MANEJO DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ DEL AGUACATE (*PERSEA AMERICANA* MILL.) UTILIZANDO CONTROLES BIOLÓGICOS, *ARACHIS GLABRATA* Y COMPOSTA DE CAFÉ

Por

Jessica Torres Vélez

Tesis sometida en cumplimiento parcial como requisito para el grado de

Maestro en Ciencias
en
Protección de Cultivos

Universidad de Puerto Rico
Recinto Universitario de Mayagüez
2010

Aprobado por:

Consuelo Estévez De-Jensen, Ph.D. Presidente Comité Graduado	Fecha
Lydia I. Rivera Vargas, Ph.D. Miembro Comité Graduado	Fecha
Eduardo C. Schröder, Ph.D. Miembro Comité Graduado	Fecha
Ricky Valentín Representante de Escuela Graduada	Fecha
Hipólito O'Farrill - Nieves, M.S. Director Departamento	Fecha

Resumen

Se estudió el efecto de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Arachis glabrata* como cobertor vegetal, composta de café y Fosetyl-Al para la pudrición de raíz (*Phytophthora cinnamomi*) de aguacate en invernadero y campo. Bajo condiciones de invernadero la aplicación de composta de café en invernadero demostró ser una alternativa en reducir la pudrición de raíces de plántulas de aguacate. Este tratamiento presentó el menor porcentaje de pudrición (15%), mayor peso seco de raíces (2.08g) y un bajo porcentaje de infección por *P. cinnamomi* (5%). El control químico, Fosetyl-Al, fue eficiente en el control de pudrición de raíces (2.94%) en substrato de turba y en campo (0%). No se observó un incremento en las poblaciones de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* como efecto de los tratamientos. A pesar de que en pruebas de antagonismo realizadas in vitro *T. harzianum* fueron efectivas en reducir el desarrollo de *P. cinnamomi*, los síntomas de pudrición de raíz ni en la infección por el patógeno fueron reducidas. En pruebas in vitro de la actividad microbiana en base de respiración de CO_2 no se observó diferencias significativas indicando que los tratamientos evaluados no incrementaron la respiración microbiana lo cual no indico condiciones supresivas en la rizosfera de las plántulas de aguacate en la presencia de los tratamientos evaluados.

Abstract

Bacillus subtilis, *Trichoderma harzianum*, *Arachis glabrat*a as a cover crop, coffee compost, and Fosetyl - Al were evaluated against avocado root rot (*Phytophthora cinnamomi)* in greenhouse and field experiments. Coffee compost proved to be an adequate strategy in management of avocado root rot under greenhouse conditions. This treatment reduced root rot symptoms of plants grown in sterilized soil in the greenhouse presenting a low percentage of root rot (15%), and higher dry root weight (2.08g) in comparison with the other treatments. Chemical treatment Fosetyl-Al showed a lower percentage of root rot (2.94%) of plants grown in peat moss in the greenhouse and the lowest infection percentage in an avocado grove (0%). Of the treatments used, none proved to increase *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. Even though in vitro experiments demonstrated that *T. harzianum*'s was an efficient control of *P. cinnamomi*'s development, this treatment did not reduce root rot or infection of the pathogen in greenhouse or field experiments. The microbial respiration assays demonstrated that the coffee compost had a significantly lower microbial activity than the treatments that included cover crops in the first greenhouse experiment. This assay indicated that none of the treatments significantly increased microbial activity in both greenhouse experiments.

Agradecimientos

Tenemos que ser como la gota de agua que cae sobre un inmenso cuerpo de agua, que parece perderse, pero cuando esa gota cae causa un movimiento, olas que mueven un cuerpo de agua. El mar sería menos si le faltara esa gota. (Madre Teresa de Calcuta).

Primero quiero agradecer a Dios por iluminarme y fortalecerme en este camino lleno de retos, dificultades pero muchas bendiciones. Agradezco a la Doctora Consuelo Estévez por ser mi consejera y mi guía en este proceso de maestría. Su experiencia e interdisciplinariedad han servido de inspiración para mí como su estudiante y para el desarrollo de mis metas profesionales. A la Dra. Lydia Rivera le agradezco el sembrar la semilla de la fitopatología en mis pensamientos, por sus consejos, porque con su ejemplo mueve a todos sus estudiantes a ir más allá, a cuestionar y crear ciencia, gracias. Al Dr. Schröder le agradezco su aportación en el desarrollo de mi tesis, por compartir sus conocimientos conmigo de manera incondicional. Al Dr. Sotomayor le agradezco su ayuda y consejos durante el transcurso de mi tesis, por la aportación de sus conocimientos y materiales para el experimento de respiración microbiana. A Roberto Vargas Ayala le agradezco la oportunidad de dirigir el laboratorio de Nematología Agrícola durante mi maestría, un tiempo gratificante y robustecedor, además de su apoyo y dirección desde mi experiencia de bachillerato.

Les brindo un agradecimiento especial a María Pagán, Jeannette Morales, Luis Collazo, Víctor González, David Ujake, Profesor Arístides Armstrong, Profesora Nydia

Vicente por sus palabras, por compartir esta experiencia conmigo y por hacer el camino uno más alegre y llevadero, ¡Gracias! Mi más sincero agradecimiento a los empleados de la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz que me ayudaron en las labores necesarias para realizar mis experimentos en invernadero y en el campo.

A mi familia por acompañarme a través de este proceso mediante sus oraciones, apoyo incondicional y constante motivación, quedo por siempre endeudada en el amor. Agradezco a mis amigos y compañeros que compartieron esta experiencia conmigo a través de los viajes a la Estación Experimental de Juana Díaz, en los laboratorios, etc… por saber aprovechar cada oportunidad para crecer como seres humanos pero sobre todo en nuestra amistad; Verónica Acevedo, Adamaris Lamourte, María Rojas, Mónica López, Jacqueline Vega, Laura Polanco, Byron Vega, Luz Myriam Serrato Díaz y Sol Taína Cintrón. Por último quiero agradecer a mi novio, Jesús Espinosa Irrizary, por su ayuda, apoyo y aliento durante mi proceso de maestría.

Tabla de contenido

Resumen _____ *ii*

Abstract _____ *iii*

Agradecimientos _____ *iv*

Tabla de contenido _____ *vi*

Lista de Tablas _____ *vii*

Lista de Figuras _____ *ix*

Lista de Apéndice _____ *x*

1. Introducción _____ *1*

2. Revisión de Literatura _____ *5*

2.1 *Phytophthora cinnamomi* _____ **5**

2.1.1 Ciclo de Vida _____ 8

2.1.2 Manejo _____ 9

2.1.3 Enmiendas orgánicas _____ 11

2.1.4 Control Biológico _____ 15

2.1.5 Cobertores Vegetales _____ 20

2.1.6 Control Químico _____ 21

2.2 *Persea americana* _____ **22**

2.2.1 Importancia Económica _____ 22

2.2.2 Botánica _____ 23

2.2.3 El Cultivo _____ 24

2.2.4 Plagas y enfermedades _____ 25

3. Materiales y Métodos _____ *27*

3.1 Pruebas de Antagonismo in Vitro _____ **27**

3.1.1 Diseño Experimental _____ 27

3.1.2 Análisis Estadístico _____ 28

3.2 Control biológico de *P. cinnamomi* en Invernadero _____ **29**

3.2.1 Diseño Experimental _____ 29

3.2.2 Severidad de la Enfermedad _____ 30

3.2.3 Colonización de Raíces por *Bacillus subtilis* _____ 30

3.2.4 Colonización de Raíces por *Trichoderma harzianum* _____ 31

3.2.5 Respiración Microbiana _____ 32

3.2.6 Análisis estadístico _____ 33

3.3 Control Biológico de *P. cinnamomi* en Invernadero en suelo San Antón _____ **35**

3.3.1 Diseño Experimental _____ 35

3.3.2 Evaluación _____ 36

3.3.3 Análisis Estadístico _____ 37

3.4 Control biológico de *P. cinnamomi:* Experimento en Campo _____ **39**

3.4.1 Localidad _____ 39

3.4.2 Presencia de *Phytophthora* sp. en huerto de Juana Díaz _____ 40

3.4.3 Aplicación de los Tratamientos 40
3.4.4 Evaluación 42

4. Resultados *43*

4.1 Pruebas de Antagonismo 43

4.2 Control biológico de *P. cinnamomi* en Invernadero 44
4.2.1 Porcentaje de Pudrición de Raíces 44
4.2.2 Poblaciones de *Bacillus subtilis* en las Raíces de Aguacate 47
4.2.3 Porcentaje de Colonización por *Trichoderma harzianum* 48
4.2.4 Respiración Microbiana 49

4.3 Control biológico de *P. cinnamomi* en Invernadero en suelo San Antón 52
4.3.1 Porcentaje de Pudrición de Raíces 52
4.3.2 Porcentaje de infección de raíces por *Phytophthora cinnamom*i 53
4.3.3 Peso Seco 53
4.3.4 Poblaciones de *Bacillus subtilis* en las raíces de plántulas en Invernadero 55
4.3.5 Respiración Microbiana 56

4.4 Experimento de Campo 58

5. Discusión *61*

6. Conclusiones *67*

7. Recomendaciones *68*

8. Referencias *69*

9. Apéndice *75*

Lista de Tablas

Tabla 1. Tratamientos aplicados en vivero - Diciembre 2008 _____33

Tabla 2. Composición química de la composta de café obtenida de la EEA-Adjuntas. _____34

Tabla 3. Tratamientos aplicados en experimento realizado en el invernadero Octubre 2009. _____38

Tabla 4. Tratamientos aplicados en huerto de aguacate EEA – Juana Díaz ___42

Tabla 5. Diámetro (cm) de crecimiento de *P. cinnamomi* (aislados SG y 033) en medio de harina de maíz en presencia de *T. harzianum* y *B. subtilis*. _____44

Tabla 6. Severidad de pudrición de raíces bajo diferentes tratamientos con inoculación y sin inoculación con *Phytophthora cinnamomi*. _____46

Tabla 7. Severidad de pudrición de raíz con y sin inóculo *P. cinnamomi.* _____46

Tabla 8. Poblaciones de *Bacillus subtilis* en presencia y ausencia de inoculación con *Phytophthora cinnamomi* en plántulas de raíces de aguacate en invernadero ____47

Tabla 9. Tasa de respiración microbiana en medio de siembra con plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos. _____51

Tabla 10. Peso seco de raíces y vástago de plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos. _____54

Tabla 11. Tasa de respiración microbiana de suelos de plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos. _____57

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa del huerto de aguacate localizado en EEA – Juana Díaz. 39

Figura 2. Severidad de pudrición de raíces de plántulas en invernadero bajo diferentes tratamientos. 45

Figura 3. Poblaciones de *Bacillus subtilis* en raíces de plántulas de aguacate. 48

Figura 4. Porcentaje de colonización de raíces de aguacate por *Trichoderma harzianum* 49

Figura 5. Respiración microbiana acumulativa en medio de siembra de plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos. 50

Figura 6. Severidad de pudrición de raíces en plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos 52

Figura 7. Porcentaje de infección por *Phytophthora cinnamomi* en plántulas de aguacate. 54

Figura 8. Poblaciones de *Bacillus subtilis* en plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos 55

Figura 9. Respiración microbiana en suelos de plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos. 57

Figura 10. Porcentaje de infección por *Phytophthora cinnamomi* en huerto de aguacate.....59

Figura 11. Poblaciones de *Bacillus subtilis* en raíces de árboles de un huerto de aguacate. 59

Figura 12. Porcentaje de colonización de raíces de árboles en un huerto de aguacate por *Trichoderma harzianum* 60

Lista de Apéndice

9.1 Análisis Estadístico _____ *75*
9.1.1 Pruebas de Antagonismo In Vitro _____ 75
9.1.2 Primer Experimento de Invernadero _____ 76
9.1.3 Segundo Experimento de Invernadero _____ 78
9.1.4 Experimento de Campo _____ 81

1. Introducción

Phytophthora cinnamomi Rands. es el causante de la enfermedad más importante y de mayor distribución en aguacate en el mundo (Marais et al., 2002) "la pudrición de raíz". Este patógeno fue detectado por primera vez en aguacate en Puerto Rico y ataca a más de 3,000 especies de plantas (Zentmyer, 1980). La enfermedad también conocida como "mal de la canela" produce muerte regresiva de aguacate y está diseminada en los huertos de este frutal en Puerto Rico comprometiendo su productividad a largo plazo. Su incidencia y severidad aumentan en suelos arcillosos con drenaje deficiente donde las condiciones anaeróbicas presentes en épocas de alta precipitación favorecen la infección de la raíz de aguacate. En Puerto Rico se han reportado dos especies de *Phytophthora* directamente relacionadas a la pudrición de la raíz del aguacate, *P. cinnamomi* y *P. palmivora* (Torres et al., 2006, Ruiz, 1991). Ambas especies son destructivas en presencia de patrones susceptibles, suelos compactados y de drenaje insuficiente los cuales también impiden el desarrollo normal de la raíz (Torres et al., 2006). En épocas de sequía la expansión de estos suelos causa daño mecánico al sistema radicular propiciando la entrada del patógeno. En Puerto Rico, desde el año 2002 al 2007 se registró una reducción de 40% en el número de fincas produciendo aguacate y una disminución de 33% de la producción total (USDA, 2009). Entre los factores que han influido en la disminución del área de producción y el bajo rendimiento del aguacate se incluyen el aumento en costos de producción y la pudrición de raíz causada por *P. cinnamomi*.

El control químico de la enfermedad actualmente se realiza con fungicidas sistémicos de translocación basipetal a base de Fosetyl-Al (Aliette 80% WP), ácido

fosfórico (H_3PO_3) y metalaxyl. El uso de metalaxyl es cuestionable debido a que se han reportado poblaciones de *P. cinnamomi* resistentes al mismo y su impacto sobre el medio ambiente es desfavorable (Erwin y Ribeiro, 1996). Estos se pueden aplicar de manera foliar, en el tronco o en el suelo aunque se ha reportado mayor efectividad al ser aplicados en el tronco (Matheron y Matejka, 1988).

Se ha observado que suelos con altos niveles de materia orgánica promueven un ambiente supresivo a *P. cinnamomi* reduciendo los síntomas de pudrición de raíces de aguacate (Broadbent y Baker, 1974). La siembra de cobertores vegetales y el uso de enmiendas orgánicas aumentan los niveles de materia orgánica y la actividad biológica en los suelos (Broadbent y Baker, 1974) y en medios de siembra utilizados en invernadero (Aryantha et al., 2000). Se ha relacionado la alta actividad biológica en los suelos a la supresión de patógenos de suelo (Hoitink y Boehm, 1999, Aryantha et al., 2000). La habilidad que una enmienda orgánica tiene para estimular una alta actividad biológica, en particular la actividad de bacterias formadoras de endosporas, es un factor clave en la reducción de síntomas asociados a *P. cinnamomi* (Aryantha et al., 2000). Adicionalmente el uso de composta puede promover una resistencia sistémica adquirida en la planta (Zhang et al., 1996).

Se han aislado microorganismos antagonistas a *P. cinnamomi* de suelos supresivos (Broadbent y Baker, 1974; Aryantha y Guest, 2006). *Trichoderma harzianum* inhibe el crecimiento de *P. cinnamomi* in vitro (Aryantha y Guest, 2006). Se ha encontrado que *T. harzianum* puede colonizar de manera exitosa enmiendas orgánicas aumentando la salud de la raíz de aguacate de un 22 a un 25% sugiriendo su habilidad de colonizar las raíces de

aguacate (Costa et al., 2000). Se asocia la presencia de bacterias formadoras de endosporas a condiciones supresivas a *P. cinnamomi* (Aryantha y Guest, 2000; Aryantha y Guest, 2006; Broadbent y Baker 1974). A partir de estudios realizados por Broadbent y Baker (1974) con bacterias del género *Bacillus* spp., Backman et al. (1994) pudieron generar una cepa eficiente en el control biológico para patógenos de raíces que se utiliza actualmente en el algodón. A pesar de que se conoce que *T. harzianum* y *B. subtilis* tienen características que los favorecen como controles biológicos de patógenos de suelo, son muy limitados los estudios reportados sobre su uso como agentes de control biológico de *P. cinnamomi* en invernadero o en el campo.

Un manejo integrado es necesario para la producción de aguacate en presencia de *P. cinnamomi* basándose en la higiene y sanidad, control cultural y biológico, patrones resistentes y el uso de fungicidas (Coffey, 1987). Tomando en consideración los factores que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad en los huertos de aguacate es necesario crear condiciones que favorezcan el desarrollo saludable de la raíz del árbol mientras se suprima las poblaciones de *P. cinnamomi*. En el presente estudio se evaluó el efecto de la utilización del cobertor *Arachis glabrata* y colonización por *B. subtilis* y *T. harzianum* y un tratamiento de composta de café sobre *P. cinnamomi* en las raíces de aguacate. Se determinó su efecto antagónico al patógeno y la actividad microbiana para determinar la habilidad de crear condiciones supresivas a la pudrición de raíces.

Con el propósito de estudiar el efecto supresivo sobre la pudrición de raíz de aguacate causado por *P. cinnamomi* los objetivos de esta investigación fueron:

1. Evaluar la eficacia de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* integrados con el cobertor *Arachis glabrata*, sobre la pudrición de raíz y *P. cinnamomi*.

2. Determinar efectividad de la composta de café, sobre la pudrición de raíz y *P. cinnamomi*.

3. Calcular respiración microbiana de CO_2 en los suelos bajo los diferentes tratamientos para determinar condiciones supresivas a la enfermedad.

