 15% N, P₂O₅, K₂O, CaO, MgO: mínimo 2% CIC: mínimo 30 meq./100g</p>
<p>Enmienda orgánica no humica: producto sólido obtenido a partir de la deshidratación y estabilización de los residuos provenientes de plantas industriales.</p>	<p>Si el producto se disuelve en agua, no debe desarrollar pH alcalino. Carbono orgánico oxidable: mínimo 15%. CIC: mínimo 30 meq./100g. CE declarada. Restricciones por sodio (Na) soluble.</p>

Anexo 1.1 Requisitos establecidos por el ICA (2009) para la selección de semillas para portainjerto de aguacate:

- Las semillas para portainjerto deben provenir del huerto básico de un vivero registrado para la producción y distribución de semillas para patronaje.
- La planta madre debe estar lo suficientemente adaptada a la zona del cultivo.
- Las semillas deben provenir de frutos maduros y sanos, y no de aquellos en estado dudoso o recogidos del suelo, evitándose que el fruto este en contacto con el mismo en las ramas bajas.
- Los frutos no se deben dejar sobre madurar en el árbol, para evitar que las semillas estén pre germinadas o deterioradas por problemas fitosanitarios.
- Las semillas pequeñas serán eliminadas por su poca vigorosidad; las de mayor tamaño garantizan un crecimiento más acelerado que les permite además evitar las posibles infecciones.
- Las semillas deben estar totalmente libres de plagas y enfermedades. Es importante que en la selección de la planta madre, esta sea resistente a la pudrición de raíces.
- Las semillas deben tener el tamaño, la forma, el color y el peso que cumplan con los estándares de calidad de un buen patrón, tales como semilla sana, rusticidad, adaptación, y resistencia a problemas bióticos y abióticos.
- La semilla debe tener una consistencia dura.
- Al realizar el corte del ápice, no se deben encontrar manchas, puntos o irregularidades en el color.
- La base de la semilla no debe presentar manchones ni puntos.
- La semilla no debe presentar signos por ataque de pasador del fruto y semillas, *Heilipus lauri* Boheman.
- Las semillas deben someterse a procesos de desinfestación previo a la siembra.

Anexo 2. Estructura Metodológica para el diseño de un sistema de riego para Plántulas de Aguacate en condiciones de Vivero



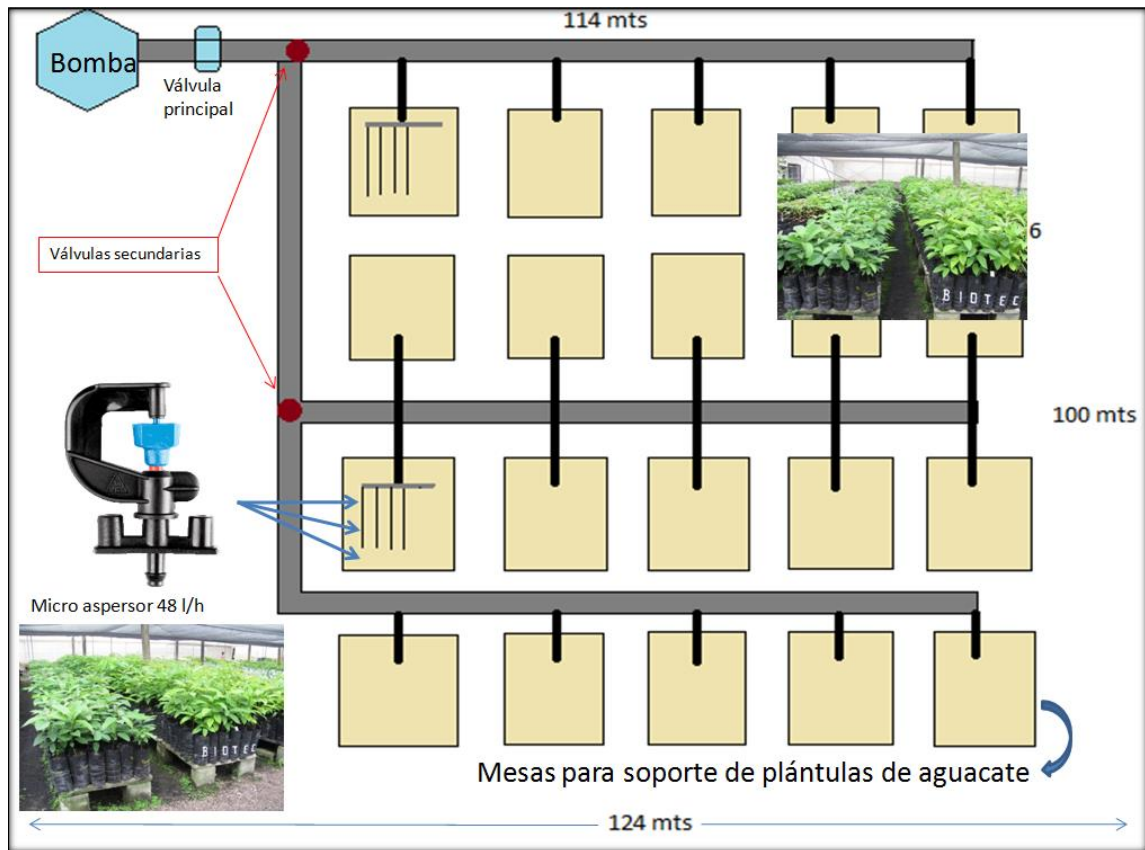
(a)Hazen-Williams $Q = 0.2788 CD^{2.63} J^{0.54}$; donde C es el coeficiente de pérdida para el pvc es de 150 para 6 mts siendo el gradiente de pérdidas J^* .

(b)Factor Cristiansen $F = \frac{1}{m+1} + \frac{1}{2+n} + \frac{(m-1)^{0.5}}{6+n^2}$

(c) $H_{fmax} = H_f * F$; H_{fmax} = Pérdidas de la tubería múltiple y F: Factor de Ajuste.

(d)CDT = Carga Dinámica Total, es la sumatoria de energías, presión que se necesita para mover un caudal.

Anexo 2.1 Diseño de riego por micro aspersión para el uso efectivo del agua en plántulas de aguacate



Anexo 3. Determinación de la presencia de bacterias oxidantes de amonio y nitrito:

En el procedimiento original se substituyó cloruro de calcio di hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) por 0.5 gramos de carbonato de calcio (CaCO_3). Teniendo en cuenta antes de la preparación del caldo nitrito la unión del carbonato de calcio y sulfato de magnesio, los cuales se auto clavaron e incorporaron al resto de la preparación de la solución al momento de inocular. Se realizaron diluciones sucesivas de 10^{-1} hasta 10^{-5} , partiendo de licuar 10 gramos de sustrato bien molido en 95 ml de solución buffer fosfato, siendo esta 10^{-1} , luego se tomaron 10 mililitros de esta y se agregan a 90 ml de buffer fosfato para obtener la solución 10^{-2} , este procedimiento se realizó hasta llegar a 10^{-5} . Se procedió a realizar la inoculación en tubos de ensayo estériles (121°C durante 25 minutos) con 4 ml de caldo amonio para bacterias amonificantes y caldo nitrito para bacterias nitrificantes y se almacenaron en incubadora estéril a 28°C por un periodo de 15 días (Rodríguez y Moreno *et. Al.* 2007).

Pasado el periodo mínimo de incubación se efectuó la identificación de bacterias nitrificantes por medio de pruebas bioquímicas utilizando el reactivo de Griess – Llosvay modificado.

Anexo 4. Procedimiento para la determinación de Actividad enzimática de celulasas:

La metodología inició con la obtención de un tampón fosfato, pH 5,5 de la siguiente manera: se preparó una disolución de fosfato sódico monobásico 0,2 M (24 g de NaH_2PO_4 anhidro en 1000 ml de agua destilada y una disolución de fosfato sódico dibásico 0.2 M (28,4 g de Na_2HPO_4 anhidro en 1000 ml de agua destilada). Se mezclaron 239,25 ml de la primera disolución y 10,5 ml de la segunda, completando con agua destilada hasta llegar a un volumen total de 500 ml. El pH se ajustó a 5,5 añadiendo ácido fosfórico diluido o hidroxidasódico diluido, según sea necesario. Finalmente se añadió timerosal (mertiolato sódico) a una concentración del 0,1 % p:v que se utilizó para impedir la proliferación microbiana en el periodo de incubación. Este derivado mercurial usado como antiséptico, ha sido utilizado con buenos resultados en la determinación de la actividad enzimática de varias glucidasas (Kong y Dommergues, 1972). Se almacenó el tampón en nevera a 4 °C.

Por otro lado, se preparó Carboximetil-celulosa (CMC) al 0.2 % (1 g de carboximetil celulosa (sal sódica) disuelto en 500 ml de disolución tampón fosfato. Conviene preparar la disolución tampón al comienzo del ensayo. Posterior a esto, se dispone el Reactivo alcalino de Somogyi con los siguientes pasos:

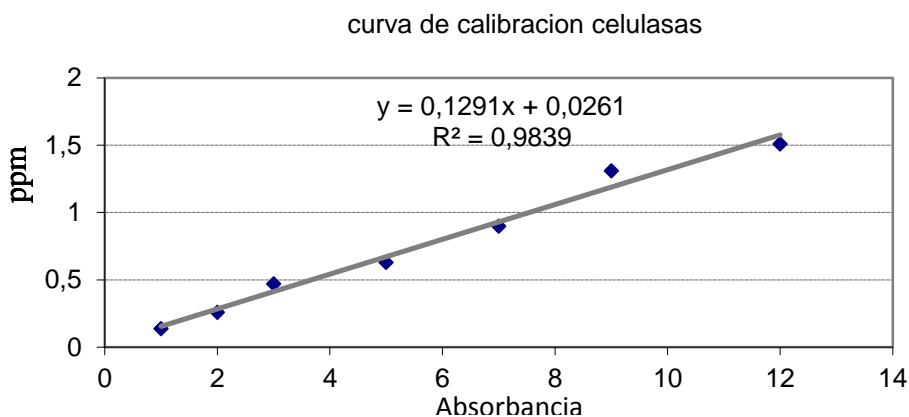
1. Disolver en 250 ml de agua destilada 24 g de Na_2CO_3 y 12 g de tartrato sódico potásico (sal de Rochelle) en un vaso de precipitados.
2. Disolver 4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 40 ml de agua destilada. Esta solución se añadió a la anterior, manteniendo durante el proceso una agitación constante.
3. A la mezcla resultante anterior se le añadieron lentamente 16 g de NaHCO_3 .
4. Disolver 180 g de Na_2SO_4 anhidro en 500 ml de agua caliente, hirviendo la solución durante unos minutos para desgasificar. Una vez fría se añade esta solución a la mezcla que hemos obtenido anteriormente y se deposita en un matraz aforado, completando con agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml.
5. El preparado se dejó en una estufa en total oscuridad a 30 °C durante una semana. Una vez transcurrido ese tiempo se filtra, recogiendo el filtrado en un frasco de topacio. El reactivo se almacena a temperatura ambiente, pero siempre en un lugar oscuro y seco. En esas condiciones permanece estable durante mucho tiempo.