2. *Revisión de Literatura*

2.1 *Phytophthora cinnamomi*

La pudrición de la raíz causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. es la enfermedad de mayor impacto económico a nivel mundial en el cultivo de aguacate (Downer et al., 2001). En el año 1927 en Puerto Rico, se detectó a *P. cinnamomi* causando pudrición de la raíz del aguacate por primera vez (Zentmyer, 1980). Simultáneamente en la década de 1920 se reportaron síntomas de pudrición causados por *P. cinnamomi* en aguacate en California. Para 1987 se vieron afectadas entre 60 hasta 75% de las siembras de aguacate en California debido a este patógeno (Coffey, 1987) y se reportaron pérdidas de hasta $44 millones anuales (Marais et al., 2002). *Phytophthora cinnamomi* Rands se aisló por primera vez del árbol de canela, *Cinnamomum burmannii* (Nees & T. Nees) Blume (Erwin y Ribeiro, 1996) por Rands en el año 1922 en Sumatra (Rands, 1922 citado por Zentmeyer, 1980). Desde entonces se ha comprobado que *P. cinnamomi* es un patógeno importante que causa pudrición de raíces en más de 950 variedades y especies de plantas (Zentmeyer, 1980). Algunos cultivos de importancia económica afectados por *P. cinnammi* son *Ananas comosus* (piña), *Castanea dentata* (castañas), *Chamaecyparis lawsonianae* (ciprés), *Cinchona spp*. (quinina), *Cinnamomum burmannii* (canela), , *Eucalyptus* spp., *Juglans* spp. (nuez), *Pinus* spp. (pino), *Prunus* spp. (almendra, cereza, melocotón y ciruela), *Quercus* spp. (roble) y *Rhododendron* (Erwin y Ribeiro, 1996).

El impacto de este patógeno no se limita al sector económico sino que también se ve afectada la diversidad ecológica. Para el año 1921se comenzó a observar parchos de

Eucalyptus marginata muertos en Australia y a pesar de que los reportes fueron aumentando durante los próximos diez años la importancia dada a esta enfermedad fue mínima. Para la década del 1930 al 1940 en el bosque de eucalipto se diseminaba la muerte de estos árboles sin aun conocer el agente causal. No fue hasta que se vio afectada la industria de madera en 1965 que se identificó a *P. cinnamomi* como el organismo causal de la muerte descendente (Armistead, 2008). Las áreas más susceptibles a la infección por el patógeno se relacionan a suelos con pobre drenaje, arenosos y con bajo contenido de nutrientes. Armistead (2008) indica como el patógeno no solo afecta al eucalipto sino a otras tantas especies que forman parte del bosque y como esto a su vez afecta la fauna de mamíferos en Australia Occidental dando énfasis a que Australia presenta un record en mamíferos en extinción debido a pérdida de hábitat. Se reporta que 41% de la vegetación del bosque es susceptible al patógeno (Armisted, 2008). Especies de plantas afectadas por *P. cinnamomi* en los bosques de eucalipto son *Adenanthos barbiger, Banksia grandis, Macrozamia riedlei, Persoonia longifolia, Xanthorrhoea preissii* y. Las especies más susceptibles se encuentran en la familia Proteacea pero otras familias con alto número de especies susceptibles son Apiaceae, Cyperaceae, Dilleniaceae, Epacridaceae, Fabaceae, Goodeniaceae, Mimosaceae, Myrtaceae y Xanthorrhoeaceae (Armisted, 2008). Se han reportado especies de mamíferos que han sido directamente afectadas por la presencia de *P. cinnamomi* en Australia tales como *Antechinus agilis, Antechinus falvipes leucogaster, , Rattus fuscipes, R. lutreolus* y *Smithopsis leucopus* (Armisted, 2008).

Los síntomas producidos por *P. cinnamomi* varían según el cultivo. En aguacate las raíces primarias son invadidas por el patógeno lo que causa pudrición de color marrón a negro mientras que las raíces principales no se ven afectadas. En el vástago se refleja una

deficiencia severa de nutrientes y agua debido a la destrucción extensa de las raicillas responsables de la absorción de estos elementos (Zentmyer, 1980). Los síntomas observados en el área foliar son la reducción en el tamaño de la hoja, clorosis, muerte regresiva de las ramas, ausencia o reducción de crecimiento del árbol y marchites. El patógeno puede llegar al tronco del árbol y causar el desarrollo de cancros en los tallos que se caracterizan por exudado color blanco correspondiendo a un azúcar mannoketoheptosa (Zentmyer, 1980). Se han reportado pérdidas en aguacate debido al desarrollo de estos cancros en Camerún y en América del Sur (Huguenin et al., 1975; Zentmyer, 1980). En condiciones de campo no es usual que *P. cinnamomi* infecte frutos u hojas. Es común que en etapas tempranas de infección ocurra un aumento anormal en producción debido a la destrucción de las raíces que resulta en una acumulación de carbohidratos en la parte superior del árbol (Zentmyer, 1980).

En Puerto Rico debido a la siembra de patrones susceptibles a *P. cinnamomi* y la presencia de suelos arcillosos esta enfermedad ha destruido huertos completos. El aguacate de la raza antillana (*P. americana* Mill. var. *americana*) está mejor adaptado a las condiciones climáticas de Puerto Rico y aun no se han reportado patrones resistentes dentro de esta raza. La raza antillana está adaptada a climas tropicales y elevaciones más bajas que la raza mejicana y la raza guatemalteca (Litz et al., 2007). Algunas variedades sembradas en Puerto Rico son Semil 43, Semil 34, Wilson Popenoe, Candelaria, Ávila, Butler entre otras (Estación Experimental Agrícola, 1988). En Puerto Rico se han reportado dos especies de *Phytophthora* directamente relacionadas a la pudrición de la raíz del aguacate, *P. cinnamomi* y *P. palmivora* (Torres et al., 2006, Ruiz, 1991). Ambas especies son destructivas en presencia de patrones susceptibles, condiciones suelos

compactados y de drenaje insuficiente los cuales también impiden el desarrollo normal de la raíz (Torres et al., 2006). Coffey (1987) reporta que en California los suelos donde se siembra aguacate tienen pobre drenaje, la textura del suelo es variable, poseen baja cantidad de materia orgánica y que todos estos factores hacen que estos suelos sean conducentes a la presencia de *P. cinnamomi*. La proliferación de este oomiceto se debe a la producción de esporangios en tejido infectado y abundancia de agua (Erwin y Ribeiro, 1996). La enfermedad es más severa y su desarrollo más rápido en suelos con poco drenaje, pH de 6.5 y un rango de temperatura entre 13 a 32˚C (Erwin y Ribeiro, 1996). El patógeno se dispersa con facilidad mediante el riego, vehículos, implementos, zapatos, agua y material vegetativo muerto (Erwin y Ribeiro, 1996).

2.1.1 Ciclo de Vida

Phytophthora cinnamomi se clasifica bajo el Reino *Chromista*, Filum *Oomycota*, Clase *Oomicetes*, Orden *Peronosporales* y Familia *Pythiaceae* (Erwin y Ribeiro, 1996). Su micelio es hialino y coenocítico, con pocas o ningunas septas. Las paredes celulares están compuestas por celulosa y ß- glucanos y no quitina como los hongos. En el micelio de *P. cinnamomi* se observan hifas hinchadas y con protuberancias que lo caracteriza de otras especies. Las estructuras de propagación asexuales son los esporangios, zoosporas y las clamidosporas. El esporangio es formado del micelio vegetativo en el suelo y en la planta hospedera en condiciones apropiadas de humedad y temperatura. Estos tienen forma ovoide a ellipsoidal y/o alargados, carecen de papila aunque tienen un engrosamiento apical, y producen zoosporas reniformes biflageladas. Cada esporangio puede producir de 10 a 30 zoosporas en menos de una hora bajo condiciones favorables (Zentmeyer, 1980). Además de liberar zoosporas, los esporangios se propagan vegetativamente, produciendo

nuevos esporangios a partir de esporangios viejos o en otras partes del micelio (Erwin y Ribeiro, 1996). Las zoosporas de *P. cinnamomi* tienen forma de riñón y son mayormente uninucleadas y mótiles por medio de dos flagelos. Se ha observado que las zoosporas son atraídas por quimiotaxis a la zona de alargamiento de la raíz que se considera el punto de mayor infección (Zentmyer, 1980). Cuando la zoospora llega al tejido del hospedero se enquista y se forma una lesión marrón de varios milímetros en 24 a 36 horas y se observa el micelio dentro de 72 horas. La penetración en el tejido es inter e intracelular (Zentemeyer, 1980). En adición, *P. cinnamomi* produce abundantes clamidosporas globosas y pigmentadas en grupos o racimos en medio de cultivo, cuya pared interior es más fina que otras especies de *Phytophthora*. Las clamidosporas son estructuras de sobrevivencia que permanecen en el suelo por un tiempo prolongado y son producidas en la naturaleza cuando las raíces se comienzan a podrir. Una clamidospora produce un mínimo de diez tubos germinativos (Zentmeyer, 1980). Las clamidosporas pueden ser diseminadas por aves y el comején (Erwin and Ribeiro, 1996). Sexualmente, *P. cinnamomi* se reproduce mediante la producción de oogonios y anteridios. *P. cinnamomi* es heterotálica, esto significa que para reproducirse sexualmente tienen que estar presentes los dos grupos de apareamiento que son A1 y A2. Sin embargo se conoce que el tipo A2 es homotálica en algunos casos. Los anteridios son anfígenos lo que significa que se adhieren al oogonio por el lado, en vez de rodearlo por la parte inferior (Erwin and Ribeiro, 1996). Las estructuras de reproducción se utilizan como criterios de clasificación.

2.1.2 Manejo

Los cuatro principios esenciales en la integración de prácticas de control son: higiene y sanidad; control biológico y cultural; patrones resistentes; y fungicidas (Coffey,

1987). Las medidas de prevención son esenciales para evitar la introducción del patógeno al predio, comenzando con material propagativo o semilla libre del patógeno. La siembra en suelos bien drenados y con bajo pH inhibe la producción de esporangios y zoosporas. Como su dispersión es rápida, se deben utilizar fungicidas en el invernadero o en el semillero como técnica preventiva, entre estos etridiazole (ethazole), fosetyl-Al y metalaxyl (Coffey, 1984).

En la parte sur este de Queensland, Australia para el año 1969 encontraron un huerto de aguacate en el área de Tamborine Mt. donde ocurría una baja incidencia de pudrición de raíces a pesar de la presencia de *P. cinnamomi* (Broadbent y Baker 1974). Ellos determinaron que la producción de esporangios y la liberación de zoosporas por *P. citrophthora* y *P. cinnamomi* es mucho menos en lixivio de suelos supresivos que de suelos conducentes y estas características son suficiente para prevenir una infección efectiva del hospedero. Se observó que no hubo un aumento en el número de clamidosporas como resultado de una disminución en el número de esporangios. El suelo supresivo y su extracto contenían mayor número de microorganismos particularmente *Bacillus* spp. y actinomicetos comparado con otros suelos. El inóculo del suelo supresivo proveyó menor estímulo de formación de esporangios que el inóculo del suelo conducente y produjo mayor degradación de esporangios (Broadbent y Baker, 1974). En este trabajo Broadbent y Baker (1974) describen la metodología Ashburner que los agricultores realizan para mantener calcio altamente intercambiable y altos niveles de materia orgánica similar a los niveles encontrados en los bosques cercanos. La metodología Ashburner consiste en la siembra de cobertores vegetales por dos años después de la eliminación del bosque. Antes de la siembra de aguacate los cobertores vegetales fueron integrados mecánicamente al suelo con estiércol, dolomita y superfosfato. Mientras los árboles eran jóvenes se mantuvo

el cobertor vegetal cortado cerca del árbol sin hacer contacto. A los cinco años los árboles, a través de la caída de hojas, pudieron mantener los niveles de materia orgánica. En términos generales la práctica realizada consiste en aplicación de estiércol dos veces al año en una cantidad de dos toneladas por acre; el abono se aplica a 0.45 kg por árbol al año; dolomita una tonelada por acre cuando el pH baja de 6. Se incluye siembras de los cobertores vegetales *Dolichos lablab* L. y *Zea mayz* que luego son integrados al suelo. Los suelos supresivos encontrados tienen en común ciertos atributos: a) alto contenido de materia orgánica (a veces con capa húmica de aproximadamente 23 cm de profundidad) b) altos niveles de calcio (20-25 meq/100g) c) pH entre 5.5 a 7.0 d) altos niveles de ammonio y nitrato e) alta actividad biológica y f) suelos con buen drenaje (Broadbent y Baker, 1974). Los altos niveles de materia orgánica y altos niveles de calcio aportan al drenaje El trabajo presentado por Broadbent y Baker (1974) es un claro ejemplo de la diversidad de factores que pueden afectar la infección por *P. cinnamomi* y la necesidad de integración de diferentes metodologías para crear un ambiente supresivo a este patógeno.

2.1.3 Enmiendas orgánicas

Las enmiendas orgánicas han sido utilizadas por siglos para mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. En adición sirven como una alternativa de reciclaje para desechos tales como estiércol y residuos vegetales de procesos de elaboración, ayudando a su vez en el problema de manejo de desperdicios. El uso de enmiendas orgánicas estimula el crecimiento de las raíces, aumenta el uso de nutrientes, disminuye la evaporación del agua del suelo, incrementa la capacidad de absorción del suelo, reduce escorrentía, facilita el drenaje, regula la temperatura del suelo y provee un sustrato rico para microorganismos en ese nicho ecológico (Aryantha et al., 2000). Los suelos con altos

niveles de materia orgánica tienen una microflora y fauna activa que se asocian a su habilidad de suprimir la actividad de *P. cinnamomi* (Aryantha et al., 2000; Broadbent y Baker, 1974; Hoitink y Boehm, 1999). La estimulación de microorganismos edáficos por el uso de enmiendas orgánicas contribuye a la actividad supresiva del suelo mediante los cuatro mecanismos principales de biocontrol: 1) competencia, 2) antibiosis, 3) parasitismo y 4) resistencia inducida sistémicamente (Hoitink y Boehm, 1999). El análisis de las interacciones microbianas que ocurren en suelos enmendados, su efecto sobre el patógeno y/o el hospedero, ha asistido en el conocimiento sobre mecanismos de supresividad de patógenos (Aryantha et al., 2000; Downer et al., 2001; Hoitink y Boehm, 1999). La medida de actividad microbiana está correlacionada con condiciones supresivas a enfermedades y negativamente correlacionada a severidad e incidencia de enfermedades (Aryantha et al., 2000; Chen et al., 1988). El método más utilizado para medir actividad microbiana es la respiración de suelo, definida como la suma de toda actividad metabólica en el suelo que produce CO_2, que resulta en un ingreso de O_2 o liberación de CO_2 por microorganismos metabólicamente activos (Zibilske, 1994). La medida de respiración de CO_2 es cuantitativa y análoga a la metodología de hidrólisis de fluoresceína de diacetato (FDA) (Schnörer y Rosswall, 1982) utilizada frecuentemente en medir condiciones supresivas a enfermedades de plantas (Aryantha et al., 2000; Chen et al., 1988; Downer et al 2001; Hoitink y Boehm, 1999).

Aryantha y colaboradores (2001) encontraron que la sobrevivencia de plántulas de *Lupinus albus* L. en presencia de *P. cinnamomi* aumentó en presencia de gallinaza fresca o compostada por dos o cinco semanas igualmente con estiércol de ganado compostado por cinco semanas. Todas las enmiendas utilizadas aumentaron significativamente los niveles

de materia orgánica. La gallinaza y el estiércol fresco aumentaron actividad microbiana al doble comparada con los tratamientos no enmendados. El mejor control de *P. cinnamomi* se obtuvo con el tratamiento de gallinaza debido a baja mortalidad de plántulas, bajas poblaciones del patógeno, altos niveles de actividad microbiana y la actividad de bacterias formadoras de endosporas. En este trabajo se correlacionó positivamente la sobrevivencia de las plántulas de *L. albus* L en presencia de *P. cinnamomi* con alta actividad microbiana y las poblaciones de bacterias formadoras de endosporas. Sin embargo se observó una correlación negativa con el contenido de materia orgánica. A partir de este estudio se realizó otro en seguimiento donde se aislaron hongos y bacterias para determinar su habilidad suprimiendo *P. cinnamomi* en ensayos in vitro. Aryantha y Guest (2006) encontraron 45 aislados donde 24 eran hongos, 10 actinomycetos, 7 pseudomonas fluorescentes y 4 bacterias formadoras de endosporas que inhibieron el crecimiento de *P. cinnamomi* en medio de cultivo. El modo de acción más observado fue antibiosis mostrando una zona de inhibición y lisis de la hifa de *P. cinnamomi*. Se observó micoparasitismo en presencia de *Gliocladium* sp. y *Trichoderma* sp. Los géneros de los microorganismos que presentaron antagonismo a *P. cinnamomi* fueron *Streptomycetos, Bacillus, Pseudomonas, Fusarium, Gliocladium, Penicillium* y *Trichoderma* (Aryantha y Guest, 2006).

Suelos enmendados con materia orgánica por medio de aplicaciones superficiales de cortes de árboles de eucalipto fresco fueron asociados de manera significativa con actividad microbiana y producción de celulasa y laminarasas (Downer et al., 2001). El uso de enmiendas orgánicas superficiales promueve un ambiente de actividad enzimática y que una comunidad produciendo actividad enzimática variada puede explicar la supresividad

generalizada promovida por el método Ashburner sobre poblaciones de *P. cinnamomi*. Las enzimas encontradas por Downer et al. (2001) degradaron la pared celular de *Phytophthora* sp. indicando que el ambiente en la enmienda orgánica no era adecuado para el desarrollo del patógeno.