El reactivo de Nelson tuvo en cuenta los siguientes pasos:

1. Disolver 25 g de molibdato amónico tetrahidrato en 450 ml de agua destilada en un vaso de precipitados.
 2. A la disolución anterior se le añaden 21 ml de H_2SO_4 concentrado, manteniendo una agitación constante con una varilla de vidrio.
 3. Se disuelven 3 g de hidrogeno arseniato disódico (AsO_4HNa_2) 25 ml de agua destilada. Esta disolución se mezcla con la anterior y se guarda en estufa a 37 °C durante 24 horas. Finalizado ese tiempo se guarda el reactivo en un frasco de topacio y se almacena en un lugar seco y en oscuridad a temperatura ambiente.
- Disolución patrón de glucosa (1 mM): Se disuelven en agua destilada 18 mg de glucosa anhidra en un matraz aforado y se lleva la disolución hasta un volumen final de 100 ml. Este patrón debe conservarse en nevera a 4 °C. Finalmente en el procedimiento se pesaron 5 g de sustrato de la muestra recién recogida y pasada por un tamiz de 2 mm de malla e introducirlos en un matraz Erlenmeyer (preferentemente de 250 ml), añadiendo a continuación 10 ml de la disolución de carboximetilcelulosa (CMC), procurando que la disolución bañe completamente toda la muestra de sustrato. Por cada muestra se realizan tres repeticiones, además de un testigo en el que en lugar de la disolución de

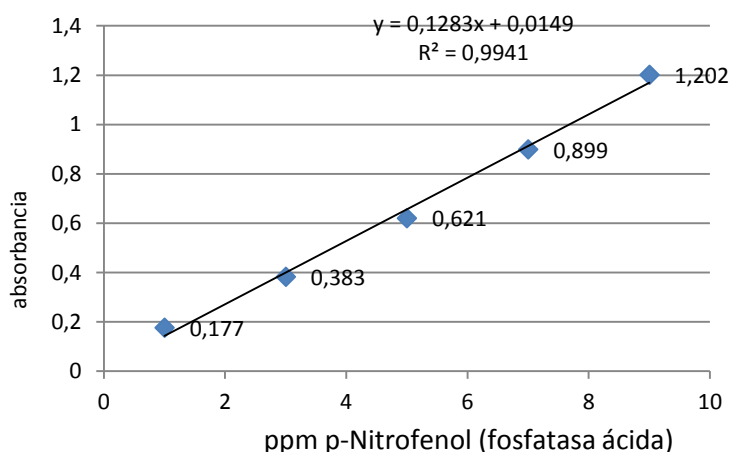
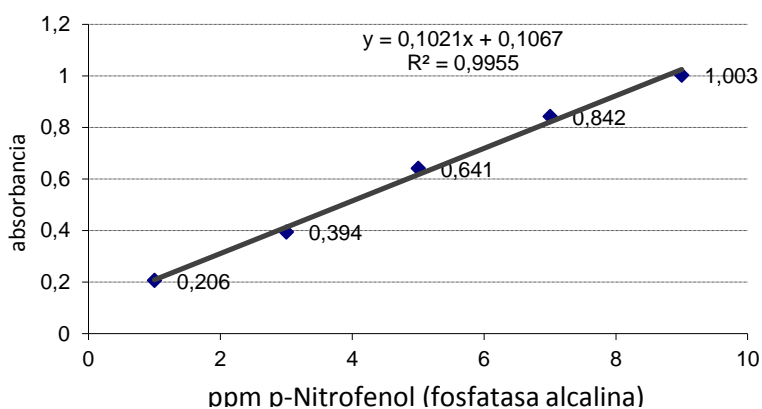
incubación de CMC se le añaden 10 ml de la solución de lampón fosfato. Los tubos de ensayo se tapan y se incuban durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación se procede al filtrado de la suspensión de la muestra, añadiendo 20 ml de agua destilada en dos veces sucesivas (10+10) y lavando completamente las paredes internas del tubo de ensayo. El líquido filtrado se recoge en tubos de ensayo de tamaño adecuado. Finalmente se procede a la determinación de los azúcares reductores que se han producido durante el proceso de incubación. El filtrado puede guardarse en nevera si la determinación no puede realizarse en ese momento (a 4 °C si se va a realizar dentro de las 24 horas siguientes, o a -20 °C si se va a demorar algunos días más).

De cada uno de los tubos de ensayo que corresponden a las muestras de sustrato incubadas, así como a los testigos, se toma 1 ml del líquido filtrado y se deposita en un tubo de ensayo graduado. Se añade a continuación 1 ml del reactivo alcalino de Somogyi, se agita la mezcla y se calienta seguidamente en baño termostático a 100 °C durante 15 minutos. Se enfrían los tubos en un recipiente con agua que contenga hielo y, una vez fríos, se añade 1 ml de reactivo Nelson a cada tubo. Se agita la mezcla y se deja reposar durante 2 ó 3 minutos. Después se completa con agua destilada hasta un volumen final de 15 ml, desarrollándose el color azul que permanece estable durante al menos dos horas. Se procede a la lectura en un espectrofotómetro UV/V o en un colorímetro a 540 nm. En el momento de la determinación de azúcares reductores se prepara también la curva patrón de glucosa a partir de la solución patrón almacenado. Los puntos de la curva se establecen de la siguiente manera: Para la determinación de la densidad óptica de las distintas concentraciones de la curva patrón, se procede con el mismo método indicado para las muestras (adición del reactivo de Somogyi, calentamiento, adición del reactivo de Nelson). Cuando se obtuvo la curva patrón glucosa, se midieron las concentraciones de glucosa de las muestras analizadas:

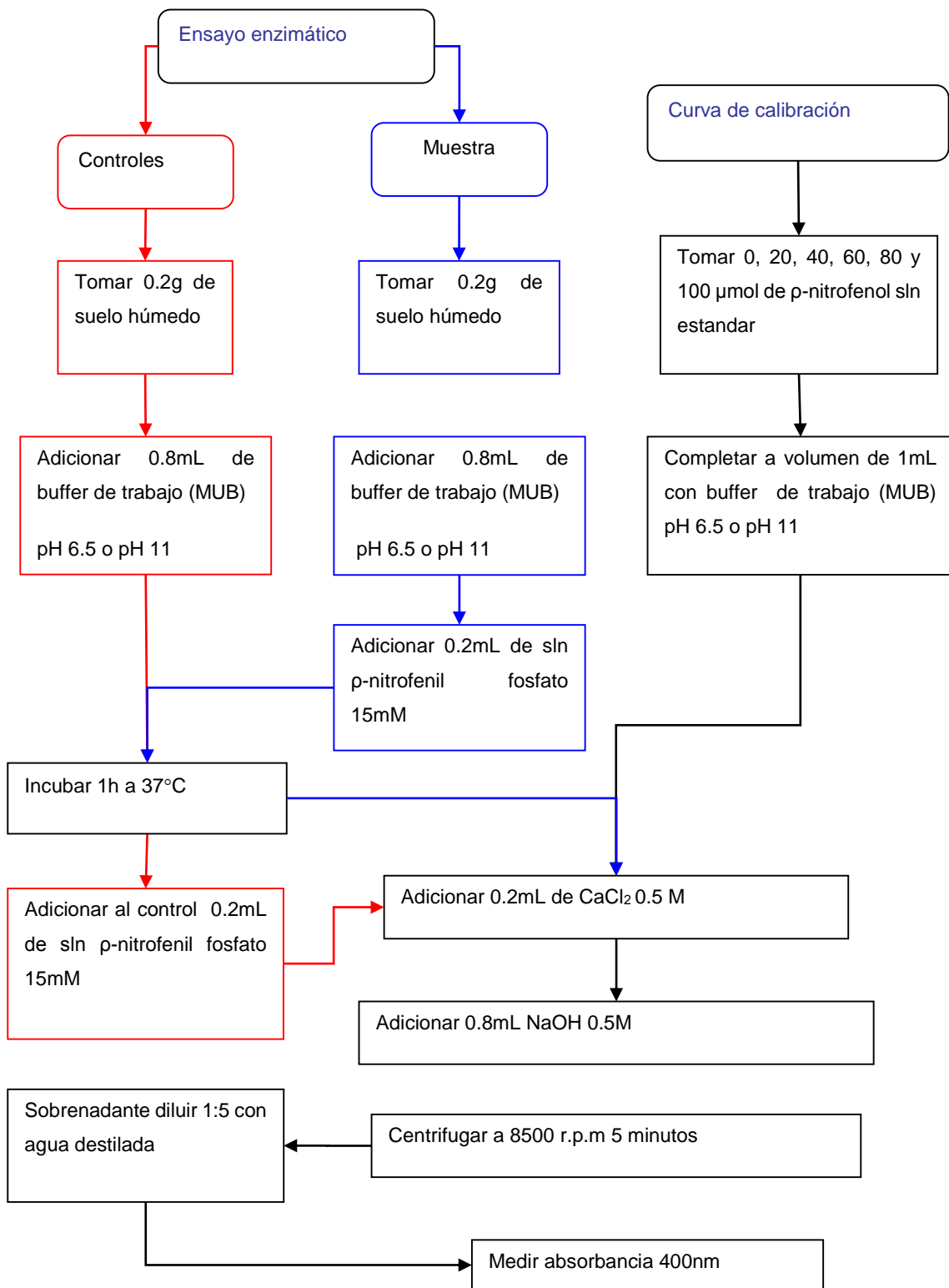


Anexo 5. Determinación de Actividad enzimática de Fosfatasas

La automatización se realizó interpolando en la curva de calibración (absorbancia vs concentración) cuyo modelo corresponde a una ecuación lineal que permite establecer el contenido de p-nitrofenol en las muestras. Para obtener μ moles P-nitrofenol se requirió pesar una muestra de sustrato húmedo equivalente a 0.5 g de sustrato seco, determinado a partir del % humedad calculado previamente) se agregó el tampón correspondiente para cada fosfatasa y el sustrato, se incubó en un baño de María a 37 oC por una hora. Por triplicado se hicieron las estimaciones y se les restó el valor de una muestra control (posibles trazas de P-nitrofenol presente en la preparación comercial del p_nitrofenil fosfato y del color debido a compuestos orgánicos que se puede extraer con el NaOH. De esta manera las unidades de medida de las fosfatasas ácida y alcalina son: μ mol P-nitrofenol por gramo de sustrato seco a la estufa por una hora a 37oC. (Basado en la metodología de Trasar *et al.*, 2003, Yoshioka, 2005 y Bolaños 2006).