Las enmiendas orgánicas pueden proveer una base alimenticia para facilitar el uso de control biológico (Hoitink y Boehm, 1999). Por ejemplo, la composta de grama sudán y composta densa de patio inoculadas con agentes de control biológico fueron buenos sustratos para la colonización de *Gliocladium virens y Trichoderma harzianum* (Costa y colaboradores, 2000). *Gliocladium virens* mejoró la salud de la raíz de aguacate por un 31 a 37% mientras que *T. harzianum* lo mejoró de un 22 a 25%. Ellos indican que la habilidad de los agentes de control biológico para colonizar estas enmiendas favorecen su competitividad en el suelo y su colonización de raíces de aguacate. A su vez esto puede resultar en un antagonismo del patógeno antes de que cause daños a nuevas raicillas resultando en una salud generalizada de la raíz. Los resultados de este trabajo sugieren que enmiendas orgánicas preparadas de manera adecuada pueden ser colonizadas exitosamente por agentes de control biológico y aunque por un periodo corto, pueden utilizarse para enmendar suelos.

La reducción en severidad de pudrición de raíces causada por *Pythium* sp. en pepinillo (*Cucumis sativus* 'Straight Eight') bajo tratamientos de enmiendas compostadas sugieren que el control se debió a resistencia adquirida sistémicamente (RAS) (Zhang et al., 1996). Se observó un incremento en la actividad de peroxidasa y niveles elevados de la isoenzima peroxidasa en enmiendas compostadas que apoyan el papel de RAS en el control

de la enfermedad. Las peroxidasas acídicas se utilizan como marcadores moleculares para RAS en pepinillo. En este experimento se observó que una inoculación de *Colletotrichum orbiculare* antes de ser enmendadas con composta resultó en una mayor actividad de peroxidasa en comparación con el tratamiento de composta solamente. Los mecanismos exactos de inducción de la RAS son desconocidos pero hay envueltos tanto factores químicos como biológicos (Zhang et al., 1996). Se han encontrado altas poblaciones de agentes de control biologico en enmiendas compostadas versus medios de siembras conducentes a enfermedades sugiriendo que estas poblaciones contribuyen a la RAS. Se ha probado que el proceso de autoclave ha destruido el efecto supresivo de enmiendas compostadas sobre pudrición de raíz causada por *Pythium*. La resistencia inducida por el uso de composta se correlaciona con la activación de genes relacionados a la patogenicidad, lo que crea una capacidad defensiva en la planta (Kavroulakis et al., 2006).

2.1.4 Control Biológico

Dentro de la diversidad de microorganismos que se encuentran en el suelo se han estudiado muchos que pueden ser antagonistas a patógenos de cultivos. En California se han identificado suelos supresivos a *P. cinnamomi* utilizando dos criterios: suelos donde se degradan las hifas y clamidosporas y/o suelos que tienen altas poblaciones de *P. cinnamomi* pero los árboles continúan con una producción óptima (Menge et al., 2000). De estos suelos se han aislado hongos antagónicos a las clamidosporas de *P. cinnamomi*, entre ellos *Trichoderma auerovirde, T. harzianum, G. virens y Hyphodontia alutacea* (Menge et al., 2000). También *B. subtilis* se ha aislado bajo condiciones supresivas a *P. cinnamomi* (Aryantha y Guest, 2006; Broadbent y Baker, 1974).

Bacillus subtilis es una bacteria gram positiva con células en forma de bastón que son mótiles y pocas veces se encuentran en cadena (Sneath et al., 1986). Se tiñen de manera uniforme. En agar, las colonias pueden ser redondas a irregulares con superficie opaca, pueden arrugarse y llegar a un color crema o marrón. Son de crecimiento aeróbico y usualmente producen catalasa. Esta especie se caracteriza por producir abundantes esporas que son resistentes a condiciones adversas (Sneath et al., 1986).

Se ha relacionado esta bacteria con RAS (Kloepper et al., 2004). Unos compuestos conocidos como lipopéptidos (surfactina y fengicina) producidos por *B. subtilis* son elicitores de resistencia inducida sistémicamente, presentan actividad antibiótica hacia virus, bacterias, hongos y oomicetos, y facilitan la colonización de la raíz (Jourdan et al., 2009). La familia de la surfactina contiene los biosurfactantes más poderosos por sus propiedades de emulsificación y su naturaleza ampifílica que le permite anclarse fuertemente a capas lípidas (Jourdan et al., 2009). Pruebas realizadas en cultivos y suelos la eficacia de *B. subtilis* 6051 en reducir la mortalidad causada por infección en la raíz por *Pseudomonas syringae,* (Bais et al., 2004). Se relacionó con una película antibacterial producida por el biocontrol que permitió la colonización y por consiguiente la secreción de surfactina. El control ejercido por *B. subtilis* 6051 es directamente proporcional a su habilidad de colonizar y formar la película sobre la superficie radical (Bais et al., 2004).

Hay varios productos de biocontrol registrados que contienen como ingrediente activo *B.subtilis*. Kodiak® (Gufstafson Biologicals, Plano, TX) contiene la cepa GB03 y es utilizado para patógenos de raíces como *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizoctonia*

solani y *Alternaria* spp. en algodón, maní, soya y vegetales. Serenade® (Agraquest In., Davis, CA) contiene *B. subtilis* cepa QST713 registrado para patógenos foliares en tomate. El producto Subtilex (Becker Underwood, Ames, IA) i.a. *B. subtilis* cepa MBI600 también está registrado para *Fusarium*, *Aspergillus* y *Rhizoctonia* spp. en raíces de soya y maní y rango de enfermedades foliares que afectan fresas, pepinillo, tomate y cereales (Joshi y McSpadden, 2006).

Estudios realizados con cepas de *B. subtilis* como agente de control biológico en maní encontraron que es compatible con fungicidas como tratamiento pre-siembra (Backman y colaboradores, 1994). Se observó también una mejora en el vigor mediante emergencia temprana y/o plantas más robustas en plantas bajo algún tipo de estrés. Se demostró una estimulación hormonal lo cual podía ser uno de los mecanismos de la bacteria para mejorar el vigor y se encontró que su efectividad en reducir pudrición por *R. solani* aportaba al crecimiento de la planta. Otra observación fue una mayor nodulación por *Bradyrhizobium* lo que mejora la nutrición del maní. Mientras las raíces crecen más lejos de la semilla las condiciones se vuelven más competitivas y la colonización se ve afectada. Las esporas de *B. subtilis* son altamente resistentes a estrés ambiental, característica crucial para las preparaciones comerciales. Debido a la variabilidad en respuesta de plantas tratadas con *B. subtilis* como método de control las investigaciones ahora van dirigidas a la integración de *B. subtilis* con fungicidas. Se ha revelado que *B. subtilis* se puede integrar con fungicidas para tratamiento de semillas ya que estos no afectan a la bacteria. Usualmente los fungicidas disminuyen las poblaciones de otros hongos lo que favorece la colonización de la raíz por *B. subtilis* (Backman et al. 1994).

Bacillus subtilis cepa GB03 registrado como Kodiak® (Gustafson, Inc, Plano, TX, USA), coloniza exitosamente la rizósfera de monocotiledóneas y dicotiledóneas, promueve el crecimiento aumenta la masa del sistema radical y suprime las enfermedades (Brannen y Kenney, 1997). Kodiak® es un concentrado de esporas de *B. subtilis* y es aplicado a semillas para control de patógenos de suelo. Los antibióticos de iturina generados por varias cepas de *B. subtilis* exhiben actividad anti-fúngica hacia muchos hongos fitopatógenos y varias especies de bacterias. Los antibióticos generados por esas cepas aumentan la permeabilidad de membranas celulares de los hongos fitopatógenos (Brannen y Kenney, 1997).

Trichoderma harzianum es un hongo que presenta características que favorecen su uso como un control biológico por ejemplo un crecimiento rápido en cultivo y una alta producción de conidias (Howell, 2003). Este investigador indica que recientemente se le ha atribuido importancia al mecanismo de competencia del hongo en la rizósfera ya que un biocontrol no resulta eficiente si no puede crecer en la misma. Las especies de *Trichoderma* crecen con el sistema radical de la planta. El potencial del género como agente de control biológico se comenzó a descubrir en los 1930's cuando Weindling demostró que *Trichoderma lignorum* parasita hongos fitopatógenos del suelo tales como *R. solani, Phytophthora parasítica, Pythium* spp., *Rhizopus* spp. y *Sclerotium rolfsii* (Howell, 2003; Weindling, 1932). Él indica que la inhibición del hospedero se debe a que (a) la hifa aérea de *T. lignorum* entra en contacto o se enrolla alrededor del micelio del hospedero destruyendo sus colonias y (b) en el medio de cultivo, la hifa del hospedero muere y se destruye antes del contacto con la hifa de *T. lignorum*. Esta investigación sustenta que *Trichoderma* sp. compite por alimento e incidentalmente mata hongos en el cultivo pero

que el ataque micelial de este género sugiere fuertemente que obtiene nutrientes de la hifa del hospedero. Poco después Weindling y Emerson (1936) aislaron, la gliotoxina, un producto cristalino letal producido por *Trichoderma* sp. (Weindling, 1941). El género *Trichoderma* posee mecanismos para detectar la presencia de otros hongos a su alrededor (Harman, 2006). Los genes de las enzimas endoquitinasas se activan antes de que los dos hongos, *Trichoderma* y su blanco, entren en contacto y las exoquitinasas se activan cuando los dos hongos entran en contacto. *Trichoderma* produce un nivel basal de exoquitinasas continuamente. Las exoquitinasas producen el rompimiento de la pared celular del hongo patógeno que a su vez inducen en *Trichoderma* la expresión de otras enzimas que degradan la pared celular. Algunas especies de *Trichoderma* colonizan sistemas radicales hasta llegar a la corteza y la interacción con la planta resulta en un estado de resistencia inducido que puede ser localizado o sistémico. *Trichoderma* también tiene un efecto notable sobre el crecimiento de las plantas. Se ha documentado el control de patógenos foliares y de raíces mediante resistencia inducida y control biológico por ataque directo hacia el patógeno (Harman, 2006). Otros mecanismos son cambios en la composición de la microflora radical, aumento en la cantidad de nutrientes obtenidos por la planta, aumento en la solubilización de nutrientes del suelo, mejora el desarrollo del sistema radical, aumentando la formación de pelos radicales e incrementando la profundidad de las raíces (Harman, 2006). *Trichoderma* es efectivo en una amplia gama de plantas. Sin embargo, los mejores aumentos en producción se han observado cuando la planta presenta una deficiencia debido a factores genéticos, abióticos o bióticos (Harman, 2006).

2.1.5 Cobertores Vegetales

El uso de cobertores vegetales en programas de manejo integrado está aumentando debido a los beneficios que este puede aportar al control de malezas, su uso como forraje, en el caso de leguminosas su aportación de nitrógeno a los suelos, aportación de materia orgánica y manejo de erosión. Los suelos con cobertores aumentan su porosidad formando agregados estables que aportan mayor aireación lo que lleva a una disminución en la densidad aparente del suelo en beneficia de la planta (Liyanage et al., 1988). La densidad aparente se refiere al peso seco del suelo por unidad de volumen, lo que indica que un suelo aireado tiene una baja densidad aparente mientras que suelo compactado tiene una alta densidad aparente (Smith y Franzen, 2007). Un aumento de porosidad en el suelo ha demostrado una reducción en pudrición de raíces causados por *P. cinnamomi* (Erwin y Ribeiro, 1996).

El maní perenne, *Arachis glabrata,* es perteneciente a la familia Fabaceae y nativo de Sur América: Brasil, Argentina y Paraguay (Cook et al., 2005). Esta planta es una herbácea perenne formando una alfombra densa de rizomas que divergen de una raíz leñosa. Los tallos son erectos a recostados, sin ramificaciones. Las hojas tienen tres foliolos, son glabras a escasamente pubescentes. Los foliolos son de lanceoladas a oblo-lanceoladas o cuñadas hasta 4 cm de largo y 2cm de ancho. La flor es sésil, axilar de color amarillo o anaranjado. Los frutos son ovoidoes aunque escasos (Cook et al., 2005). Se utiliza intensivamente en pastoreo, heno, ensilaje, como cultivo ornamental y en conservación de suelos. Este cultivo se propaga fácilmente de manera asexual a través de sus rizomas y su costo de mantenimiento es reducido debido a que no requiere aplicaciones de nutrientes, ni agua (French et al., 2006). Al momento, no se ha identificado insectos o

enfermedades que causen pérdidas económicas significativas a este cultivo (French et al., 2006). La relación simbiótica con la bacteria *Rhizobium* permite que haya un aumento en la cantidad de nitrógeno disponible en el suelo tanto para la cobertora como para los demás cultivos que la rodean. En la Estación Experimental de Juana Díaz se encontró que el cobertor *A. glabrata* presentó mejor desarrollo vegetativo en comparación con *A. pintoi* al ser sembrado alrededor de árboles en un huerto de aguacate además de que demostró un crecimiento más agresivo lo que impidió el establecimiento de malezas que pudiesen competir (Torres, 2009). El tratamiento con *A. glabrata* (1.30 g / cm^3) presentó una menor densidad aparente que el control (1.51 g / cm^3) y mayor estabilidad de agregados (46.24%) que el control (22.36%) (Torres, 2009). También la aportación de nitrógeno total al suelo aportado por *A. glabrata* superó de manera significativa al control. Estas características aportan a la aeración y drenaje del suelo indicando que los cobertores aumentan el porcentaje de estabilidad de agregados en agua debido a la acción cementante de los exudados de las raíces (principalmente polisacáridos) o de los productos que emiten durante su descomposición, creando una mejor estructura del suelo (McVay, 1989 citado por Torres, 2009).

2.1.6 Control Químico

El uso de fungicidas es generalizado para el control de *Phytophthora*. Fungicidas fenilamídicos que incluyen el metalaxyl, furalaxyl, benalaxyl y oxadixyl son capaces de transportarse acropetalmente a través del xilema (Köller, 1992). Se considera que estos actúan interfiriendo con el complejo del marco de Polimerasa de RNA I de hongos susceptibles inhibiendo la síntesis de RNA ribosomal (Köller, 1992). La resistencia presentada a los fungicidas fenilamídicos se asocia con una mutación en el lugar de enlace

y al año de uso se desarrolla resistencia en las poblaciones de los *Peronosporales*. Los fungicidas de la clase fosfonatos son las sales o los ésteres de ácido fosfónico, altamente solubles en agua que pueden ser translocados a través del xilema y el floema. El fosfonato aluminio tris-O-ethyl (fosetyl-Al) conocido comercialmente como Aliette es degradado rápidamente a ácido fosfónico en la planta y su protección continúa aun después de que el fosetyl Al ya no se encuentra en la planta afectando la síntesis de amino ácidos de los oomicetos (Matheron y Porch, 2000; Ouimette y Coffey, 1989). Este fungicida se aplica mayormente de manera foliar y mediante inyecciones de soluciones de fosfonato de potasio a los troncos de árboles (Köller, 1992).

2.2 *Persea americana*

2.2.1 Importancia Económica

En Puerto Rico el aguacate (*Persea americana* Mill.) ocupa el cuarto lugar en producción dentro de los frutales y es muy apreciado por el consumidor puertorriqueño como complemento en su dieta alimenticia. Las estadísticas presentadas por el Departamento de Agricultura de Puerto Rico (2010) revelan una producción de7,027 millares de aguacates con un valor total de $3,882,000 para el año 2008/2009 y 7,495 millares para un valor total de $4,032,000 para el año 2007/2008 en el ingreso bruto agrícola. La mayor parte de la producción de aguacates en Puerto Rico es realizada por pequeños agricultores aunque existen huertos comerciales que producen a gran escala. Para el año 2002 habían 1,217 fincas en producción de aguacate con un total de 1,138 cuerdas y una cantidad cosechada de 7, 925,000 aguacates. Para 2007 se reportaron 737 fincas con

1,114 cuerdas en total y una producción de 5,283,700 aguacates (USDA, 2009). A nivel mundial la producción de aguacate en el 2008 fue de 3,532,011 tonelada métricas siendo Méjico el país de mayor producción con 1,124,565 toneladas seguido por Chile con 250,000 toneladas e Indonesia con 225,180 toneladas (FAO, 2010).

2.2.2 Botánica

El aguacate tiene su origen en América Central y pertenece a la familia *Lauraceae*. Esta familia consiste primordialmente de cuatro especies de importancia económica: el aguacate (*Persea americana* Mill.), la hoja de laurel (*Laurus nobilis*), la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y el alcanfor (*Cinnamomum camphora*). Las variedades actuales de *P. americana* se originan de tres razas conocidas como: la raza mejicana (*P. americana* var. *Drymifolia*), la raza guatemalteca (*P. americana* var. *Guatemalensis*), y la antillana (*P. americana* Mill. var. *Americana*) adaptadas a diversas zonas ecológicas. La raza mejicana está adaptada a climas subtropicales mientras que la guatemalteca está adaptada a condiciones elevadas y producen bien en condiciones de clima templado. La raza antillana está adaptada a climas tropicales y elevaciones más bajas (Litz et al., 2007). Los huertos en Puerto Rico se han originado principalmente de patrones de la variedad llamada Criolla así como de árboles espontáneos (no injertados) que están dispersos por toda la isla. Semil 42 y Semil 43, ambos de raza antillana se han utilizado como patrones existiendo una gran variedad de tamaños, formas y calidad de aguacates (Estación Experimental Agrícola, 1998). .