Continuación anexo 5. Diagrama general de los procesos de fosfatasas realizados en el laboratorio:



Anexo 6. Ficha tecnica del producto comercial Sulfato de Amonio (SA):

NOMBRE COMERCIAL: Sulfato de Amonio

SINÓNIMOS: Sulfato de amonio (2:1), sulfato di amónico, sal di amónico
FORMULA QUÍMICA: (NH₄)₂SO₄
PESO MOLECULAR: 132,14 g/mol
PUNTO DE EBULLICIÓN [°C]: N.A
pH : 5,5 (0,1 M de solución acuosa)
DENSIDAD: 1,769 g / cm³ (20 ° C)
SOLUBILIDAD EN AGUA: 70.6 g/100 mL (0 °C) 70,6 g/100 ml (0 ° C)
 74.4 g/100 mL (20 °C) 74,4 g/100 ml (20 ° C)
 103.8 g/100 mL (100 °C) 103,8 g/100 ml (100 ° C)
Peso Molecular: 132,14 g/mol
Estado físico a 20°C: Sólido
Color: Gránulos finos, blancos o cristales.
Olor: Ligero olor a amoníaco.
Punto de fusión [°C]: 235-280 ° C
Uso: Fertilizante
IDENTIFICACIÓN: Solución incolora de SA en agua. Cuando se disuelve en el agua, genera una reacción ácida y es fuertemente corrosivo. Reacciona con bases fuertes con emisión de vapores de amoníaco. Ataca muchos metales.
PRODUCTOS DE DESCOMPOSICIÓN: Puede emitir amoníaco, óxidos de azufre, óxidos de nitrógeno y óxidos de carbono.
INCOMPATIBILIDADES: Hipoclorito de sodio, potasio + nitrato de amonio, clorato de potasio, polvo de sodio-potasio + nitrato de amonio y otros oxidantes fuertes.
INFORMACIÓN SOBRE EFECTOS ECOLÓGICOS:
 No persistente para una Toxicidad Ambiental. No acumulativo cuando se utilizan prácticas normales de agricultura para su aplicación. El producto por sí mismo y los productos de su descomposición no son perjudiciales bajo condiciones normales de cuidado y uso responsable.

Anexo 7. Características de la vinaza

Compuesto	Concentración (%)
Sólidos totales (mg/litro)	214.7
Materia Orgánica	8.10
Carbono Orgánico	4.69
Nitrógeno	0.30
P ₂ O ₅	0.06
K ₂ O	1.79
CaO	0.39
MgO	0.32
SO ₄	0.55
°Brix	20
Densidad (kg/m ³)	1084
pH	4.3 – 4.9
Conductividad Eléctrica (ds/m)	21.47

Fuente: Laboratorio de campo Ingenio Providencia S.A. 2011

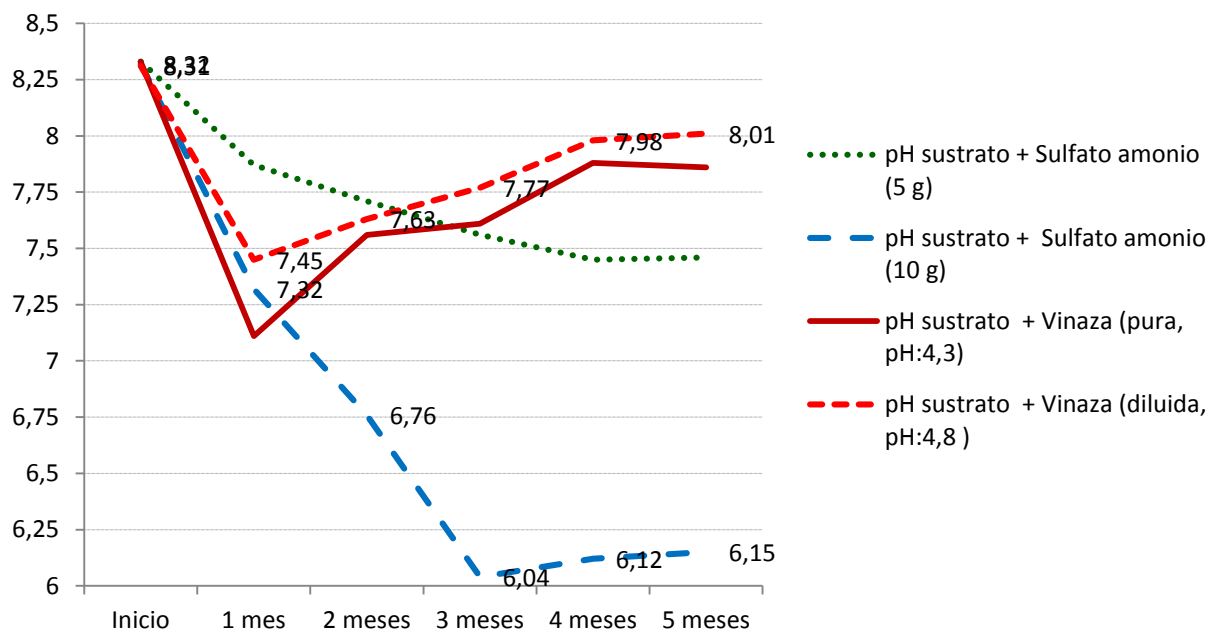
Continuación anexo 7.

Compuestos orgánicos de la Vinaza

COMPUESTO	CONCENTRACION (%m/m)
2,3 Butanodiol	0.01
2- metil-1,3-butanodiol	0.20
Glicerol	2.70
Sorbitol	1.40
Ácido láctico	1.30
Ácido Succinico	0.07
Ácido málico	0.23
Ácido Aspartico	0.05
Ácido Aconitico	1.80
Ácido Cítrico	0.80
Ácido Quínico	0.70
β-Fructofuranosa	0.50
α-glucopiranososa	0.30
Sacarosa	0.20
Trehalosa	0.30

Fuente: Morales A. *et al.* 2004.

Anexo 8. Variación en el tiempo del pH del sustrato por la aplicación de sulfato de amonio y vinazas.



Anexo 9. Determinación del pH en sustratos despues de la aplicación de sulfato de amonio y vinazas

	Inicio	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses
pH sustrato + Sulfato amonio (5 g)	8,33	7,87	7,71	7,56	7,45	7,46

pH sustrato + Sulfato amonio (10 g)	8,32	7,32	6,76	6,04	6,12	6,15
pH sustrato + Vinaza (pura, pH:4,3)	8,33	7,11	7,56	7,61	7,88	7,86
pH sustrato + Vinaza (diluida, pH:4,8)	8,31	7,45	7,63	7,77	7,98	8,01

Anexo 10. Ficha tecnica del producto comercial con silicato de potasio “Silikum”:

INGREDIENTE ACTIVO : Silicio, potasio y ácidos poli carboxílicos

NOMBRE QUÍMICO : Ortosilicato de potasio

CONCENTRACIÓN : Potasio* (K_2O) soluble en agua 155,0 g/L; Silicio* soluble (SiO_2) 344,0 g/L. (* Complejado con sustancias húmicas).

MODO ACCIÓN : Absorción foliar y radicular principalmente.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS:

SILIKUM Fertilizante orgánico mineral para aplicación foliar o edáfica, liquido concentrado 100% soluble y disponible. Mejorador Condiciones Físicas, Químicas Y Biológicas Del Suelo.

Fuente de silicio, potasio y ácidos húmicos; Interviene en la constitución de granos, mejorando la producción; Aumentando el periodo de vida post-cosecha; Aumenta los grados BRIX de los frutos. Aumenta el aprovechamiento de hora luz; Proporciona resistencia a la planta contra patógenos, insectos y ácaros; Disminuye la evapotranspiración de la planta; Incrementa la capacidad de intercambio en el suelo; Optimiza la eficiencia del fosforo en el suelo; Decrece la toxicidad por aluminio; Evita la esterilidad en gramíneas.

INSTRUCCIONES DE USO:

Aplicar 1 l / 200 Litros de agua.

Dosis: 1-3 litros / hectárea.

COMPATIBILIDAD: Es compatible con la mayoría de los productos fitosanitarios.

Puede ser aplicado en mezcla conjuntamente con el fertilizante de fondo. Sin embargo en caso de duda se recomienda realizar pequeñas pruebas a nivel de campo.

FITOTOXICIDAD: No presenta si se aplica según recomendación de la etiqueta.

Anexo 11. Ficha tecnica de la auxina - producto comercial “RADIX/AIB 35% TB”:

CARACTERISTICAS DEL INGREDIENTE ACTIVO:

Nombre del Producto: Ácido Indol3Butírico

Nombre Químico: Ácido 1hIndol3Butanóico.

Nombres Comerciales/Sinónimos: Ácido Indol3butírico, IBA, AIB, ácido indolbutírico, ácido 3indolbutírico, ácido 3 Indolylgammabutírico.
Familia Química: Indol derivados, aminoácidos, heterocíclicos aromáticos (reguladores de crecimiento vegetal).
Fórmula Molecular: C₁₂H₁₃NO₂
Peso Molecular: 203.23
Porcentaje: 35 % pureza mínima.
Inerte: 65 % máximo.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS:

Descripción: Tabletas.

Color: Crema a café.

Olor: Característico.

Punto de Ebullición: No aplicable

Punto de Fusión : 124 grados centígrados (AIB)..

Gravedad Específica: tabletas de 8.6 y 51.5 gramos al envasar.

Solubilidad en Agua: Soluble.

Solubilidad en Solventes: Insoluble.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS: El ácido indol3butírico es un regulador de crecimiento, una auxina presente en la naturaleza (p. ej. Arabidopsis Thaliana, y Salix), que regula la iniciación y el crecimiento de las raíces adventicias, modificando la arquitectura del sistema radical de las plantas. El ácido indol3butírico puede ser absorbido por cualquier parte de las plantas. Actúa por si mismo y a través de su transformación en ácido indol-3-acético, que también regula el crecimiento de las raíces. El ingrediente activo de RADIX/AIB 35% TB, es el ácido indol3butírico, un inductor del desarrollo de las raíces en plantas, en presentación en tabletas solubles en agua. Se utiliza para la propagación de vegetales por enraizado de esquejes y acodos, esquejes de Piña, Caña De Azúcar Y Plantas Ornamentales Y Frutales, para el trasplante de hortalizas como, Melón Sandía, Tomate, Chile, árboles, arbustos y plántulas, y para mejorar y regenerar el Sistema radical de múltiples vegetales como: Arroz, Caña de Azúcar, Hortalizas, césped, pastos, frutales y ornamentales, en el campo de cultivo.

Anexo 12. Determinación de Actividad microbiana (Respirometría)

La actividad biológica del sustrato, se estimó mediante respirometría (C-CO₂) a través del método de campo propuesto por (Anderson, 1982), en donde el CO₂ desprendido por unidad de tiempo, es atrapado por una disolución alcalina, mediante los siguientes pasos:

Se adicionaron 30 mL de una disolución de NaOH 0.2M, en un recipiente de vidrio. Se colocó el recipiente sobre el suelo en campo y posteriormente se cubre con una cámara de respiración presionando los bordes hasta ser introducidos en el suelo unos 2 cm. Se dejó el sistema por 24 horas.

Se establecieron tres sistemas idénticos en laboratorio como testigos, sobre una superficie inerte. Se adicionan dos gotas de BaCl₂ al 10%, para precipitar el CO₂ como BaCO₃. Se adicionan dos gotas de Fenolftaleína al 1% en solución alcohólica. Se titularon las muestras con HCl 0.2M, para estimar la cantidad de CO₂ que no reaccionó.