El árbol de aguacate es vigoroso, con un tamaño aproximado a 20 m y raíces bastante superficiales (Litz et al., 2007). Es siempre verde y sus hojas son alternas y

pedunculadas. El fruto es una drupa que tiene exocarpo fino, mesocarpio carnoso y endocarpio pétreo con una sola semilla y carpelo y las variedades son clasificadas como tipo A o tipo B dado su patrón de florecida (Litz et al., 2007). Es una planta monoica, que contiene flores de ambos sexos en un árbol. La manera en que abren las flores y se reproducen se conoce como dicogamia sincronizada. Los árboles con flores tipo A abren sus flores por la mañana como hembras y al próximo día por la tarde abren como macho. Los árboles con flores tipo B abren sus flores como hembras por la tarde y al día siguiente por la mañana abren como machos (Estación Experimental Agrícola, 1998).

2.2.3 El Cultivo

El cultivo de aguacate en Puerto Rico se encuentra principalmente en manos de pequeños productores con huertos caseros y una pequeña proporción en huertos comerciales en las zonas de Santa Isabel, Salinas y Juana Díaz. En Puerto Rico, al ser un cultivo que se adapta a una gran variedad de condiciones ambientales, se cultiva tanto en suelos mayormente lómicos arcillosos en áreas montañosas de la Cordillera Central o en las zonas costeras de suelos de pobre drenaje (U.S. Department of Agriculture, 1979). Los suelos que caracterizan estos lugares son mayormente de pH neutral a alcalino (Morton, 1987). El sistema de riego por goteo es utilizado en siembras comerciales lo permite un control de las proporciones de agua aplicadas al cultivo. Las fórmulas de abonamiento utilizadas tradicionalmente son 12-6-8-3 y 12-6-10-3 (N-P-K-Mg) (Estación Experimental Agrícola, 1998). El abono se debe aplicar formando un círculo alrededor del tronco del árbol cercano al sistema de riego y a dos metros del tronco se encontró que beneficia grandemente la producción (Salazar-García y Lazcano-Ferrat, 2003). La producción de árboles de aguacate comienza en el vivero donde se propagan los patrones por semilla. Los

patrones más utilizados son Semil 43, Semil 34 y Semil 26, este último resulta en un patrón vigoroso (Estación Experimental Agrícola, 1998). La siembra de los árboles en el campo se realiza luego de un arado profundo que promueva aeración (Ibar, 1979) aunque la opción de labranza mínima aporta otros beneficios como reducir destrucción parcial de agregados y pérdida de materia orgánica (Sotomayor et al., 2006). Se utiliza una distancia de siembra de 9 hasta 10 m^2 entre árboles para un buen desarrollo (Ibar, 1979). En las montañas se utilizan siembras intercaladas con cultivos temporeros como guineos, plátanos y papaya en lo que crecen los árboles, sembrados a una distancia de 1.83 x 1.83 metros para mayor beneficio de ambos cultivos (Estación Experimental Agrícola, 1998). En huertos comerciales se siembran las variedades: Wilson Popenoe, Candelaria, Pollock, Butler, Picó Giodreau, Semil 43, Semil 34, Fuchsia y Simmonds. Estas variedades tienen características de la raza Antillana o son híbridos entre la raza antillana y guatemalteca.

2.2.4 Plagas y enfermedades

La producción de aguacate en Puerto Rico es afectada por diversas plagas y enfermedades. Los insectos de mayor impacto económico son el chinche de ala de encaje, *Pseudacysta perseae* Heidemann (Hemiptera: Tingidae) y el trípido de banda roja, *S. rubrocinctus* Giard (Thysanoptera: Tripidae). *Psuedocysta perseae* ataca el follaje causando puntos cloróticos y áreas secas o necróticas debido a la alimentación de ninfas y adultos. Luego se observa una desecación en la vena central que puede conducir a una defoliación masiva (Medina-Gaud et al., 1991). El trípido de banda roja, *Selenothrips rubrocinctus* se alimenta de las hojas tiernas del árbol de aguacate. Las hojas obtienen un color plateado que luego se vuelve un color bronce. Un ataque severo promueve la caída

prematura de las hojas (Estación Experimental Agrícola, 1998). El salta hojas, *Idona minuenda*, es otro insecto que afecta el aguacate al alimentarse del envés de la hoja causando clorosis y desecación (Estación Experimental Agrícola, 1998).

Entre las enfermedades de mayor importancia económica a nivel mundial y en Puerto Rico se encuentra "el mal de la canela" causado por *P. cinnamomi*. Este patógeno afecta las raíces primarias del árbol de aguacate lo que impide la translocación de agua y nutrientes hacia la parte superior de la planta. Las raíces se tornan un color marrón oscuro y el árbol comienza a morir de manera regresiva. La antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* produce caída y pudrición del fruto lo cual reduce la producción y afecta la apariencia. La roña, *Sphacelonema perseae*, causa daño al tejido exterior del fruto y no en el mesocarpo, afectando completamente la apariencia del fruto y su comercialización (Estación Experimental Agrícola, 1998).

3. Materiales y Métodos

3.1 Pruebas de Antagonismo in Vitro

3.1.1 Diseño Experimental

El experimento se realizó en el Laboratorio de la Clínica de Diagnóstico en la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz, el 24 de febrero de 2009. La EEA de Juana Díaz se encuentra ubicada en la costa sur de Puerto Rico en la latitud 18° 03'11" N y la longitud 66° 31'50.5" O (Datum NAD 83), a una elevación sobre el nivel del mar de 61 metros. Para la evaluación de la eficacia de *B. subtilis* y *T. harzianum* como control de *P cinnamomi* se utilizaron dos productos biológicos comerciales; Companion® (i.a. *Bacillus subtilis* GB03, Growth Products, White Plains, NY) y Root Shield® (i.a. *Trichoderma harzianum* Rifai strain KRL-AG2, T-22® Planter Box, BioWorks, Geneva, NY).

Los aislados de *Phytophthora* sp. utilizados para esta prueba fueron SG y 033. El aislado SG se obtuvo de un árbol con síntomas de muerte descendiente en una finca con producción de aguacate en San Germán y el aislado 033 se obtuvo de un árbol sintomático de la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz. Se tomaron muestras de las localidades de árboles que mostraron pudrición en las raicillas. Las raíces se desinfestaron enjuagándolas con agua corriente por quince minutos. Se cortaron cinco raicillas con necrosis y se colocaron en medio PARP selectivo para *Phytophthora* spp. preparado con agar de harina de maíz (17 g/1000 ml) con pimaricina (10 mg/ml), amplicilina (250 mg/ml), rifampicina (10 mg/ml) y pentacloronitrobenzeno (100 mg/1000 ml) (Kannwischer y Mitchell, 1978). Luego de la esterilización se añadieron los antibiótico y se sirvió en platos petri de 8.5 cm de diámetro.

Se utilizó el medio de cultivo de harina de maíz Difco® (17g/L) debido a que *T. harzianum, B. subtilis* y *P. cinnamomi* crecen adecuadamente en este medio. En el centro del plato petri se colocó un disco de *P. cinnamomi*. Se utilizó 200µl del producto Companion® (2.915 x 10^7 CFU) diluido en 5ml de agua destilada estéril creando una suspensión de aproximadamente 5.83 x 10^6 CFU/ml. El producto T-22™ Planter Box se suspendió 0.05g en 5ml de agua destilada estéril creando una suspensión de 1.0 x 10^5 CFU/ml. Se realizaron estriados con cada control biológico en cuatro puntos del plato petri alrededor del disco de *P. cinnamomi* según la metodología de Aryantha y Guest (2006). Cada plato petri representó una repetición y se utilizaron seis repeticiones de cada tratamiento. Los platos fueron colocados en la obscuridad a temperatura ambiente 20°C (Aryantha y Guest, 2006). Se evaluó el diámetro (cm) del crecimiento radial del micelio de *P. cinnamomi* al los tres y siete días después de inoculación.

3.1.2 Análisis Estadístico

Para determinar diferencias sobre el crecimiento radial de *P. cinnamomi* bajo los diferentes tratamientos se realizaron pruebas de ANOVA y de comparaciones múltiples DMS en Infostat® (2009). El análisis del aislado SG a los 7 días requirió transformación logarítmica de datos para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y distribución normal de errores. El aislado 033 a los tres días la transformación por rango cumple los supuestos. Este en un análisis estadístico no paramétrico donde se utiliza un ANOVA basado en los rangos que se asignan a todos los datos. Se analizan los rangos de los datos, y se realizó el ANOVA y una prueba de DMS para identificar diferencias entre

tratamientos (Eskridge, 1995). Todas las comparaciones se realizaron mediante DMS (Infostat, 2009).

3.2 Control biológico de *P. cinnamomi* en Invernadero

3.2.1 Diseño Experimental

Este experimento se llevó a cabo en el vivero de la Estación Experimental Agrícola en Juana Díaz. Las plántulas de aguacate (Semil 34) fueron germinadas a partri de semillas en bancos con arena esterilizada. La siembra se realizó el 12 de diciembre de 2008 en tiestos de 8" de diámetro y 9" de profundidad, con un volumen aproximado de 673.46 cm^3. Cada tiesto contenía 3.18 kg de sustrato a base de peat moss. El experimento estuvo dispuesto en un diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial 2 x 6 con cuatro repeticiones. El primer factor consistió de dos niveles; inoculación con *P. cinnamomi* y sin inoculación. El aislado utilizado era proveniente de Sabana Grande de un huerto comercial de aguacate infectado. El inóculo consistió de una cuarta parte del medio PARP con *P. cinnamomi* colocado en el centro del tiesto en un orificio donde se transplantó la plántula de aguacate. El segundo factor consistió de los seis tratamientos (niveles); 1) Control, 2) *A. glabrata* variedad 17097, 3) *A. glabrata + T. harzianum*, 4) *A. glabrata + B. subtilis*, 5) composta de café y 6) Aliette® (fosetyl – Al). El control negativo consistió de una plántula de aguacate sola mientras que el control negativo era una plántula de aguacate inoculada con *P. cinnamomi*. El tratamiento de composta consistió en la aplicación de 0.5kg de composta de café sobre la superficie del medio de siembra. La composta utilizada estuvo compuesta mayormente por pulpa y una porción de pergamino proveniente de un proceso aireado de compostaje realizado en la Estación Experimental de Adjuntas, donada por el

Dr. J. Chong. El tratamiento de *B. subtilis* "Companion®" se aplicó a la dosis recomendada de 1.25ml por litro lo que corresponde a 0.375ml del producto en 300ml de agua propiciando una población inicial aproximada de 5.45 x 10^6 CFU por tiesto. El tratamiento de T-22™ Planter Box i. a. *T. harzianum* Rifai strain KRL-AG2 consistió en una aplicación de 1.12kg por hectárea a 0.001587g diluidos en 300 ml de agua por tiesto lo que equivale una población inicial aproximada de 1.587 x 10^4 CFU por tiesto. Para los tratamientos que incluían *A. glabrata* se sembraron dos tallos del cobertor en el medio de siembra con la plántula de aguacate. En el momento de la siembra del *A. glabrata* se aplicó *Bradyrhizobium* sp. cepa NC92 obtenida del Dr. Schröder en base de turba a una dosis de 0.005g en el lugar de la siembra para completar 0.01g por tiesto. El Aliette® se aplicó a 0.008g en la superficie de la tierra en el tiesto que corresponde a la dosis recomendada de 5.60kg por hectárea. La evaluación de este experimento se realizó en el mes de abril 2009, cuatro meses después de la siembra y de las aplicaciones de los tratamientos en invernadero.

3.2.2 Severidad de la Enfermedad

Las raíces de las plántulas crecidas en el invernadero invernadero fueron evaluadas luego de ser lavadas bajo agua corriente por quince minutos. El porcentaje de raíces podridas se determinó mediante la observación de raíces sintomáticas del total de las raíces. Se compararon las raíces infectadas con raíces de plantas sanas.

3.2.3 Colonización de Raíces por *Bacillus subtilis*

Para determinar la colonización de *B. subtilis* en las raíces de aguacate se pesó un gramo de la raíz y se colocó en una bolsa de maceración con 10 ml de buffer de fosfato de

potasio pH 7.0 lo que corresponde a una dilución 1/10. Se maceró la raíz y esta estuvo en reposo por quince minutos. Se realizaron diluciones en serie hasta 1x 10^{-4} inoculando 1 ml en un medio específico de *B. subtilis* siguiendo la metodología descrita anteriormente (Estévez 2000; Turner y Backman, 1991). Los platos se incubaron a 28°C por 48 a 72 horas hasta observar colonias establecidas en el medio. Se contabilizaron colonias en diluciones 10^{-2} y 10^{-4} realizando dos repeticiones por planta. La dilución 10^{-2} se utilizó para calcular unidades formadoras de colonias por gramo de raíz (CFU/g raíz). Las colonias de *B. subtilis* fueron identificadas según la morfología descrita por Sneath et al. (1986) y sus características bioquímicas como tinción gram, KOH, catalasa y oxidasa (Schaad et al., 2001).

3.2.4 Colonización de Raíces por *Trichoderma harzianum*

Para aislar *T. harzianum* se obtuvieron cinco raicillas lavadas de la plántula de aguacate. Cada raicilla presentaba una repetición. Las raicillas fueron colocadas en medio rosa de bengala modificado consistiendo de 10g de glucosa, 5g de peptona, 1g de K_2HPO4, .50g de $MgSO_4$ x 7 H_2O, .033g de rosa de bengala, 15g de agar y un litro de agua destilada. Luego de la esterilización se incorporó 1.2 g de estreptomicina antes de ser servido en platos petri (Downer et al., 2001; Tsao, 1964). Los aislados se mantuvieron a temperatura ambiente (23°C) bajo luz. Se observó crecimiento de los hongos sobre las raíces y se identificaron las colonias de *T. harzianum* por sus características morfológicas según la clave de Watanabe (1994). Luego se calculó el porcentaje de infección.

3.2.5 Respiración Microbiana

Se evaluó la respiración microbiana en los medios de siembra del experimento realizado con las plántulas en invernadero en los laboratorios de Suelos de la Facultad de Ciencias Agrícolas UPR – RUM. Se utilizó la metodología de trampa de alkali para detectar el dióxido de carbono (Zibilske, 1994). Se tomaron muestras de aproximadamente 50g del medio de siembra a base de turba del área alrededor de las raíces. Se determinó el porcentaje de humedad del sustrato pesando diez gramos de cada muestra fresca y secando en un horno a 105° C por 24 horas y tomando el peso seco. El porcentaje de humedad se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = [(\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / \text{peso seco})] \times 100.$$

Se colocaron 20g de cada repetición en un frasco plástico de 25 ml. Para homogenizar la humedad en todas las muestras, se igualó al porcentaje de humedad más alto encontrado de todas las muestras. Dentro del frasco de 25 ml con el suelo se colocó otro frasco plástico de 15ml con 5 ml hidróxido de sodio (NaOH) 1.5 N. Se selló el frasco pequeño dentro del frasco grande y se incubó a 28°C por siete días. Después del tiempo de incubación se separó el NaOH con agua colocándolo en un vaso de precipitación de 35 – 40 ml mínimo, se le añadió 10ml de cloruro de bario ($BaCl_{2)}$ y cinco a diez gotas de fenolftaleína y se realizó una titulación con ácido clorhídrico (HCl) 0.5N. Con la cantidad de HCl que se utilizó para la titulación se calcularon los miligramos de CO_2 / kg de suelo (Thien y Graveel, 2003).

3.2.6 Análisis estadístico

Se realizaron ANOVAS para todos los datos y pruebas de DMS en Infostat (2009). Para el porcentaje de severidad de pudrición de raíces se realizó una transformación logarítmica de los datos que cumple con los supuestos de distribución normal de errores y homogeneidad de varianzas. Para presentar los datos se realizó una transformación exponencial para obtener los porcentajes para las gráficas.

Tabla 1. Tratamientos aplicados en vivero - Diciembre 2008

Tratamiento	Descripción	Fuente	Dosis de Aplicación
Control	Árbol solo	Semil 34 – Juana Díaz	0
Arachis glabrata	Cobertor vegetal	EEA – Juana Díaz	2 plántulas por tiesto
A. glabrata* + *B. subtilis	Companión® (i.a. *B. subtilis* GB03).	Growth Products, White Plains, NY	1.25ml/L
A. glabrata* + *T. harzianum	T-22 ™ Planter Box (i.a. *T. harzianum* Rifai strain KRL-AG2)	BioWorks, Geneva, NY	1.12kg/ha
Composta	Composta de café	EEA-Adjuntas	.45 kg/ tiesto
Aliette®	Aluminum tris (O-ethyl phosphonate)	Bayer Crop Science , Research Triangle Park, North Carolina	5.60kg/ha

Tabla 2. Composición química de la composta de café obtenida de la EEA-Adjuntas.