La cantidad de carbono que emitió el suelo en forma de CO₂ se estimó mediante la ecuación:

$$\frac{kg \text{ C} - \text{CO}_2}{ha \cdot dia} = \frac{(ml \text{ HCl } testigo - ml \text{ HCl } muestra)(M) * 6 * 10^2}{\left[(\pi * r_2^2) - (\pi * r_1^2) \right] \cdot dia}$$

Dónde:

HCl muestra: ml de HCl utilizados para titular la muestra

HCl testigo: ml de HCl utilizados para titular testigos

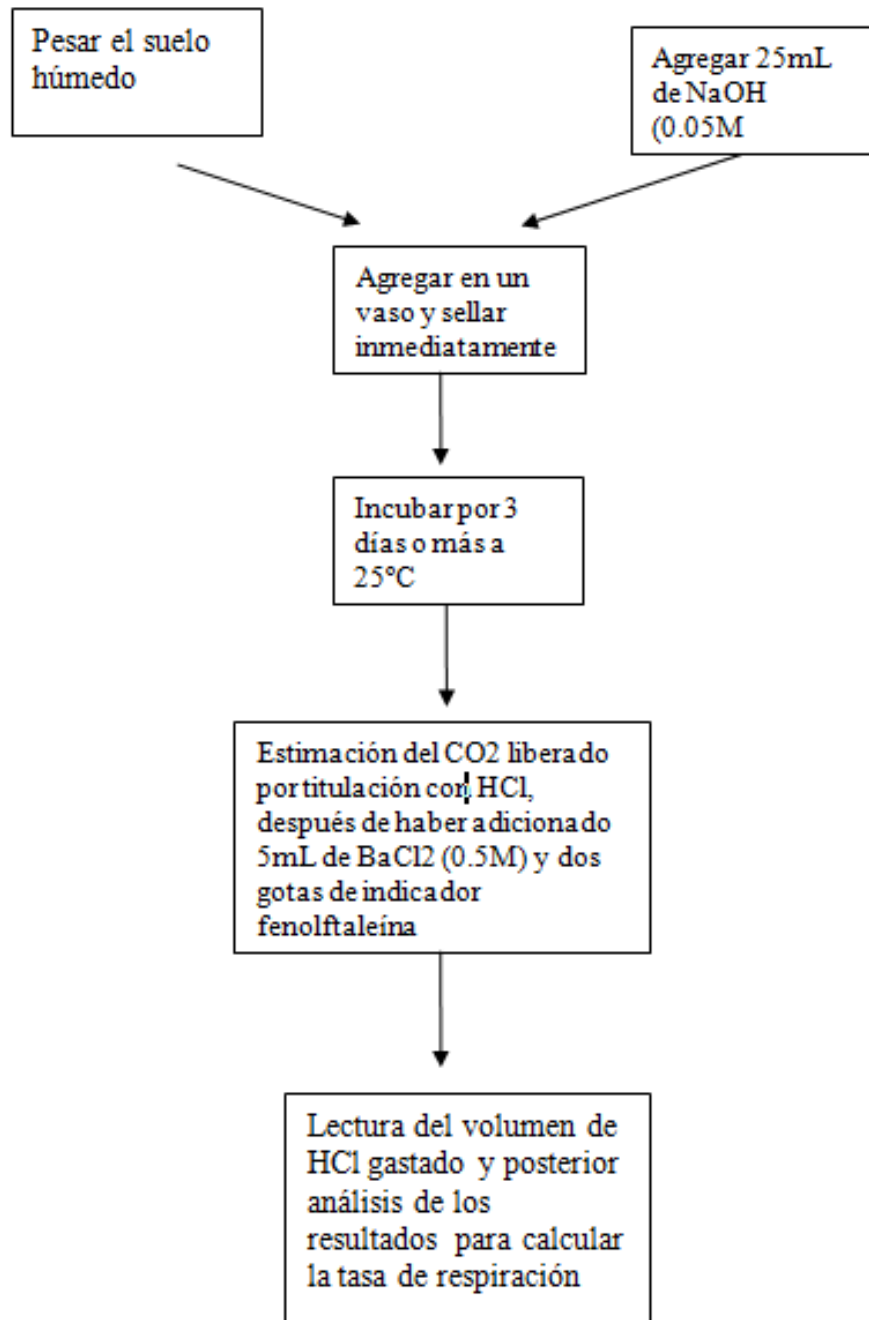
M: Molaridad NaOH y HCl

6: peso mili equivalente de carbono = 6mg/meq

r1: radio de la boca del recipiente de vidrio (cm)

r2: radio de la boca de la cámara de respiración (cm)

Continuación anexo 12: Figura que ilustra el procedimiento general para la determinación de la actividad microbiana (respirometría) en sustratos de enraizamiento.



Anexo 13. Determinación de la colonización de micorrizas en plantulas de aguacate:

Después de teñir las raíces las raíces fueron transferidas a tubos de ensayo y cubiertas con una solución de KOH al 10% completamente cubiertas para una aclaración homogénea y así liberar los residuos del sustrato que no se han

podido eliminar de la primera lavada y la liberación de taninos que le facilitara al momento de hacer la lectura a nivel de microscopio.

Previamente se calientan las raíces en baño de maría a 90°C o una olla con agua hasta el punto de ebullición. Los tubos se sometieron a esta temperatura por un intervalo de tiempo de tiempo de 5 min, para realizar un trabajo eficiente debe de evitar periodos cortos de tiempo, bajas temperaturas y exceso de raíces en los tubos de ensayo esto puede provocar una deficiencia de aclaramiento y también debe evitar exceso de tiempo porque daña el tejido radical. Después de haberle agregado KOH al 10% se lavaron con abundante agua para poder eliminar los restos de KOH en las raíces.

Para continuar con el proceso de blanqueamiento y acidificación de las raíces, las muestras se cubrieron con HCl al 10% y siempre en un baño de María o una olla con agua hasta el punto de ebullición por un periodo de 3 min.

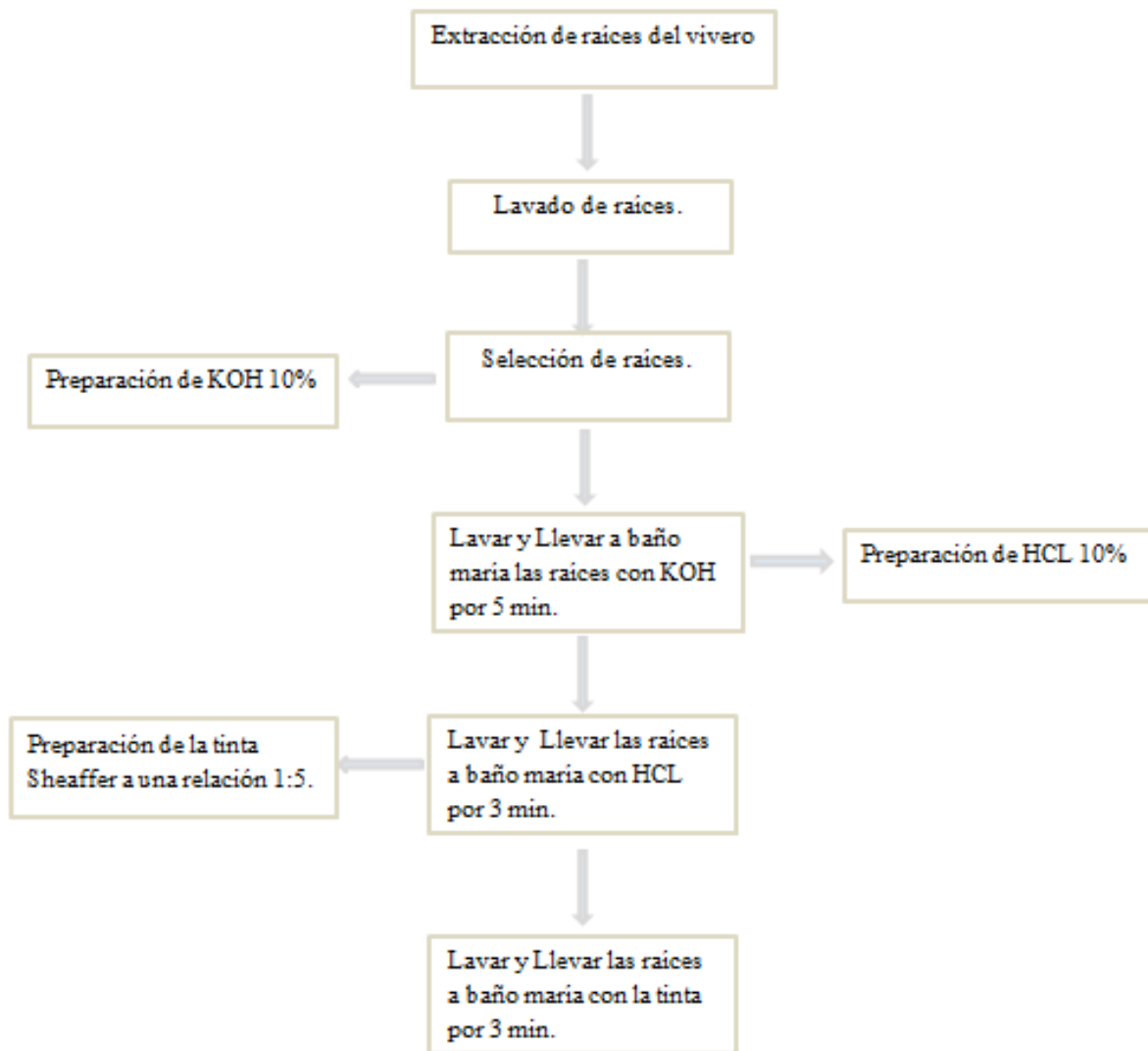
Después se lavaron con abundante agua destiladas para la eliminación de HCl en las raíces. Se inició el proceso de tinción con tinta (Sheaffer) a una proporción de 1:5 de ácido clorhídrico, las raíces se volvieron a cubrir completamente con tinta (Sheaffer) color azul completamente para lograr una tinción total y homogénea de todas las raíces por un periodo de tiempo de tres minutos. Después de haber pasado el proceso de tinción se almacenan las raíces con la solución glicerina al 50%.

Las raíces se llevaron a una placa Petri que facilita el manejo de las raíces. Antes de que estas sean montadas en los porta objetos es recomendable verlas en un estereoscopio para poder seleccionar las raíces.

Se seleccionó alrededor de 10 raíces aproximadamente de 1 cm de longitud por cada placa y una de la más delgada y cubrirla con una solución de glicerina al 50% para evitar que las raíces se sequen y poder perder la visibilidad al momento de leerlo en el microscopio o sellar las placas con esmalte para poder evitar dicho problema.

En el microscopio se cuantificó las cantidades de estructuras que presenta cada una de las raíces, tomando como positivo cuando se encontraron estructuras como: vesículas, hifas, arbusculos y esporas dentro de un campo. Cada campo se determinó por el espacio que cubre el lente del microscopio en la raíz a una resolución de 4X, cuando no se encuentra cualquier estructura se contabilizó como negativo.

Continuación anexo 13. Figura que ilustra el Procedimiento general para la determinación del porcentaje de colonización de micorrizas.



Anexo 14. Especificaciones técnicas del medidor de Área Foliar CI-202

El Medidor Láser Portátil de Área Foliar CI-202 utilizado para medir el área de las hojas (o las áreas de objetos como hojas). Contiene escáner de alta resolución con su registrador de datos; Para medir una hoja, simplemente se levanta la película protectora de la platina, se coloca la hoja dentro de la funda

protectora, y se desliza el escáner. Se registra los resultados inmediatos del área de la hoja, de su longitud, su anchura, su perímetro, radio, y medición del factor de su forma. Las mediciones no destructivas pueden hacerse mientras la hoja está unida a la planta. Cada vez que la unidad detecta que el escáner ha avanzado 1mm, el procesador revisará si la lectura del ancho es distinta a cero. Si la medición es diferente a cero, el procesador toma las siguientes acciones:

La longitud de la medición se incrementa por 1 mm.

El ancho de la medición se agrega al acumulador de área

Si la medición de ancho es mayor a la máxima almacenada, el máximo es actualizado.

Peso: 1.8Kg

Grosor de Medición: 15mm max

Ancho de Medición: 150mm max

Longitud de Medición: 36cm

Escáner: Diodo Láser de 675nm

Resolución: 0.025mm²

Precisión: ±1% para muestras >10cm²

Interface: USB 2.0

Tamaño de la Memoria: 8,000 mediciones

Pantalla: LCD de 16 caracteres x 2 renglones

Velocidad de Escaneo: 127mm/s

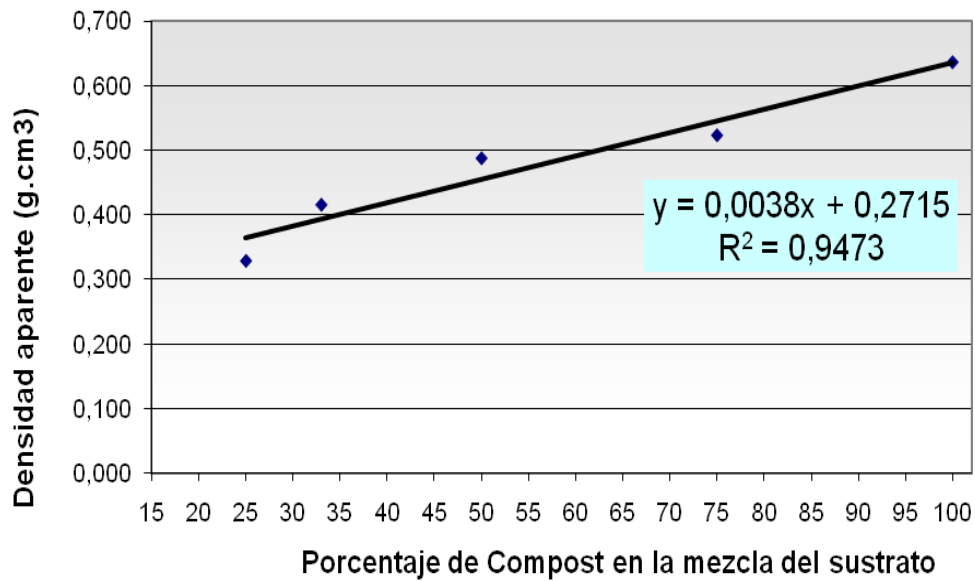
Batería: 7.2V recargable NiMH

Duración de la Batería: 15h

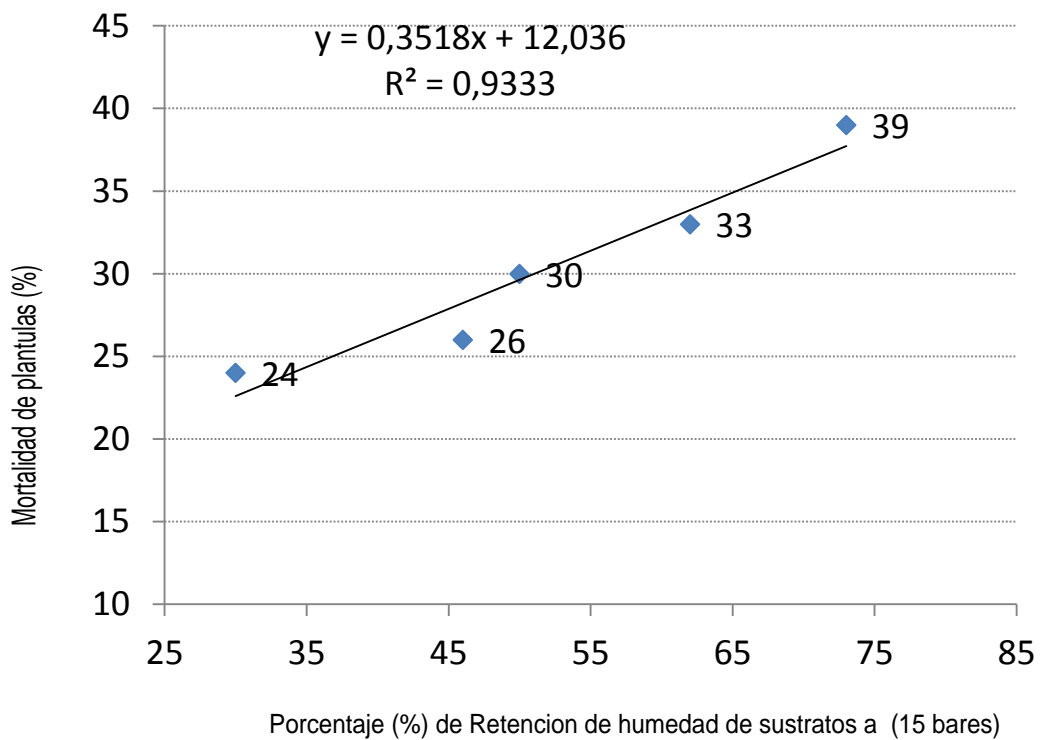
Temperatura de Operación: 0 -50°C

.

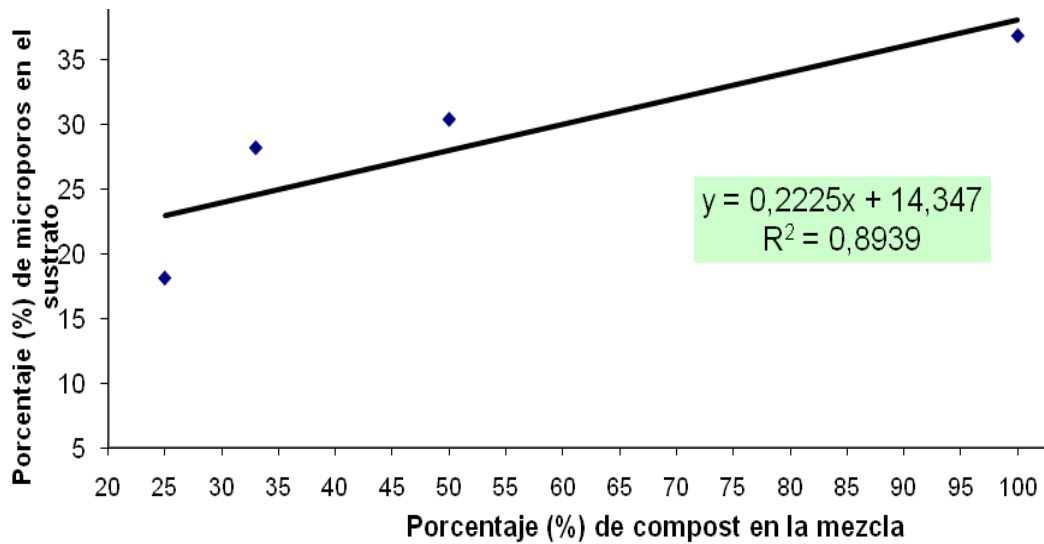
Anexo 15. Relacion entre la densidad aparente y el contenido de compost en la mezcla de los sustratos de crecimiento de plantulas de aguacate.



Anexo 16. Relacion del porcentaje de mortalidad % de plantulas de aguacate en función de la retención de humedad de sustratos.



Anexo 17. Incremento de los microporos con la cantidad de compost en la mezcla de los sustratos de de crecimiento de plantulas de aguacate.



Anexo 18. Caracterización química del compost de cachaza (residuo de la industria de la caña de azúcar).

pH (1:1)	CE	CIC	Determinación %								
	dS/m		Humedad.	C.O. %	M.O %	N - Total	P ₂ O ₅ (mg/kg)	CaO	MgO	K ₂ O	Na ₂ O
7,90	1,33	39,26	66,05	18,47	31,85	1,00	1,58	5,95	1,68	0,64	0,04
7,60	1,85	41,58	68,74	17,03	29,36	0,91	1,73	5,77	1,60	0,55	0,05
7,75	1,59	40,42	67,40	17,75	30,61	0,96	1,66	5,86	1,64	0,60	0,05

Micronutrientes ppm					
S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
0,35	13,3	36,4	15134,3	628,1	106,5
0,41	13,2	69,6	20773,3	646,0	86,5

Anexo 19. Caracterización química de la Carbonilla

MO (%)	N-Total (%)	P-Olsen (mg/kg)	K (cmol/kg)	Ca (cmol/kg)	Mg (cmol/kg)	Na (cmol/kg)	CIC (cmol/kg)
4,28	0,20	9,61	0,07	5,38	1,02	0,11	2,70

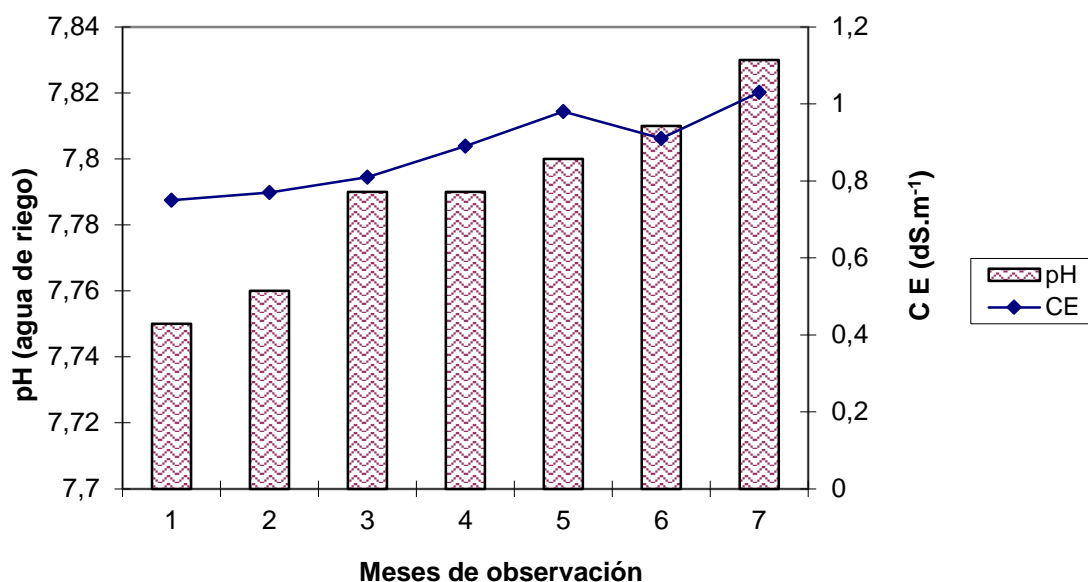
S (mg/kg)	B (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)
89,62	2,91	161,63	15,06	356,87	5,73