Reporte de Análisis de Composta		kg / Ton		
	Análisis en Seco	**Base en seco**	**En base normal**	**Disponible el primer año**
Nitrógeno orgánico, % N	3.95	35.83	10.34	2.09
Amonio, % N	0.030	0.27	0.09	0.09
Nitrato, % N	0.288	2.63	0.77	0.77
Total N (TKN), % N	4.27	38.74	2.90	2.90
Total C, % C	39.32	351.49	101.33	101.33
Total Tasa C:N	9.2			
Fósforo, % P_2O_5	0.91	8.26	2.36	1.68
Potasio, % K_2O	3.35	30.44	8.75	7.89
Azufre, % S	0.61	5.53	1.59	0.64
Calcio, %Ca	1.58	14.33	4.13	2.90
Magnesio, % Mg	0.38	3.40	1.00	0.68
Sodio, % Na	0.07	0.64	0.18	0.18
Tasa de adsorción de sodio (SAR)	1.29			
Zinc, ppm Zn	494.5	0.45	0.14	0.09
Hierro, ppm Fe	8780.6	7.98	2.31	1.59
Manganeso, ppm Mn	577.9	0.54	0.14	0.09
Cobre, ppm Cu	67.3	0.05	0.00	0.00
Sales solubles, mmho / cm	27.66	16.06	4.63	4.63
pH	6.5			
Humedad, %	71.17			
Materia seca (TS) %	28.83			

WARD Laboratories, Inc. Ag Testing – Consulting. Kearney, Nebraska
Dr. Chong – University of Puerto Rico – EEA - Adjuntas

3.3 Control Biológico de *P. cinnamomi* en Invernadero en suelo San Antón

3.3.1 Diseño Experimental

El 5 de octubre de 2009 se estableció el segundo experimento de invernadero en la Estación Experimental de Juana Díaz. Las plántulas utilizadas fueron de la variedad Ávila obtenidas de la EEA – Juana Díaz y previamente germinadas en bancos con arena esterilizada. El suelo de la serie San Antón utilizado para el experimento se obtuvo de la EEA Juana Díaz. El suelo se esterilizó con vapor a 121°C por cuatro horas durante dos días consecutivos. Los tiestos contenían 7.5 kg de suelo Se sembró en un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones por tratamiento. Todos los tratamientos fueron inoculados con *P. cinnamomi* mediante el método de grano de arroz (Holmes y Benson, 1994) excepto el control negativo. Este método consiste en mezclar 25 g de arroz blanco grano largo y 18 ml de agua destilada en un frasco de cristal. Se esterilizó en autoclave, se dejó enfriar y se separaron los granos golpeando y moviendo suavemente el envase. Se volvió a esterilizar el arroz al día siguiente y se repite la separación de granos sin abrir el frasco. Cuando se enfrió el frasco se colocaron cinco discos del aislado de *P. cinnamomi*. Para promover un crecimiento uniforme del patógeno sobre los granos de arroz y evitar que se peguen se repitió el proceso de mover el frasco diariamente hasta el momento de la inoculación. El inóculo se preparó con dos semanas de anticipación. El aislado de *P. cinnamomi* se obtuvo de un huerto infectado de la finca La Balear Castañer, Lares. Los tratamientos aplicados fueron 1) control sin inóculo (árbol de aguacate solo), 2) control inoculado con *P. cinnamomi* (árbol de aguacate con P. *cinnamomi*), 3) *A. glabrata* variedad 17097, 4) *A. glabrata* + Kodiak® i.a. *B. subtilis* GB03, 5) *A. glabrata*

con T-22™ Planter Box i. a. *T. harzianum* Rifai strain KRL-AG2, 6) Composta, y 7) Aliette® (Tabla 1). Para el tratamiento *A. glabrata* se trasplantaron 2 tallos por tiesto para los tratamientos que incluían el cobertor vegetal y a estos se le aplicó 0.05g de *Bradyrhizobium* sp. cepa NC92 en base de turba a cada tallo sembrado de *A. glabrata*. El producto Kodiak® se aplicó a una dosis determinada de 0.009g por tiesto diluido en 500mL de agua lo que estableció una población inicial de 5.4 x 10^6 CFU por tiesto. El T-22™ Planter Box i. a. *T. harzianum* se aplicó a la dosis recomendada de 2.24kg por hectárea que equivale a 0.008g por tiesto diluido en 500ml de agua destilada. Esta aplicación contenía una población inicial de 8.0 x 10^4 CFU por tiesto. La composta de café se aplicó a una dosis de 0.45kg/ ha. El Aliette® se aplicó a la dosis recomendada de 5.6kg por hectárea lo que equivale a .008g por tiesto.

3.3.2 Evaluación

El experimentó se evaluó en diciembre 2009, a los tres meses después de la aplicación de los tratamientos. Las raíces fueron lavadas bajo agua corriente por quince minutos. La severidad de pudrición de raíz se determinó según descrito anteriormente para el primer experimento de invernadero comparando el porcentaje de raíces podridas con el control negativo. En este experimento se calculó el porcentaje de infección por *P. cinnamomi* utilizando la metodología descrita anteriormente para el aislado de *P. cinnamomi* para las pruebas de antagonismo realizando quince repeticiones. El peso de raíces y vástago se obtuvo cortando la planta en el punto donde comienza la raíz y colocando las plantas en una bolsa de papel en un horno a 105°C por 72 horas. Las poblaciones de *B. subtilis* en las raíces se determinó mediante la metodología descrita anteriormente para el primer experimento en invernadero (Estévez, 2000; Turner y Backman, 1991) con la diferencia de

que se completaron cuatro repeticiones por planta. El porcentaje de colonización de raíces por *T. harzianum* se determinó siguiendo la metodología descrita para el primer experimento de invernadero con la diferencia que se realizaron quince repeticiones. La prueba de respiración microbiana se llevó a cabo utilizando la metodología de trampa de alkali para detectar el dióxido de carbono según descrita anteriormente (Zibilske, 1994) según descrita anteriormente. Las incubaciones se realizaron a una muestra por cada repetición del experimento. Debido a que el suelo utilizado para el experimento de invernadero se obtuvo de Juana Díaz de la orden San Antón se preparó el suelo con una humedad cercana a la capacidad de campo en bases gravimétricas de 31.7% de humedad (Mount y Lynn, 2004).

3.3.3 Análisis Estadístico

Para determinar diferencias entre los diferentes tratamientos se realizaron pruebas de ANOVA y DMS en Infostat® (2009). El porcentaje de pudrición de raíces se transformó a rangos para cumplir con los supuestos de distribución normal de errores y homogeneidad de varianzas.

Tabla 3. Tratamientos aplicados en experimento realizado en el invernadero en Octubre 2009.

Tratamiento	Descripción	Fuente	Dosis de Aplicación
Control	Árbol solo		
Arachis glabrata	Cobertor vegetal	EEA – Juana Díaz	2 plántulas por tiesto
A. glabrata* + *B. subtilis	Kodiak® HB (i.a. *B. subtlis* GB03)	Chemtura, Middlebury, CT	0.28kg/ ha
A. glabrata* + *T. harzianum	T-22 ™ Planter Box (i.a. *T. harzianum* Rifai strain KRL-AG2)	BioWorks, Geneva, NY	2.24kg /ha
Composta	Composta de café	EEA-Adjuntas	0.45 kg / tiesto
Aliette®	Aluminum tris (O-ethyl phosphonate)	Bayer Crop Science , Research Triangle Park, North Carolina	5.6kg/ ha

3.4 Control biológico de *P. cinnamomi*: Experimento en Campo

3.4.1 Localidad

El predio experimental está ubicado en la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz con las siguientes coordenadas geográficas: Latitud N 18˚01'811'', Longitud W 066˚31'713'' y 23m.s.n.m. Los suelos predominantes son los del orden Mollisol, de textura franco arcillosa, ligeramente ácidos y de alta fertilidad. La precipitación anual es de 114.3 cm y su temperatura promedio varía entre 21 y 28˚C.

Figura 1. Mapa del huerto de aguacate localizado en EEA – Juana Díaz.

3.4.2 Presencia de *Phytophthora* sp. en huerto de Juana Díaz

En septiembre del 2009, mediante ensayos inmunológicos ligado a enzimas (ELISA – Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay Phytophthora PathoScreen® Kit PSA 92600, Agdia, IN) se determinó la presencia de *Phytophthora* sp. en el huerto el 18 de mayo del 2006. Esta técnica de diagnóstico consiste en el uso de una placa con 96 celdas que contienen un anticuerpo específico para algunas especies para el género *Phytophthora* sp. Las raíces utilizadas para la prueba presentaban síntomas de pudrición por *P. cinnamomi*. Se utilizó 0.1 g de raíces sintomáticas en 1 ml del buffer (amortiguador) de extracción para macerar las muestras. Las muestras fueron colocadas en las celdas que contenían el anticuerpo para el patógeno y se incubaron por dos horas. Después de un enjuague con un buffer PBST se añadió 100 µl del conjugado enzimático diluido con buffer ECL a una tasa 1:100. Se repitió una incubación de dos horas y un una serie de enjuagues. Luego se colocó dentro de cada celda 100 µl de la solución PNP que es el indicador de la reacción positiva en presencia del patógeno en la muestra. Cuando la muestra es colocada en el orificio las partículas del patógeno se adhieren al anticuerpo en la placa. Este enlace es fortalecido por un conjugado enzimático. Con la adición de un sustrato ocurre un cambio de color que sirve como indicador de la presencia del patógeno adicional a una lectura mediante espectofotómetro que indica las concentraciones de las muestras, donde el control positivo tiene la concentración más alta y el control negativo la concentración más baja y se compara con las demás muestras.

3.4.3 Aplicación de los Tratamientos

El experimento estuvo dispuesto en un diseño completamente aleatorizado con 6 repeticiones por tratamiento. Cada árbol de aguacate representaba una unidad

experimental. Se utilizaron huertos previamente establecidos. El primer huerto fue sembrado para el 18 de mayo de 2006 con árboles Semil (patrón) / Semil (injerto) obtenidos de la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz y se realizaron cuatro repeticiones para cada tratamiento. El huerto adyacente fue sembrado el 6 de febrero de 2008 y consistía de árboles con la variedad Semil como patrón e injertos de diferentes variedades. En este huerto se realizaron dos repeticiones por tratamiento. Los árboles utilizados para el experimento se seleccionaron por su similitud en tamaño y apariencia para garantizar homogeneidad. En el campo se aplicaron 90.72kg de composta como tratamientos en un área de 3.05m^2 alrededor del árbol de aguacate. En los tratamientos que incluían el cobertor vegetal, *A. glabrata,* se sembraron 6 plántulas a una distancia de 2.4m del árbol. Antes de la siembra del *A. glabrata* se inoculó 10g de inoculante de *Bradyrhizobium* sp. cepa NC92 en base de turba y 4.7 g de abono. Para *T. harzianum* se aplicaron 0.08g por litro resultando en un mínimo de 2.2.x 10^7 CFU por árbol. El Integral® se aplicó a una dosis de 125ml por litro lo que resulta en una población de 3.52 x 10^{12} CFU por árbol de *B. subtilis*. Aliette® se aplicó a la dosis recomendad de 5.60kg por hectárea (Tabla 4).

Tabla 4. Tratamientos aplicados en huerto de aguacate EEA – Juana Díaz

Tratamiento	Descripción	Fuente	Dosis de Aplicación
Control	Árbol solo		
Arachis glabrata	Cobertor vegetal	EEA – Juana Díaz	6 tallos / árbol
A. glabrata + B. subtilis	Integral® A liquid biological fungicide (*B. subtilis* MBI600)	Becker Underwood, Ames, IA	1.25ml/ l
A. glabrata + T. harzianum	T-22 ™ Planter Box (i.a. *T. harzianum* Rifai strain KRL-AG2)	BioWorks, Geneva, NY	0.08g/ l
Composta	Composta de café	EEA-Adjuntas	90.72kg /árbol
Aliette®	Aluminum tris (O-ethyl phosphonate)	Bayer Crop Science , Research Triangle Park, North Carolina	5.60kg/ ha

3.4.4 Evaluación

El experimentó se evaluó entre febrero y abril 2010. Las muestras de las raicillas fueron tomadas de cuatro puntos alrededor del árbol. Las raíces se lavaron en agua corriente por quince minutos para eliminar rastros del suelo. El porcentaje de infección por *P. cinnamomi* se determinó mediante la misma metodología descrita anteriormente donde se realizaron cortes de raicillas y se sembraron en medio PARP. Para esta prueba se realizaron veinte repeticiones. Las poblaciones de *B. subtilis* y *T. harzianum* en las raíces se determinaron según descrito para el primer experimento de invernadero (Estévez, 2000; Turner y Backman, 1991) con la diferencia de que se completaron cuatro repeticiones por planta para *B. subtilis* y 20 para *T. harzianum*.

4. Resultados

4.1 Pruebas de Antagonismo

Durante las pruebas de antagonismo in vitro observamos el efecto de *B. subtilis* y *T. harzianum* sobre el crecimiento micelial de *P. cinnamomi* (Tabla 5). El tratamiento con *T. harzianum* (Root Shield®) redujo el crecimiento radial (diámetro) de *P. cinnamomi*. A los siete días *T. harzianum* degradó el micelio de *P. cinnamomi* en el aislado SG (0.00 cm) y se observó abundancia de micelio, conidióforos y conidias de *T. harzianum*. *Bacillus subtilis* (Companion®) promovió el crecimiento del aislado SG de *P. cinnamomi*, mostrando un aumento significativamente mayor al control luego de siete días. El crecimiento radial del aislado SG de *P. cinnamomi* continuó aumentando bajo el tratamiento control hasta el séptimo día. *T. harzianum* (Root Shield®) causó el mayor efecto negativo sobre el crecimiento radial del aislado 03. Aunque no controló totalmente el crecimiento de *P. cinnamomi* éste se redujo significativamente en comparación al control y a *B. subtilis* (Companion®). *Trichoderma harzianum* redujo un 38% del crecimiento en comparación al control luego de 7 días. El control presentó un crecimiento radial máximo de 8.5 cm que representa el total del diámetro del plato petri. El tratamiento de *B. subtilis* no presentó diferencia al tratamiento control, no tuvo efecto sobre el crecimiento radial de *P. cinnamomi* aislado 033.

Tabla 5. Diámetro (cm) de de crecimiento de *P. cinnamomi* (aisaldos SG y 033) en medio de harina de maíz en presencia de *T. harzianum y B. subtilis.*

Aislado SG – *P. cinnamomi*	Diámetro de colonia *P. cinnamomi* (cm)	
Tratamiento	**3 Días**	**7 Días**
Control	3.20[b]	7.72[b]
Root Shield (i.a. *T. harzianum*)	2.27[a]	0.00[a]
Companion (i.a. *B. subtilis*)	3.27[b]	8.11[c]

Aislado 033 – *P. cinnamomi*	Diámetro de colonia *P. cinnamomi* (cm)	
Tratamiento	**3 Días**	**7 Días**
Control	3.83[b]	8.50[b]
Root Shield (i.a. *T. harzianum*)	2.88[a]	3.21[a]
Companion (i.a. *B. subtilis*)	3.87[b]	8.43[b]

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$)

4.2 Control biológico de *P. cinnamomi* en Invernadero

4.2.1 Porcentaje de Pudrición de Raíces

En este experimento realizado en invernadero con medio de siembra a base de peat moss el Aliette® (Fosetyl – Al) redujo la pudrición de raíz de aguacate en comparación con el control. La pudrición de raíces en el tratamiento con Fosetyl-Al fue un 2.94% el cual fue significativamente diferente al control (9.78%) y a *A. glabrata* (16.28%) (Figura 2). No se manifestó diferencia significativa en la pudrición de raíz entre los tratamientos inoculados y no inoculados con *P. cinnamomi* aunque se denota una tendencia de mayor pudrición en tratamientos inoculados (Tabla 5 y 6). En el análisis estadístico se expresó una interacción debido a que el porcentaje de pudrición de raíz en ausencia del inóculo bajo y aplicación de

Fosetyl-Al fue más alta que en presencia del inóculo. El tratamiento *A. glabrata* presentó el porcentaje de pudrición más alto (16.28%) pero no fue significativamente diferente al control (9.78%) y al tratamiento *A. glabrata + B. subtilis* (6.55%).

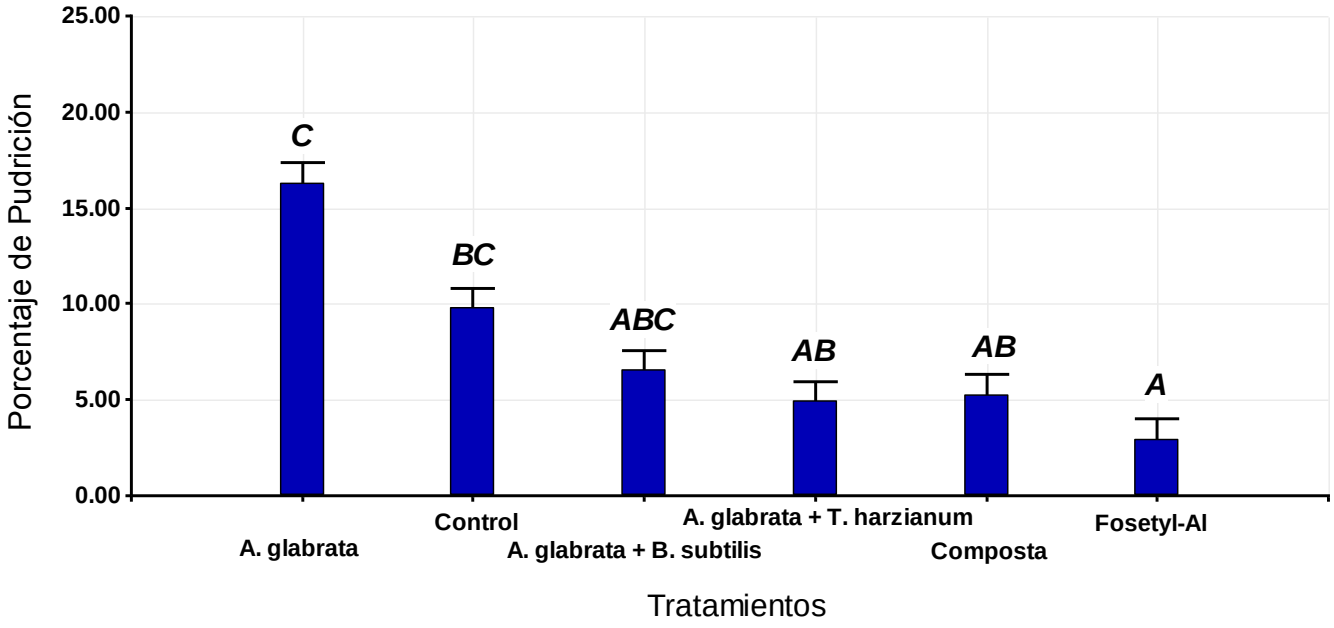


Figura 2. Severidad de pudrición de raíces de plántulas en invernadero bajo diferentes tratamientos. DMS = 1.48488 indicada por las barras finas. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$)

.