Anexo 20. Caracterización química de la cascarilla de arroz

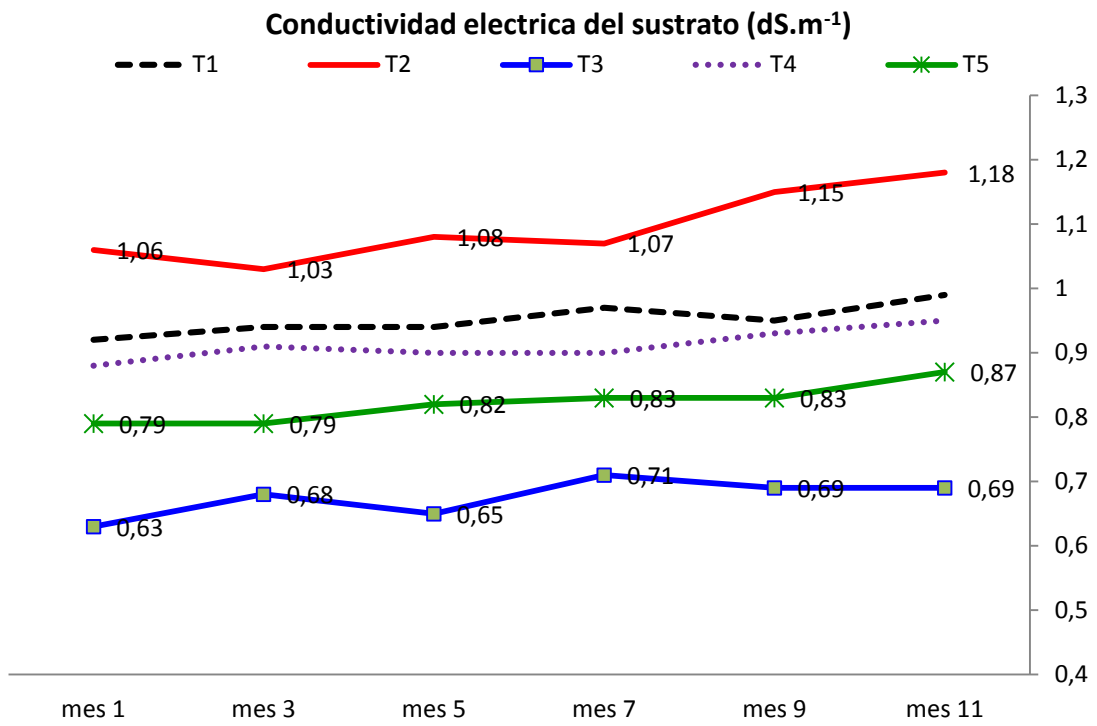
N-Total (%)	P-Total (%)	K-Total (%)	Ca-Total (%)	Mg-Total (%)	Na (mg/kg)	K-Sol. (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)
0,35	0,06	0,02	0,04	0,03	20,10	2,23	0,02	0,04

SiO2 (%)	Na-Sol. (mg/kg)	S-Total (%)	B (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Ceniza (%)
10,1	58,93	0,05	2,97	0,11	153,81	4,38	16,66	12,00

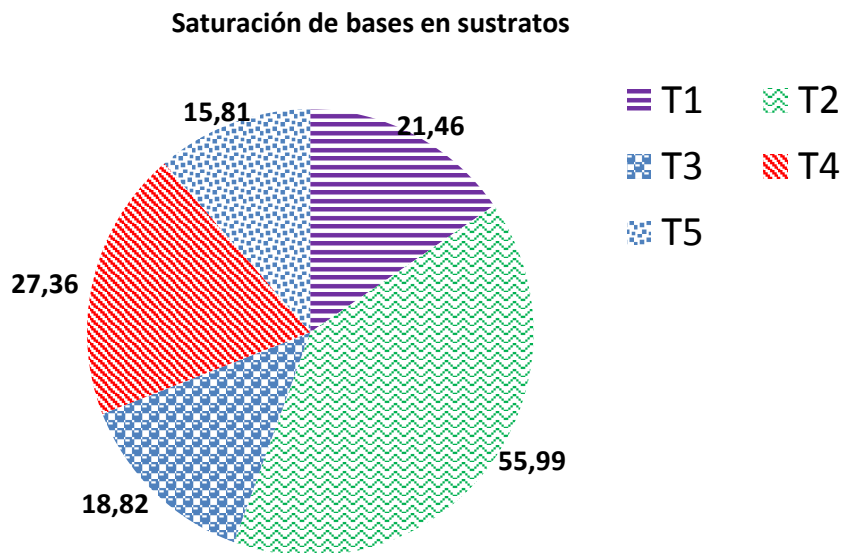
Anexo 21. Determinación de pH y conductividad eléctrica (CE: dS/m) en el agua de riego aplicada a los sustratos de crecimiento de plántulas de aguacate.



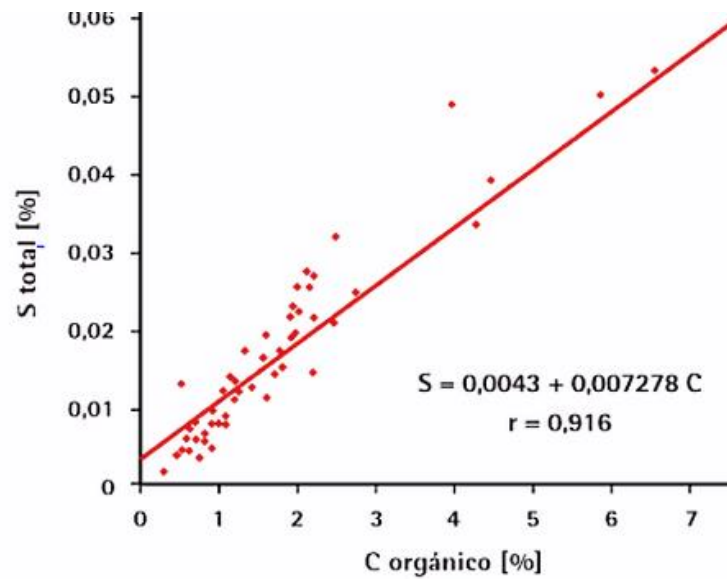
Anexo 22. Tendencia de la conductividad eléctrica (CE: dS.m⁻¹) de los sustratos de crecimiento de plántulas de aguacate.



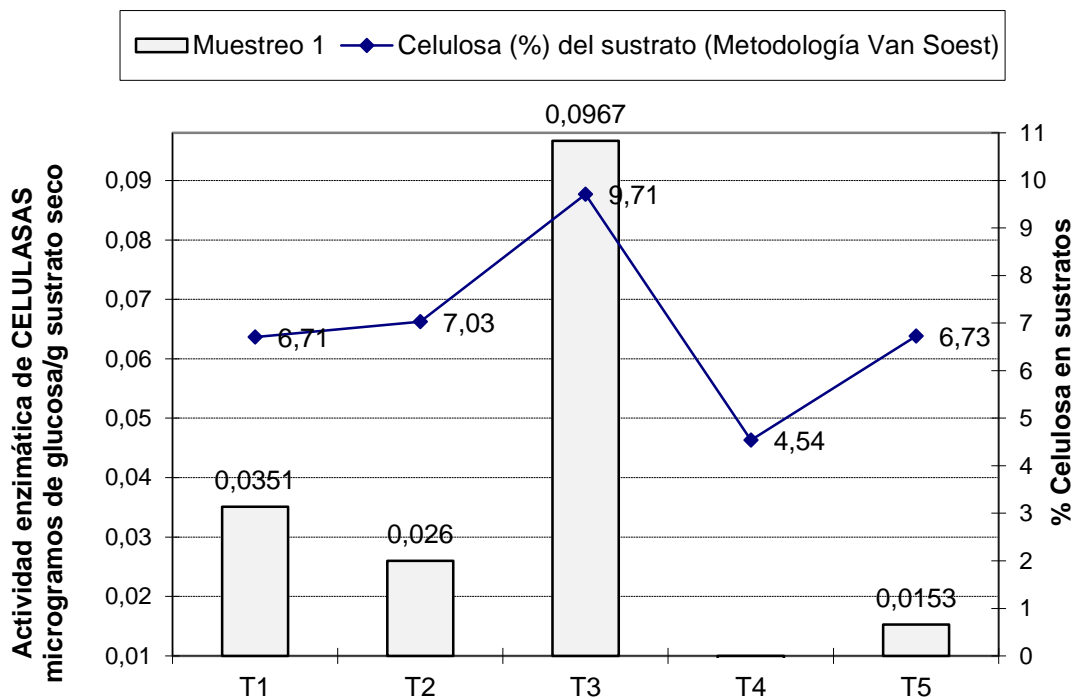
Anexo 23. Saturación de bases en sustratos de la fase 1.



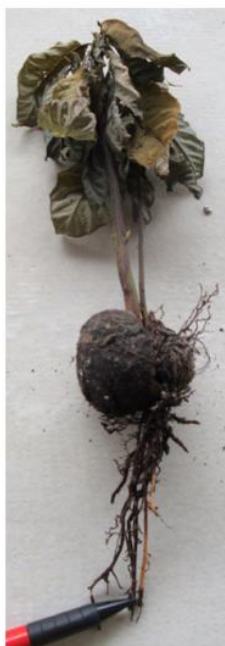
Anexo 23.1. Relación entre los contenidos de C orgánico y S total de muestras de suelo de Rio Grande del sur de Brasil (Tomado de Bissani *et al*, 1995)



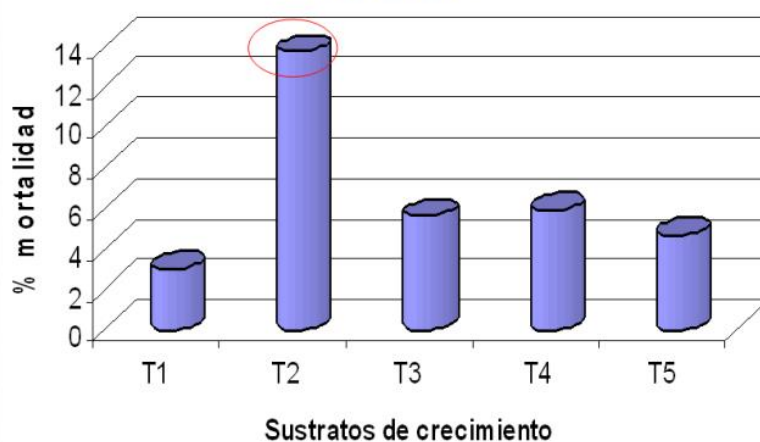
Anexo 24. Relación de la actividad de celulasas y el contenido de celulosa en sustratos de aguacate.



Anexo 25. Mortalidad de plantulas de aguacate antes del injerto (20 dias) en diferentes sustratos.