Tabla 6. Severidad de pudrición de raíces bajo diferentes tratamientos con inoculación y sin inoculación con *Phytophthora cinnamomi*. DMS = 1.48488

Tratamientos	Inóculo	Severidad % Pudrición
A. glabrata	Con	42.10 d
Control	Con	11.94 cd
A. glabrata + B. subtilis	Con	11.25 cd
A. glabrata + T. harzianum	Con	5.37 bc
Composta	Con	11.25 cd
Fosetyl-Al	Con	1.00 a
A. glabrata	Sin	6.30 bc
Control	Sin	8.00 bc
A. glabrata + B. subtilis	Sin	3.82 ab
A. glabrata + T. harzianum	Sin	4.48 bc
Composta	Sin	2.46 ab
Fosetyl-Al	Sin	8.67 bc

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

Tabla 7. Severidad de pudrición de raíz con inóculo y sin inóculo *P. cinnamomi*. DMS = 0.60620.

Inóculo Test:LSD Fisher DMS=0.60620	% Pudrición de Raíces
Sin	5.16 a
Con	8.33 a

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

4.2.2 Poblaciones de *Bacillus subtilis* en las Raíces de Aguacate

La colonización de *B. subtilis* en la raíces secundarias de los árboles de aguacate en el ensayo de invernadero presentaron diferencia entre los tratamientos inoculados y los no inoculados con *P. cinnamomi* (Tabla 8). Las poblaciones de *B. subtilis* fueron significativamente más altas en los árboles sin inocular con *P. cinnamomi (*6,000 CFU/gramo de raíz) que en los árboles inoculados (4,000 CFU/g de raíz). Todos los tratamientos utilizados presentaron poblaciones de *B. subtilis* significativamente más altas que el control. El tratamiento control presentó las poblaciones más bajas de *B. subtilis* con 1,500 CFU/ gramo de raíz. El tratamiento que exhibió la mayor población de *B. subtilis* fue el de *A. glabrata* con 8,500 CFU por gramo de raíz de aguacate (Figura 3).

Tabla 8. Poblaciones de *Bacillus subtilis* en presencia y ausencia de *Phytophthora cinnamomi* en plántulas de raíces de aguacate en invernadero. DMS = 7.21491

Inóculo Test:LSD Fisher DMS=7.21491	**cfu/g raiz (Mediana)**
Sin	6000 b
Con	4000 a

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

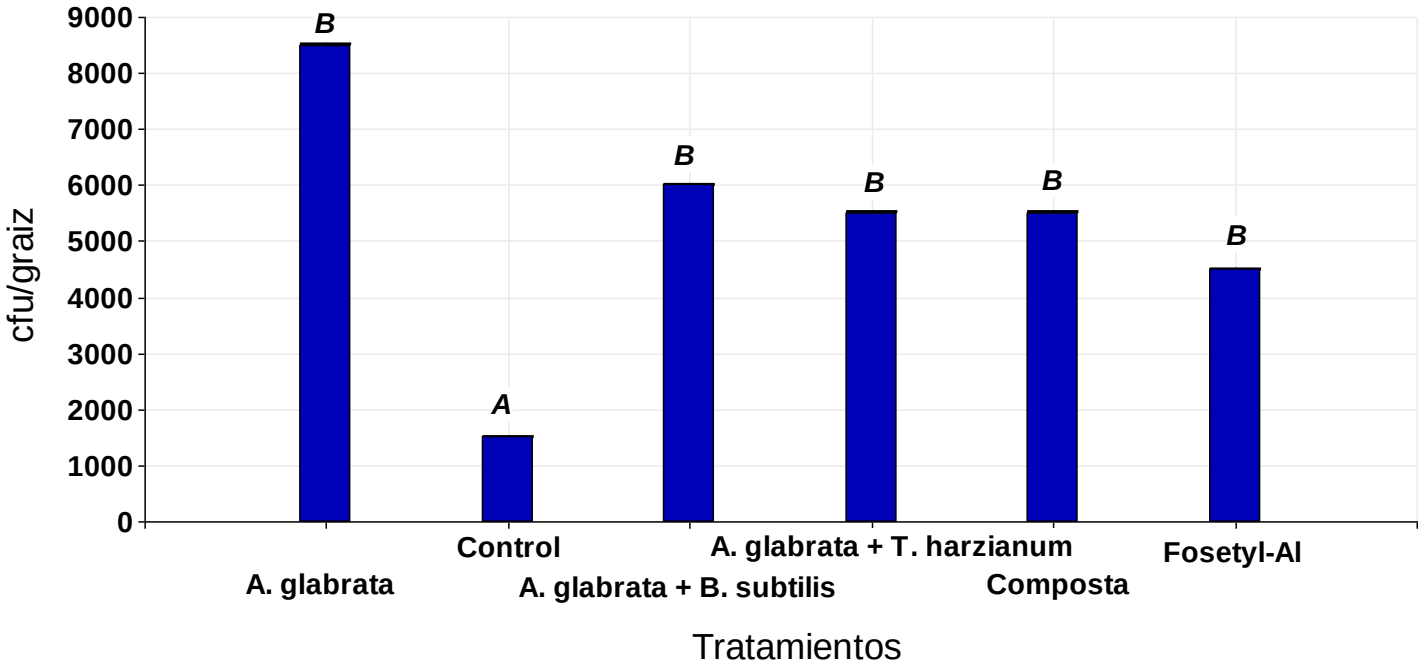


Figura 3. Poblaciones de *Bacillus subtilis* en raíces de plántulas de aguacate. DMS = 12.49658.
Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

4.2.3 Porcentaje de Colonización por *Trichoderma harzianum*

Ninguno de los tratamientos exhibió diferencia en el porcentaje de colonización de raíces por *T. harzianum* (Figura 4). La aplicación del producto comercial Root Shield® i. a. *T. harzianum* no contribuyó a la colonización de raíces de las plántulas de aguacate por *T. harzianum* en comparación con los demás tratamientos incluyendo el control.

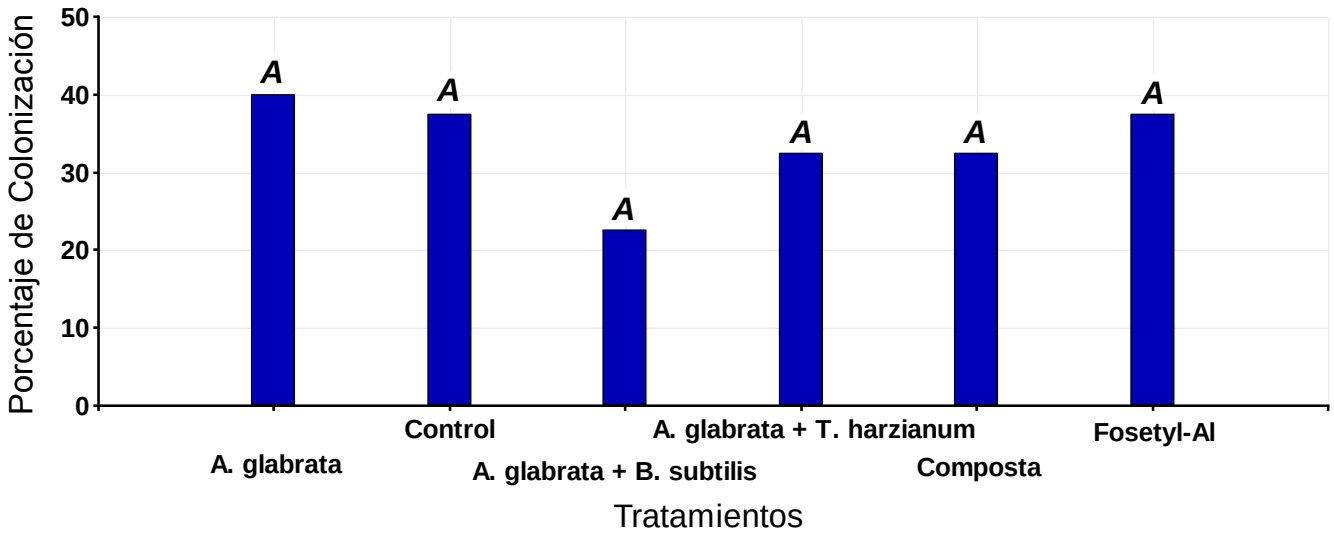


Figura 4. Porcentaje de colonización de raíces de aguacate por *Trichoderma harzianum*. DMS = 26.23707. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$)

4.2.4 Respiración Microbiana

Durante los 28 días de incubación se observó un aumento en respiración microbiana en todos los tratamientos (Figura 5). Se observaron diferencias significativas a partir de la segunda semana de incubación con el tratamiento *Arachis* + *T. harzianum* (5,195.60 mg CO_2 / kg suelo) exhibiendo la respiración microbiana más alta. El tratamiento de composta presentó la respiración microbiana más baja con 2,702.20 mg CO_2 / kg suelo. A los 28 días de incubación se observó que el tratamiento con mayor respiración microbiana fue el de *Arachis* + *T. harzianum* con 9802.05 mg CO_2 / kg suelo este fue significativamente mayor al tratamiento de Composta de café (6,954.23 mg CO_2 / kg suelo) pero no al control (8,467.20 mg CO_2 / kg suelo). El tratamiento de composta expresó la respiración microbiana más baja siendo significativamente diferente a los tratamientos *A. glabrata* + *B.*

subtilis (8,938.76 mg CO_2 / kg suelo), *A. glabrata* (9,609.59 mg CO_2 / kg suelo) y *A. glabrata + T. harzianum* (9,802.05 mg CO_2 / kg suelo). En la Tabla 9 se observan las tasas de respiración microbiana lo que representa un promedio del cambio en la respiración microbiana en general por tratamiento durante las cuatro semanas de incubación. Se observa la misma tendencia que en la respiración microbiana acumulativa donde *A. glabrata + T. harzianum* exhibe la tasa de respiración más alta entre todos los tratamientos con 343.09 mg CO_2 / kg suelo significativamente mayor al tratamiento de composta que presenta la tasa de respiración más baja (243.31 mg CO_2 / kg suelo).

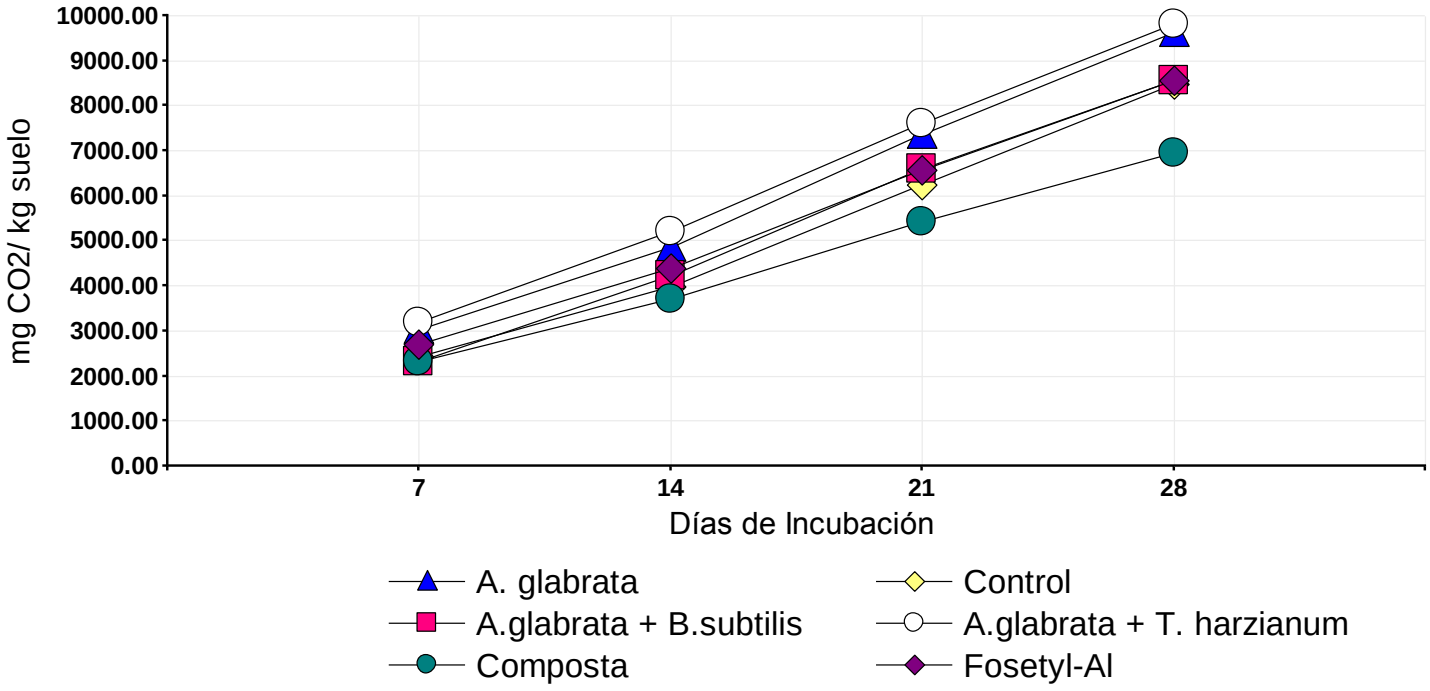


Figura 5. Respiración microbiana acumulativa en medio de siembra de plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos. ***Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)***

Tabla 9. Tasa de respiración microbiana en medio de siembra con plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos. LSD Fisher. Alfa=0.05 DMS=58.72081

Tratamientos	Tasa de Respiración Microbiana mg CO_2 / kg suelo
A. glabrata* + *T. harzianum	343.09 b
A. glabrata	336.36 b
A. glabrata* + *B. subtilis	305.74 b
Fosetyl-Al	299.52 ab
Control	296.36 ab
Composta	243.31 a

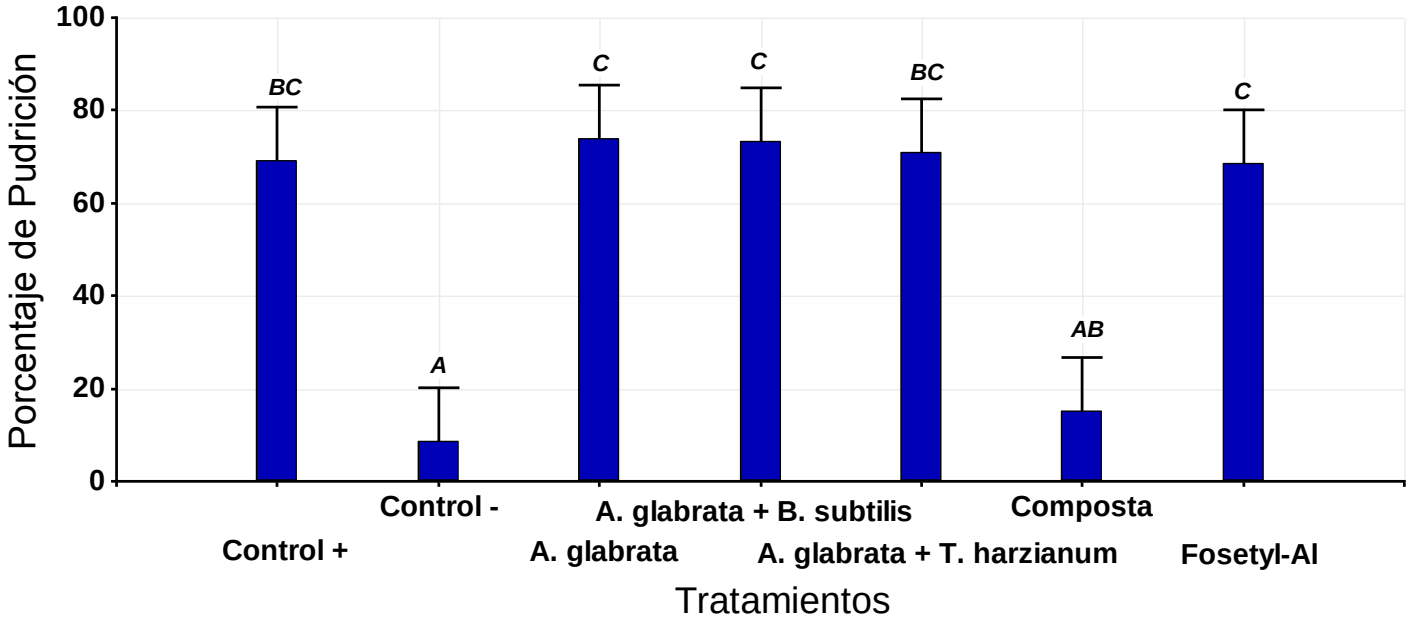
Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$)

4.3 Control biológico de *P. cinnamomi* en Invernadero en suelo San Antón

4.3.1 Porcentaje de Pudrición de Raíces

En el experimento de invernadero donde las plántulas fueron sembradas en suelo pasteurizado del orden San Antón de la EEA Juana Díaz, el tratamiento con composta (15%) fue el más efectivo en reducir la pudrición de raíz al no presentar diferencia significativa al control negativo (8.60%) (Figura 6). El tratamiento que presentó mayor pudrición de raíces fue *A. glabrata* (74%) seguido por el tratamiento *A. glabrata* + *B. subtilis* (73%) y Aliette® (68%) exhibiendo una pudrición significativamente alta en comparación con el control negativo y el tratamiento de composta.

Figura 6. Severidad de pudrición de raíces en plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos.



Todos los tratamientos fueron inoculados con *Phytophthora cinnamomi* excepto el control negativo. DMS=11.60072. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$)

4.3.2 Porcentaje de infección de raíces por *Phytophthora cinnamomi*

En el porcentaje de infección por *P. cinnamomi* no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos (Figura 7). Todos los tratamientos presentaron menos de un 50% de infección por el patógeno. El tratamiento con el menor porcentaje de infección fue el de composta con 5% seguido por el control negativo con 19%. El tratamiento con mayor porcentaje de infección por *P. cinnamomi* fue *A. glabrata + T. harzianum* con 39% seguido por *A. glabrata + B. subtilis* con 36%.

4.3.3 Peso Seco

El tratamiento con mayor peso seco de raíces fue el de composta con un promedio de 2.08g, seguido por el control negativo con 1.90g y *A. glabrata + B. subtilis* con 1.40g (Tabla 10). El tratamiento de composta y el control negativo fueron significativamente diferentes al control positivo (0.41g), *A. glabrata* (0.51g), Aliette (0.71g) y *A. glabrata + T. harzianum* (0.91g). El control positivo (0.41g) exhibió el menor peso seco de raíces. No se observó diferencia significativa en el peso de vástago bajo los diferentes tratamientos. El tratamiento con el mayor peso seco del vástago fue el control negativo con 8.64g seguido por el tratamiento de composta con 7.81g. El tratamiento de Aliette presentó el menor peso seco con 4.13g.

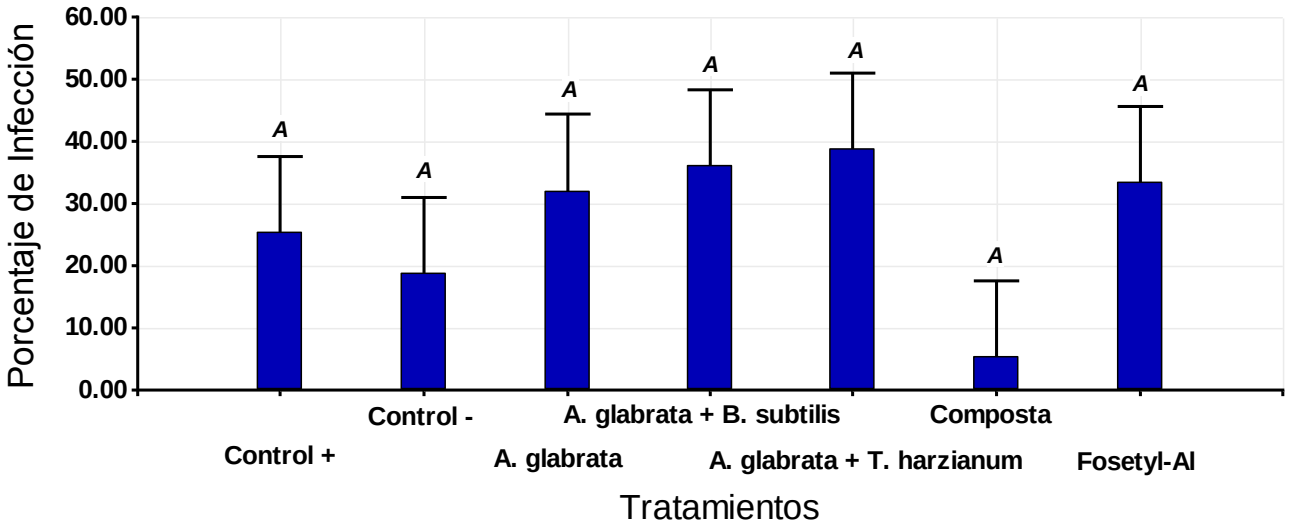


Figura 7. Porcentaje de infección por *Phytophthora cinnamomi* en plántulas de aguacate. LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=12.33147. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

Tabla 10. Peso seco de raíces y vástago de plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos. LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.93536 (Raiz) DMS=3.08532 (Vástago)

Peso Seco (g) de Raíces y Vástago de Plántulas de Aguacate en Invernadero.		
Tratamientos	**Raíces**	**Vástago**
Composta	2.08 c	7.81 a
Control -	1.90 c	8.64 a
A.glabrata* + *B.subtilis	1.40 bc	6.13 a
A. glabrata* + *T. harzianum	0.91 ab	5.14 a
Fosetyl-Al	0.71 ab	4.13 a
Arachis glabrata	0.51 ab	5.69 a
Control +	0.41 a	5.06 a

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

4.3.4 Poblaciones de *Bacillus subtilis* en las raíces de plántulas en Invernadero

Se encontró diferencia en las poblaciones de *B. subtilis* en las raíces de las plántulas de aguacate en invernadero (Figura 8). El tratamiento presentando las poblaciones más altas fue el control positivo con 554,200 cfu/g raíz manifestando diferencia significativa a los demás tratamiento excepto al *Arachis glabrata* + *B. subtilis* con 281,200 cfu/g raíz. El tratamiento de Aliette presentó las poblaciones más bajas (39,750 cfu/g raíz).

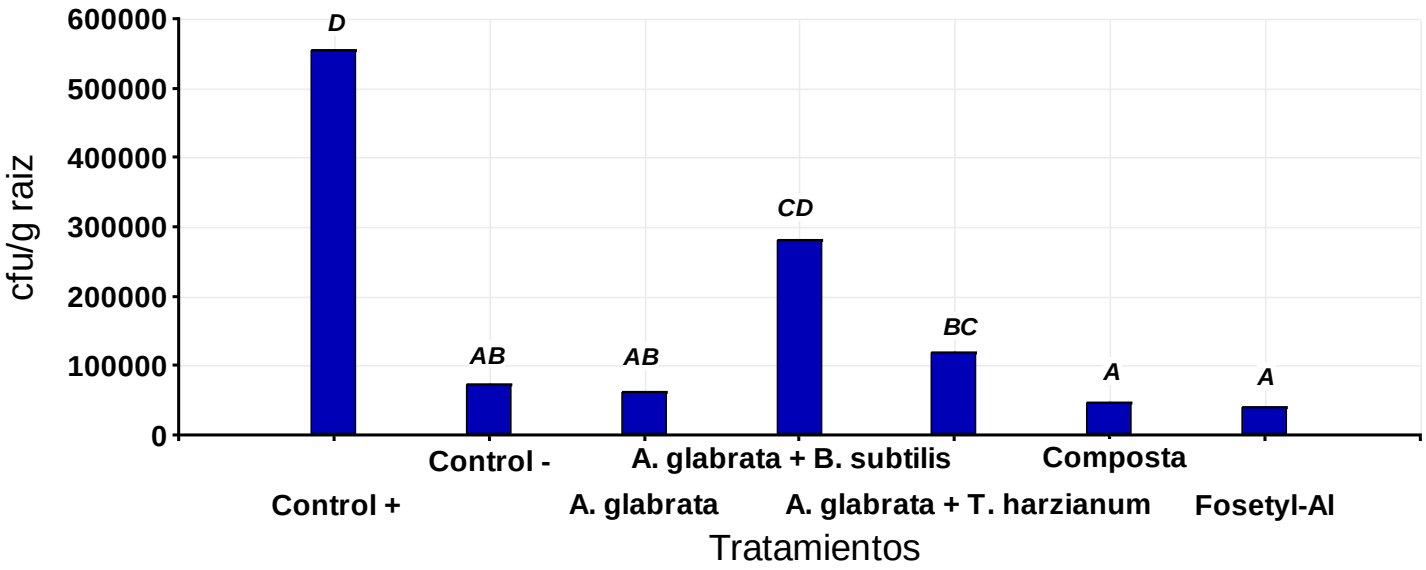


Figura 8. Poblaciones de *Bacillus subtilis* en plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos Alfa=0.05 DMS=1.01601. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$)

4.3.5 Respiración Microbiana

No se observó diferencia significativa en la respiración microbiana acumulativa durante los días de incubación bajo ninguno de los tratamientos (Figura 9). A los siete días se observó que el tratamiento con la mayor respiración microbiana fue Aliette (101.49 mg CO_2 / kg suelo) y el tratamiento con la menor respiración microbiana *A. glabrata* + *B. subtilis* (46.99 mg CO_2 / kg suelo). La tendencia observada para la cuarta semana de incubación fue *A. glabrata* (327.01 mg CO_2 / kg suelo) con la mayor respiración microbiana, seguido por el control positivo (307.97 mg CO_2 / kg suelo). Los tratamientos con menor respiración microbiana fueron control negativo (249.64 mg CO_2 / kg suelo) y *A. glabrata* + *T. harzianum* (295.89 mg CO_2 / kg suelo). En la tasa de respiración microbiana no se observó diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 11). Se observó un aumento en la respiración en todos los tratamientos al pasar los días de incubación. El tratamiento con la mayor tasa de respiración fue el *Arachis glabrata* (12.30 mg CO_2 / kg suelo) y la tasa de respiración más baja la obtuvo el control negativo (9.58 mg CO_2 / kg suelo).

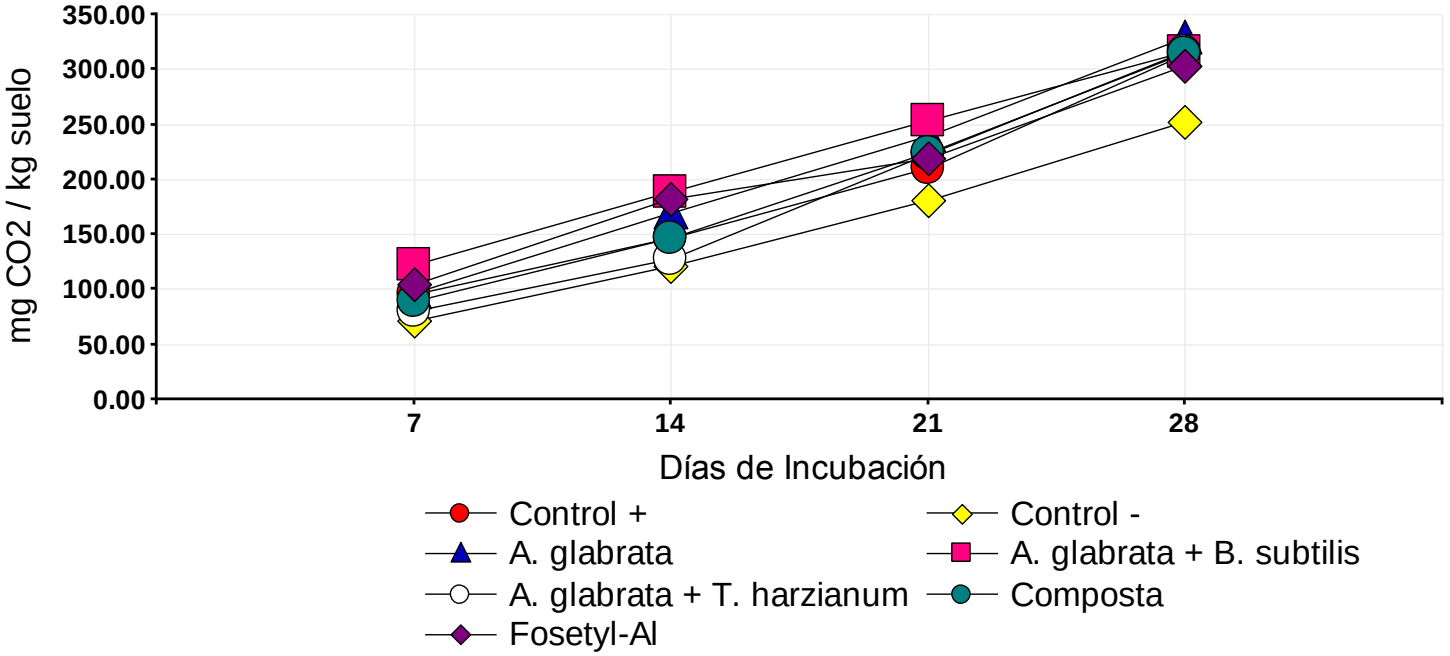


Figura 9. Respiración microbiana en suelos de plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

Tabla 11. Tasa de respiración microbiana de suelos de plántulas de aguacate bajo diferentes tratamientos. LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.39702

Tratamientos	Tasa de Respiración Microbiana mg CO_2 / kg suelo
A. glabrata	12.30 a
A. glabrata* + *B. subtilis	11.47 a
Composta	11.36 a
Control +	11.36 a
Fosetyl-Al	11.13 a
A. glabrata* + *T. harzianum	11.13 a
Control -	9.50 a

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

4.4 Experimento de Campo

Las pruebas de ELISA realizadas en septiembre de 2009 indicaron que en el huerto de aguacate sembrado el 18 de mayo del 2006 dieciséis de los 24 árboles resultaron positivos para *Phytophthora* sp.

Al evaluar el porcentaje de infección por *P. cinnamomi* en las raíces de árboles de aguacate en el campo no se observó diferencia significativa entre tratamientos (Figura 10). Aliette (0%) exhibió el porcentaje de infección más bajo, seguido por *A. glabrata + B. subtilis* (2.50 %) y *A. glabrata* (9.17%). El tratamiento que presentó el mayor porcentaje de infección fue *A. glabrata + T. harzianum* (16.67%). El control presentó un 12.50% de pudrición y el tratamiento de composta 10.83%.

Los tratamientos aplicados en el campo no mostraron diferencia significativa sobre las poblaciones de *B. subtilis* en las raíces de los árboles de aguacate (Figura 11). El tratamiento *A. glabrata + B. subtilis* exhibió la población más alta con 64,791.67 cfu / g raíz. El tratamiento con la población más baja fue *A. glabrata* (26,166.67 cfu / g raíz). Ninguno de los tratamientos contribuyó a aumentar las poblaciones de *T. harzianum* en las raíces de aguacate bajo los diferentes tratamientos aplicados en el campo como se puede apreciar en la Figura 12. Se observa una tendencia hacia una mayor población de *T. harzianum* en el tratamiento de composta con 17.50% de colonización en comparación con el control con 2.50% a pesar de no revelar diferencia significativa.

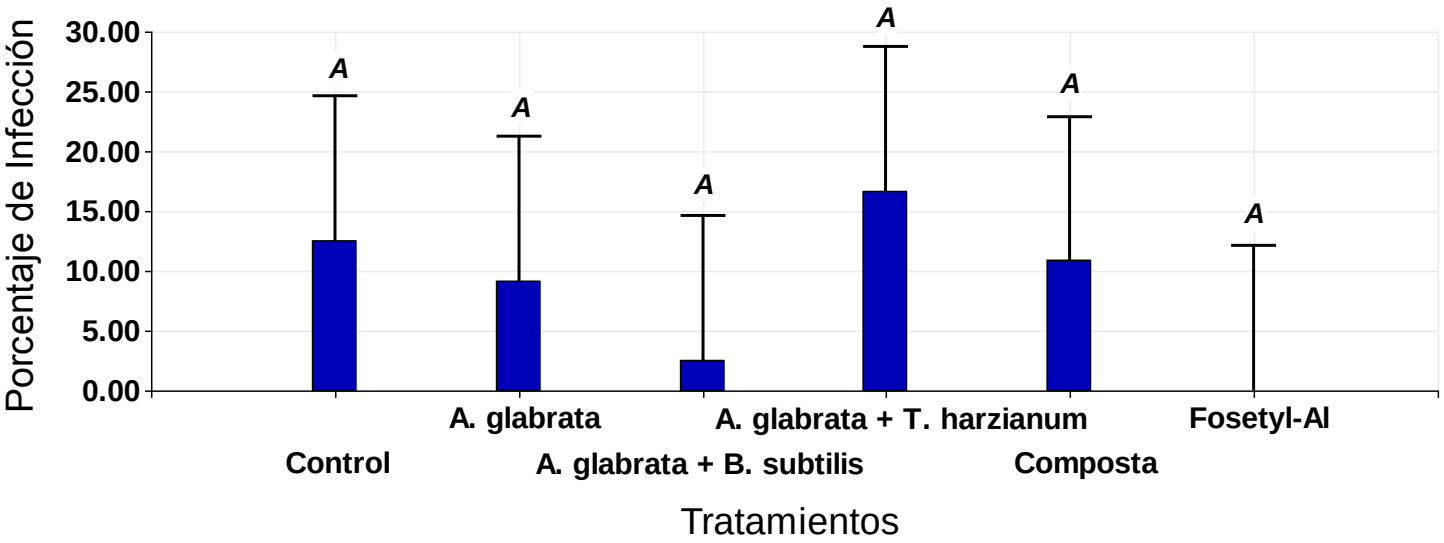


Figura 10. Porcentaje de infección por *Phytophthora cinnamomi* en huerto de aguacate. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