Mortalidad de plántulas de aguacate *Persea americana* Mill antes de la Injertación



Anexo 26. Analisis de varianza de las variables de respuesta

Variable: Celu1 (Primera determinación de celulasas)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	0.01034052	0.00060827	582.68	<.0001
Error	30	0.00003132	0.00000104		
Total corregido	47	0.01037184			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Celu1 Media
0.996981	5.205089	0.001022	0.019629

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRAT	15	0.01034016	0.00068934	660.35	<.0001

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REPET	2	0.00000036	0.00000018	0.17	0.8413

Variable: Celu2 (Segunda determinación de celulasas)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	0.01174838	0.00069108	313.28	<.0001
Error	30	0.00006618	0.00000221		
Total corregido	47	0.01181456			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Celu2 Media
0.994399	6.943066	0.001485	0.021392

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRAT	15	0.01174238	0.00078283	354.87	<.0001
REPET	2	0.00000600	0.00000300	1.36	0.2723

Variable: Celu3 (Tercera determinación de celulasas)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	0.01522042	0.00089532	1671.24	<.0001
Error	30	0.00001607	0.00000054		
Total corregido	47	0.01523649			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Celu3 Media
0.998945	3.169388	0.000732	0.023094

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRAT	15	0.01522032	0.00101469	1894.06	<.0001
REPET	2	0.00000010	0.00000005	0.09	0.9154

Variable dependiente: fosfatasa acida

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	20.87778177	1.22810481	7512.56	<.0001
Error	30	0.00490421	0.00016347		
Total corregido	47	20.88268598			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	facida Media
0.999765	0.545120	0.012786	2.345479

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	2	0.00008779	0.00004390	0.27	0.7663
TRAT	15	20.87769398	1.39184627	8514.20	<.0001

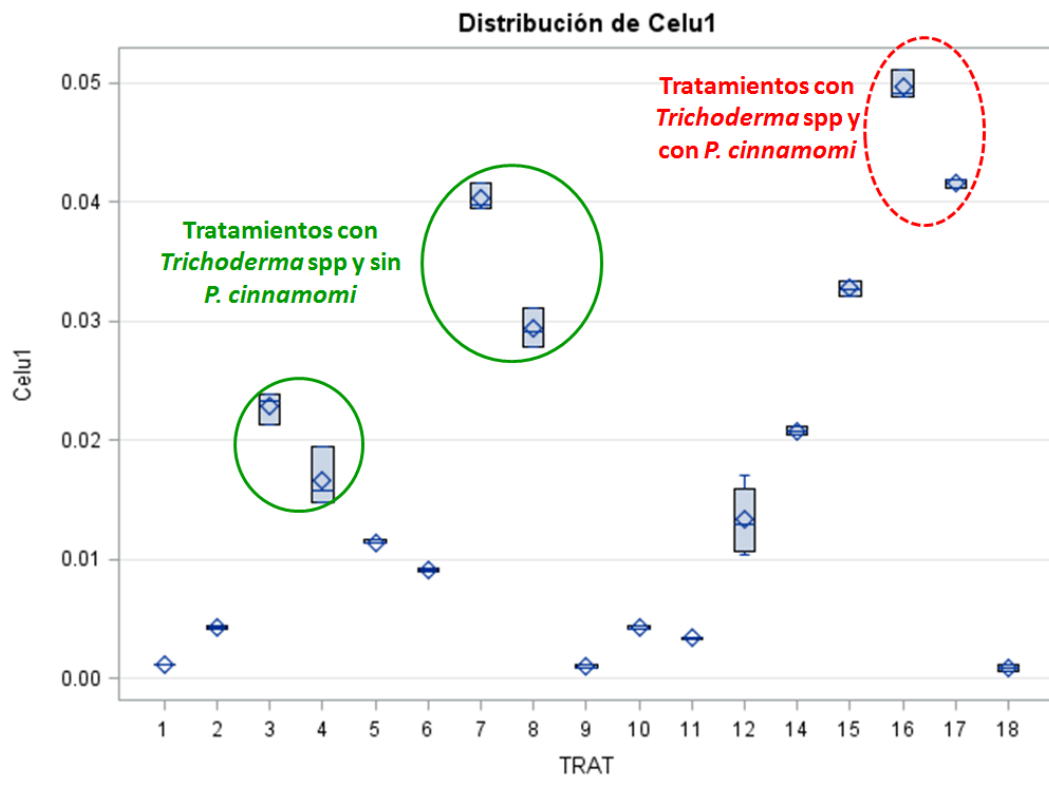
Variable dependiente: fosfatasa alcalina

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	8.79459227	0.51732896	5091.47	<.0001
Error	30	0.00304821	0.00010161		
Total corregido	47	8.79764048			

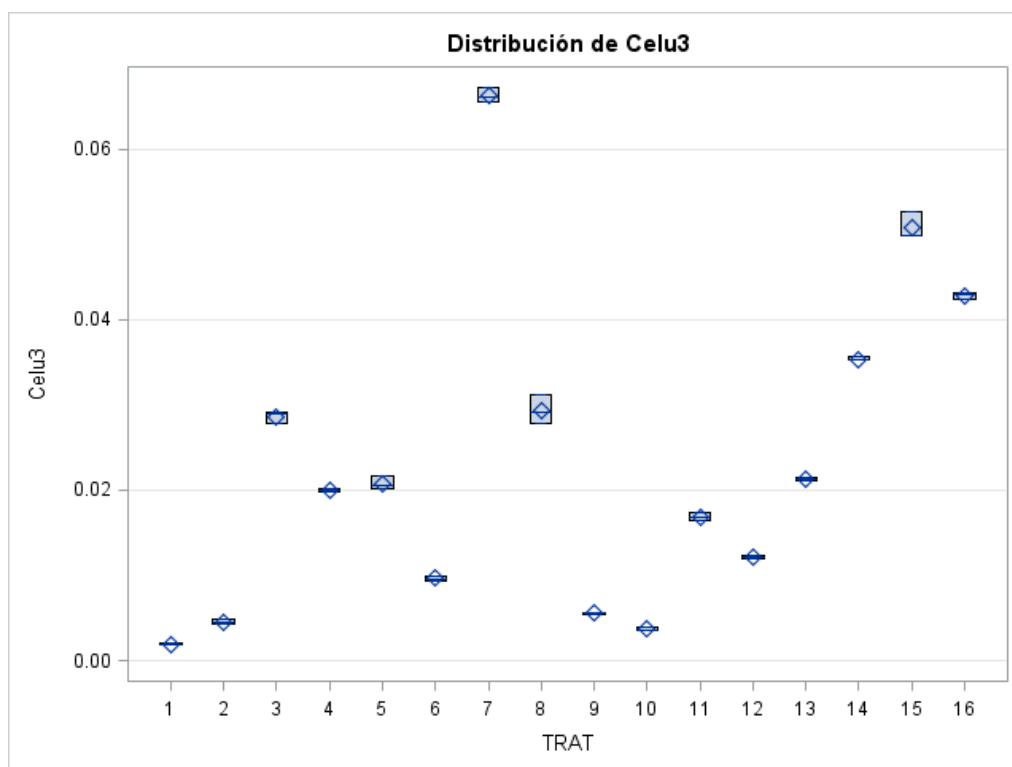
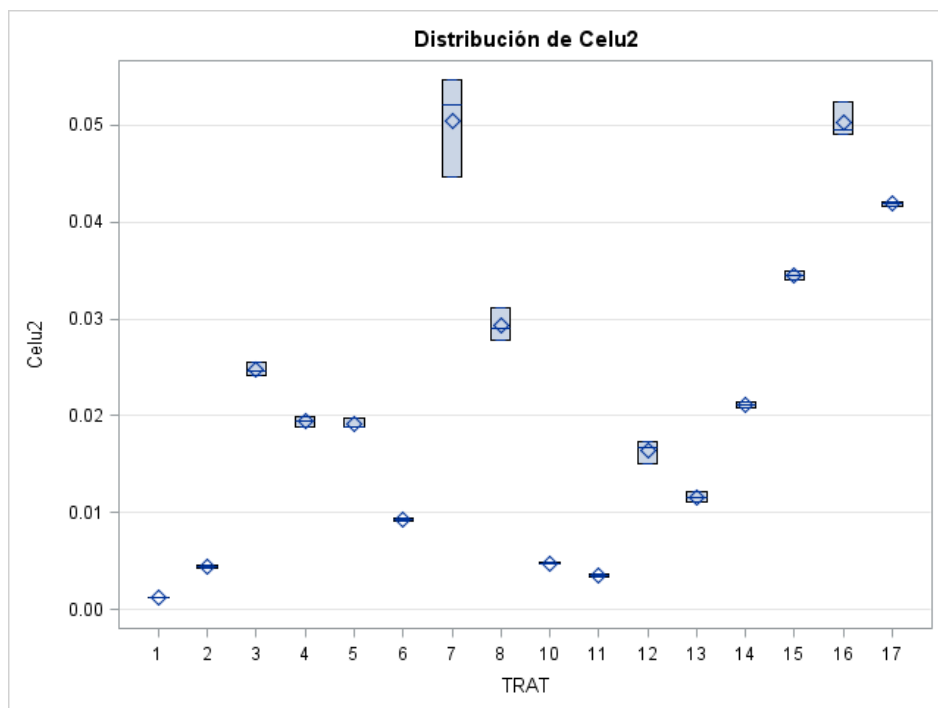
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	falk Media
0.999654	0.848413	0.010080	1.188104

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	2	0.00023579	0.00011790	1.16	0.3271
TRAT	15	8.79435648	0.58629043	5770.18	<.0001

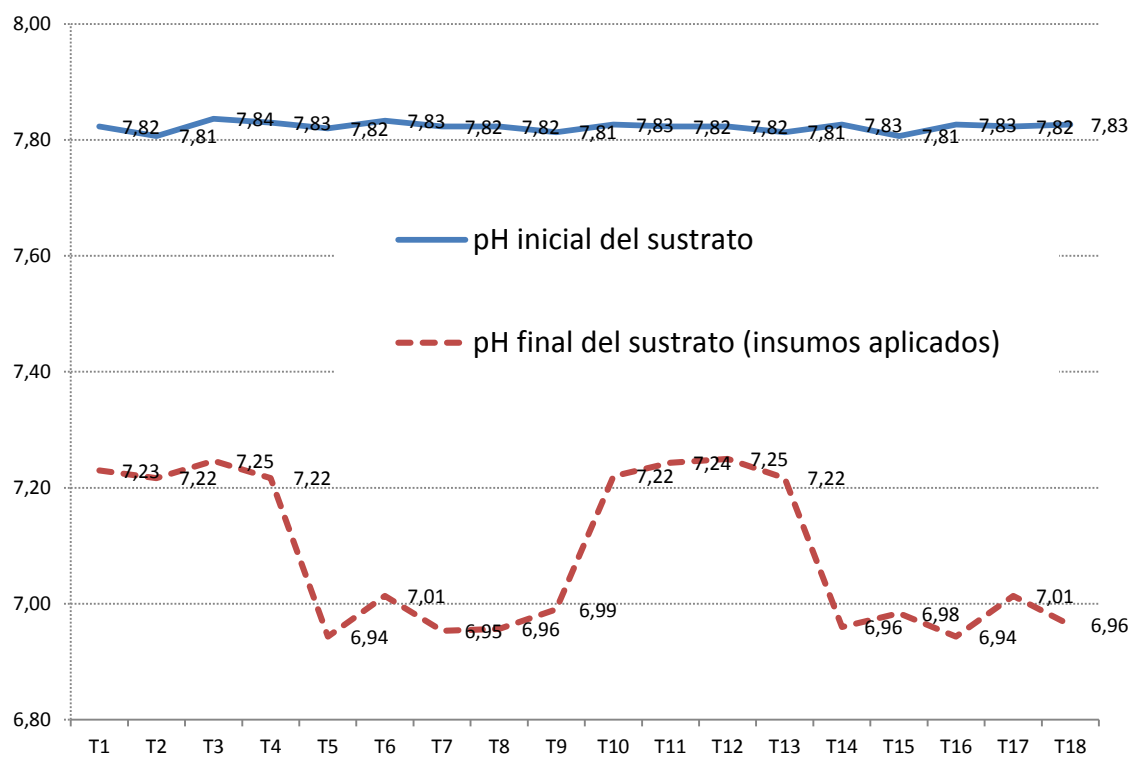
Anexo 27: Actividad enzimática de celulasas de sustratos (μg de glucosa g^{-1} sustrato seco h^{-1}) en tres muestreos



Continuación anexo 27: Actividad enzimática de celulasas de sustratos (μg de glucosa g^{-1} sustrato seco h^{-1}) en muestreos 2 (celu2) y 3 (celu3).



Anexo 28. Disminución del pH de los sustratos después de la aplicación de productos acidificantes.



Anexo 29. Tabla de correlación Canónica entre variables bioquímicas (enzimas) y microorganismos

Correlaciones entre BIOQUIMICAS Y MICROORGANISMOS									
	Celu1	Celu2	Celu3	facida	falk	OxiAmon	OxiNitrito	micorriza	CO2
Celu1	10.000	0.9798	0.9424	0.7949	0.6448	-0.6088	-0.4416	0.1678	0.0549
Celu2	0.9798	10.000	0.9803	0.8198	0.6699	-0.6200	-0.4404	0.1669	0.1311
Celu3	0.9424	0.9803	10.000	0.8568	0.7148	-0.5880	-0.3982	0.2272	0.2227
facida	0.7949	0.8198	0.8568	10.000	0.9276	-0.4456	-0.1917	0.4385	0.5375
falk	0.6448	0.6699	0.7148	0.9276	10.000	-0.2751	-0.0570	0.5381	0.6111
OxiAmon	-0.6088	-0.6200	-	-	-	10.000	0.6999	0.1367	-0.1616
OxiNitrito	-0.4416	-0.4404	-	-	-	0.6999	10.000	0.2663	0.2825
micorriza	0.1678	0.1669	0.2272	0.4385	0.5381	0.1367	0.2663	10.000	0.3914
CO2	0.0549	0.1311	0.2227	0.5375	0.6111	-0.1616	0.2825	0.3914	10.000

Anexo 30. Tabla de correlación Canónica entre variables fisiológicas de plántulas de aguacate

	mshojas	msraiz	CHR- hojas	Afoliar	Nfoliar	Pfoliar	Kfoliar	Calfoliar	Mgfoliar	mortalid	Ca/Mg	N/P
mshojas	10.000	0.8961	0.7307	0.6583	0.5169	0.6205	0.6197	0.4295	0.5115	-0.4085	0.1401	0.0986
msraiz	0.8961	10.000	0.7511	0.7233	0.5790	0.6752	0.6745	0.6297	0.6951	-0.5362	0.2601	0.1499
CHR- hojas	0.7307	0.7511	10.000	0.7434	0.5010	0.7196	0.3318	0.2191	0.6071	-0.5887	-0.1651	0.0022
Afoliar	0.6583	0.7233	0.7434	10.000	0.8011	0.8413	0.5478	0.4692	0.7596	-0.7474	0.0393	0.2917
Nfoliar	0.5169	0.5790	0.5010	0.8011	10.000	0.7315	0.5248	0.4670	0.6057	-0.5739	0.1731	0.6844
Pfoliar	0.6205	0.6752	0.7196	0.8413	0.7315	10.000	0.4718	0.3693	0.6999	-0.5520	-0.0375	0.0265
Kfoliar	0.6197	0.6745	0.3318	0.5478	0.5248	0.4718	10.000	0.7690	0.6908	-0.3768	0.4271	0.3104
Calfoliar	0.4295	0.6297	0.2191	0.4692	0.4670	0.3693	0.7690	10.000	0.5523	-0.3689	0.8048	0.3294
Mgfoliar	0.5115	0.6951	0.6071	0.7596	0.6057	0.6999	0.6908	0.5523	10.000	-0.7132	-0.0420	0.2081
mortalid	-0.4085	-0.5362	-0.5887	-0.7474	-0.5739	-0.5520	-0.3768	-0.3689	-0.7132	10.000	0.0663	-0.3003
Ca/Mg	0.1401	0.2601	-0.1651	0.0393	0.1731	-0.0375	0.4271	0.8048	-0.0420	0.0663	10.000	0.2909
N/P	0.0986	0.1499	0.0022	0.2917	0.6844	0.0265	0.3104	0.3294	0.2081	-0.3003	0.2909	10.000

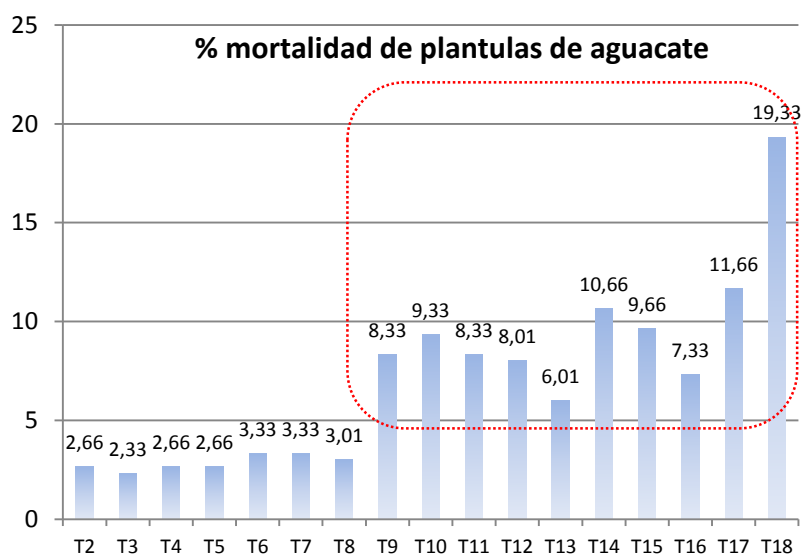
Anexo 31. Tabla de correlación Canónica entre variables bioquímicas (enzimas) y fisiológicas de las plántulas de aguacate

Correlaciones entre BIOQUIMICO y FISIOLOGICO												
	mshojas	msraiz	CHR- hojas	Afoliar	Nfoliar	Pfoliar	Kfoliar	Calfoliar	Mgfoliar	mortalid	Ca/Mg	N/P
Celu1	0.0593	0.0013	-0.2701	-0.0912	0.2008	-0.0809	0.0420	0.1560	-0.2921	0.2581	0.4137	0.3301
Celu2	0.1240	0.0657	-0.2200	-0.0134	0.2537	-0.0501	0.0971	0.2270	-0.2337	0.1750	0.4495	0.3602
Celu3	0.2050	0.1174	-0.1422	0.1114	0.3304	0.0447	0.1534	0.2598	-0.1831	0.1055	0.4494	0.3624
facida	0.2647	0.2289	0.0729	0.3401	0.5491	0.2753	0.1775	0.2962	0.0228	-0.1708	0.3555	0.4583
falk	0.2958	0.3037	0.1861	0.4608	0.6471	0.3619	0.2146	0.3753	0.1063	-0.3310	0.3997	0.5261
OxiAmon	-0.0105	-0.0285	0.4190	0.0562	-0.2207	0.0695	-0.4309	-0.3635	-0.0823	-0.0570	-	-0.3875
											0.3763	
OxiNitrito	0.4139	0.4396	0.8351	0.5258	0.2336	0.5348	-0.0244	-0.1481	0.4584	-0.4479	-	-0.1766
											0.4919	
micorriza	0.3540	0.4613	0.4386	0.5370	0.5891	0.5326	0.2411	0.3003	0.2470	-0.1625	0.2270	0.2540
CO2	0.5561	0.5830	0.5750	0.7599	0.7359	0.6533	0.4495	0.3720	0.6002	-0.7716	0.0169	0.3942

Anexo 32. Prueba de comparación de promedios para la mortalidad de plántulas.

Tratamientos	% Mortalidad
T1	2,66 G
T2	2,66 G
T3	2,33 G
T4	2,66 G
T5	2,66 G
T6	3,33 G
T7	3,33 G
T8	3,01 G
T9	8,33 G
T10	9,33 BCD
T11	8,33 ECD
T12	8,01 ED
T13	6,01 F
T14	10,66 B
T15	9,66 BC
T16	7,33 EF
T17	11,66 B
T18	19,33 A

Anexo 33. Mortalidad de plántulas (fase 2)



Anexo 34. Corte transversal de tejidos de raíces de plantulas de aguacate a los 70 días despues del injerto

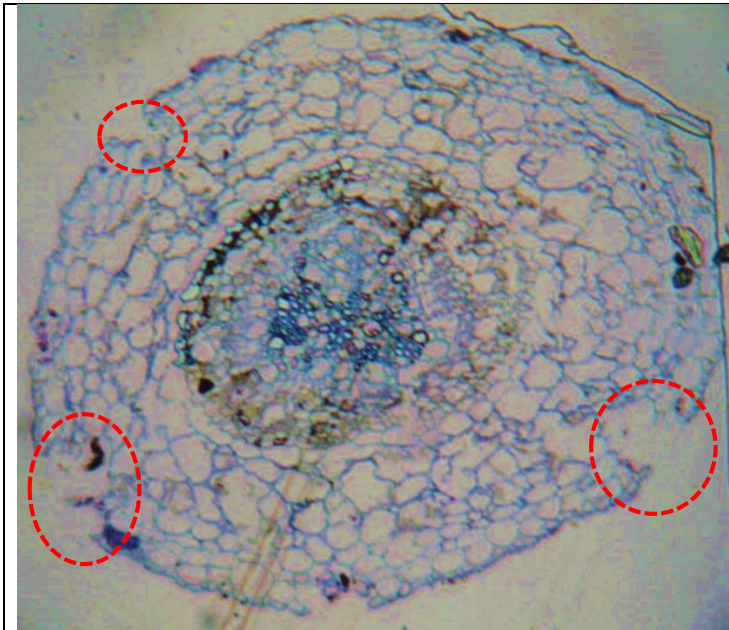


Foto Ararat, 2011

Raiz enferma (Tratamiento testigo T18, sin productos preventivos):

Se ilustra con claridad el daño en la parte externa de la raíz, donde las estructuras no están bien formadas y degradadas por el patógeno (zona delimitada).



Foto Ararat 2011

Raiz sana (Tratamiento T10 con silicato de potasio):

Se observa un tejido con la pared continua y rígida de la estructura epidérmica y las estructuras internas están bien conservadas; parte del tejido la discontinua (zona delimitada) se debe a que la raíz no estuvo bien posicionada para el corte.