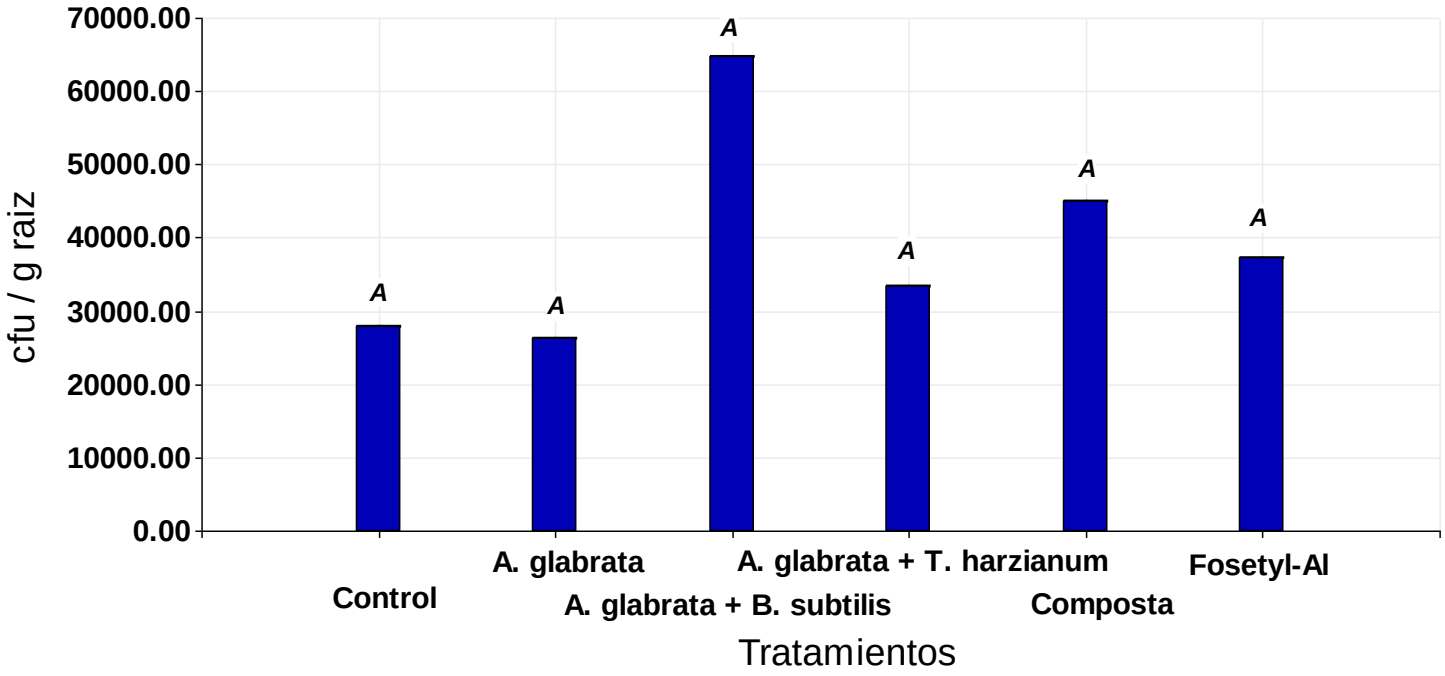


Figura 11. Poblaciones de *Bacillus subtilis* en raíces de árboles de un huerto de aguacate. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

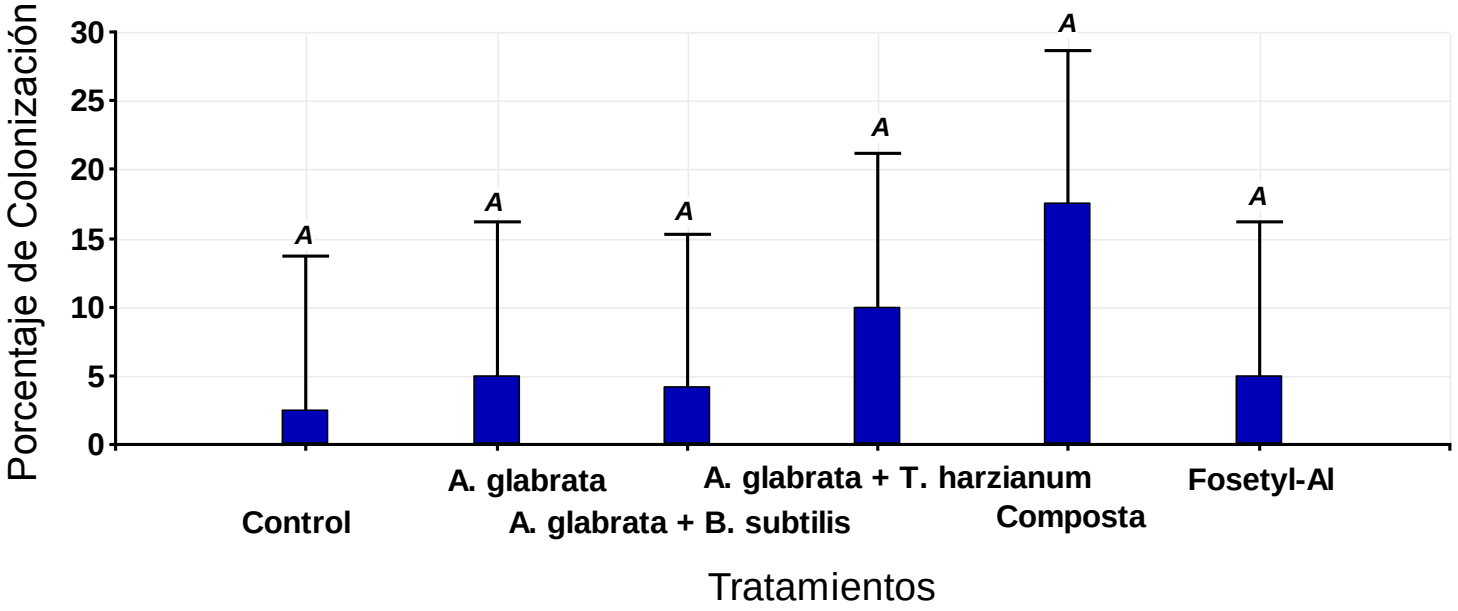


Figura 12. Porcentaje de colonización de raíces de árboles en un huerto de aguacate por *Trichoderma harzianum*. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

5. Discusión

En el experimento de antagonismo realizado en el laboratorio se observó que el control biológico Root Shield® (i.a. *T. harzianum*) fue el tratamiento más efectivo en reducir de manera significativa el crecimiento radial de *P. cinnamomi*. *Trichoderma harzianum* degradó el micelio del aislado SG de *P. cinnamomi* a los siete días. Aryantha y Guest (2006) encontraron que el modo de acción más observado en pruebas de antagonismo in vitro era el de antibiosis, lisis y micoparasitismo en varios aislados de *Gliocladium* sp. y en un aislado de *Trichoderma* sp. La antibiosis se observó como una zona de inhibición. Micoparasitismo se refiere a enrollamiento, penetración y contacto directo con crecimiento paralelo a la hifa del hospedero (Aryantha y Guest, 2006). En las pruebas de antagonismo se observó una degradación del micelio de *P. cinnamomi* causada por una aparente antibiosis y lisis en presencia de *T. harzianum*, además de micoparasitismo. Aryantha y Guest (2006) observaron lisis momentos antes de que *Gliocladium* sp. o *Trichoderma* sp. hicieran contacto con *P. cinnamomi*. Benhamou y Chet, (1993) indican que ocurrió colapso y pérdida de turgor de la hifa de *Rhizoctonia solani* a los 6 días después de la inoculación con *T. harzianum*, antes de que ocurriera el daño de la hifa el antagonista se adhería alrededor de hospedero. En esta investigación se sugiere que el proceso micoparasítico entre *T. harzianum* y *R. solani* no es resultado de difusión de substancias producidas por el antagonista sino más bien que las interacciones entre superficies celulares de los hongos parece ser crucial para la inhibición del patógeno (Benhamou y Chet, 1993).

En el primer experimento realizado en el invernadero el control químico Aliette resultó ser el tratamiento más efectivo en reducir la pudrición de raíces, presentando diferencia significativa al control y *A. glabrata*. Además de reducir la pudrición de raíces, Aliette no tuvo efecto negativo sobres las poblaciones microbianas según lo observado por las poblaciones de *B. subtilis*, *T. harzianum* y la respiración microbiana. El tratamiento con mayor porcentaje de pudrición fue *A. glabrata* con 16.28%, significativamente mayor a Aliette, *A. glabrata* + *T. harzianum* y composta. A pesar de que el tratamiento *A. glabrata* presentó el porcentaje de pudrición más alto este promovió altas poblaciones de *B. subtilis*, *T. harzianum* y una respiración microbiana alta en comparación con otros tratamientos. La presencia de *A. glabrata* aparenta promover la actividad microbiana en general.

Las poblaciones de *B. subtilis* fueron más bajas en las plántulas inoculadas con *P. cinnamomi.* Esto puede ser indicativo de que *P. cinnamomi* fue más agresivo en competir por colonizar la raíz, lo que redujo la colonización de *B. subtilis*. Berger y colaboradores (1996) encontraron que a mayor densidad del patógeno la efectividad de *B. subtilis* se reduce; sin embargo a una baja densidad del patógeno este tratamiento demuestra efectividad similar a los fungicidas. *Trichoderma harzianum* colonizó la raíz y en el tratamiento con *A. glabrata* ocurrió un 40% la colonización. Esto no presentó diferencia significativa entre tratamientos, indicando que la aplicación del control biológico no fue efectiva en aumentar las poblaciones de este hongo beneficioso aunque no fue afectado por la presencia de *P. cinnamomi*. Se observa un menor porcentaje de colonización por *T. harzianum* en el tratamiento *A. glabrata + B. subtilis* lo que se puede deber a competencia por la presencia de la bacteria o compuestos liberadas por la misma.

Los resultados de las pruebas de respiración microbiana indican que los tratamientos que incluían *A. glabrata* promueven una mayor actividad microbiana a pesar de no establecer un ambiente supresivo. El tratamiento de composta exhibió respiración microbiana más baja que los tratamientos que incluían el cobertor vegetal *A. glabrata*. A pesar de que no fue significativamente diferente al control es interesante este hallazgo debido a que se esperaba que la composta siendo una enmienda orgánica promoviera una mayor actividad microbiana y a su vez creara un ambiente supresivo para el patógeno. Downer et al. (2001) encontraron que a pesar de que una enmienda orgánica presentaba alta producción enzimática, lo que se esperaba promoviera supresividad de *P. cinnamomi,* esta actividad no se movilizó al suelo subyacente. Se conoce que la actividad microbiana es limitada por la disposición de nutrientes. Hoitink y Boehm (1999) indican que los controles biológicos requieren de una fuente de materia orgánica que sostenga su actividad antagonista ya que los exudados de las raíces y productos de la rizósfera no proveen suficiente energía para sostener el efecto del biocontrol. Es importante comprender que una concentración alta de nutrientes también puede estimular poblaciones del patógeno que sobrepasen los efectos de las condiciones supresivas (Chen et al., 1988). Esto apoya los hallazgos de los tratamientos con *A. glabrata*. Los cobertores vegetales y abonos verdes se han reportado como altamente efectivos en aumentar la proporción de microorganismos inhibidores de patógenos aumentando la densidad y diversidad de microorganismos en el suelo después de ser integrados al suelo (Pérez et al., 2008). Sin embargo se puede atribuir un aumento en las poblaciones microbianas antes de la incorporación del cobertor por el efecto los exudados liberados de las raíces del mismo durante su desarrollo (Abawi y Widmer, 2000).

En el segundo experimento en invernadero el control positivo presentó diferencia significativa al control negativo en la pudrición de raíces demostrando la efectividad de la inoculación con *P. cinnamomi* con el método de grano de arroz. El tratamiento con composta no presentó diferencia significativa al control negativo en severidad de pudrición mostrando que los dos tratamientos causan un menor porcentaje de pudrición de raíces. Estos dos tratamientos presentaron baja severidad y porcentaje de raíces infectadas y alto peso seco de raíces. Los demás tratamientos presentaron más de un 50% de pudrición de raíces. Se observa la efectividad del tratamiento de composta en reducir la pudrición y a la vez aportar a una mejor salud de la planta en general al contribuir a un mayor peso de las raíces. Este tratamiento sin embargo no presentó diferencias en las poblaciones de *B. subtilis* ni en la respiración microbiana que indiquen que su efectividad se debió a la presencia de microorganismos beneficiosos para la planta y antagonistas al patógeno. En este experimento a diferencia del primer experimento el tratamiento Aliette no presentó efectividad en reducir los síntomas de pudrición. Nuevamente el tratamiento de *A. glabrata, A. glabrata + B. subtilis y A. glabrata + T. harzianum*, presentaron alta severidad de la enfermedad.

El control negativo y la composta no presentaron diferencia significativa a los demás tratamientos en el porcentaje de raíces infectadas. Esto significa que a pesar de la presencia de *P. cinnamomi* el tratamiento de composta redujo o suprimió el efecto del patógeno sobre las raíces. El hecho de que el control negativo tenga poblaciones de *P. cinnamomi* es indicativo de que las plántulas utilizadas para los dos experimentos contenían poblaciones establecidas del patógeno desde su germinación.

Se observa que las poblaciones de *B. subtilis* para todos los tratamientos fueron mucho más altas en el segundo experimento donde se utilizó suelo esterilizado que en el primer experimento donde se utilizó promix. En el primer experimento las poblaciones fueron de 10^3 mientras que las poblaciones en el segundo experimento las poblaciones fueron de 10^5. Berger y colaboradores (1996) indican que se obtuvo buen control de sanchocho de semilla con unas poblaciones de *B. subtilis* entre 10^5 y 10^6. El suelo estéril en comparación con el medio de siembra artificial creó un ambiente propicio para el *B. subtilis*. Esto se puede deber a la falta de competencia con otros microorganismos en el suelo estéril (Backman et al., 1994; Berger et al., 1996). En esta investigación el tratamiento que presentó la población más alta de *B. subtilis* fue el control positivo y este fue significativamente diferente a todos los demás tratamientos excepto *A. glabrata* + *B. subtilis*. Esto resulta contrario a lo encontrado en el primer experimento donde los tratamientos inoculados presentaron poblaciones más bajas que los tratamientos no inoculados. Se observa entonces una población alta de *B. subtilis* en el control positivo y en el tratamiento de *A. glabrata* con *B. subtilis* pero esto no contribuyó a disminuir la pudrición de raíces bajo este tratamientos. El tratamiento de composta aumentó las poblaciones de *B. subtilis* al ser comparadas con el control negativo indicando que su efectividad en este experimento no se debe a poblaciones significativas de esta bacteria antagonista. Las poblaciones de *T. harzianum* fueron afectadas de manera negativa ya que no se logró aislar de las raíces de las plántulas bajo ninguno de los tratamientos en el experimento realizado con suelo estéril.

En ambos experimentos de invernadero se observó que los tratamientos con mayor respiración microbiana incluían *A. glabrata*, y *A. glabrata* + *T. harzianum*. En el primer

experimento de invernadero *A. glabrata* presentó el mayor porcentaje de pudrición. En el segundo experimento de invernadero los tratamientos que incluían *A. glabrata* presentaron mayor porcentaje de pudrición que el control negativo. Aryantha et al., (2000) encontraron que los niveles más altos de actividad biológica total bajo un tratamiento de gallinaza compostada coincidían con las poblaciones más altas de *P. cinnamomi* esto resalta que la respiración microbiana incluye la respiración del patógeno En el primer experimento de invernadero se utilizó un medio de siembra a base de turba y se observa una respiración de carbono mucho más alta de la obsrevada en suelo normal. Amador y Jones (1993) reportan valores similares de respiración de carbono en suelos provenientes de turba.

En el experimento de campo Aliette redujo la infección por *P. cinnamomi*. A pesar de no haber diferencia significativa se obtuvo un 0% de infecdción por *P. cinnamomi* de las muestras de las raíces bajo este tratamiento. También se puede observar como la aplicación del tratamiento de *B. subtilis* aportó a las poblaciones de esta bacteria según una tendencia observada a pesar de no presentar diferencia significativa estadística. Las poblaciones de *T. harzianum* no se vieron afectadas de manera significativa por ninguno de los tratamientos. La tendencia que se observa es que el tratamiento composta y *A. glabrata + T. harzianum* tuvieron las poblaciones más altas de *T. harzianum* aunque no de manera significativa.

6. Conclusiones

1. El tratamiento Root Shield® i. a. *Trichoderma harzianum* presentó un fuerte antagonismo en pruebas in vitro en el laboratorio y altos niveles de respiración microbiana en invernadero. No obstante en el invernadero y en el campo no se observó un efecto antagónico sobre las poblaciones de *P. cinnamomi* ni una reducción en la pudrición de raíces por efecto del producto.

2. Los tratamientos con controles biológicos no fueron exitosos en reducir la pudrición de raíz en las plántulas de aguacate en invernadero o en el campo.

3. La composta mostró ser una alternativa de manejo para uso en invernadero al mostrar efectividad en reducir la pudrición de raíz en plántulas de aguacate y aportar significativamente al desarrollo de las raíces.

4. La respiración microbiana fue efectiva en indicar actividad microbiana sin embargó esta prueba no fue indicativa de condiciones supresivas para el desarrollo de *P. cinnamomi* en invernadero.

7. Recomendaciones

Se recomienda que se continúen estudios en condiciones de campo con los controles biológicos, cobertores vegetales y composta de café para determinar su efectividad en un manejo integrado a largo plazo. Estudiar campos en Puerto Rico que no presenten síntomas de muerte regresiva y pudrición de raíces en presencia de *P. cinnamomi,* para determinar condiciones supresivas sería muy útil. Adicionalmente se recomienda determinar otras características en la rizósfera tales como biomasa, actividad enzimática y actividad microbiana a base de hidrólisis de diacetato de fluoresceína para determinar características que favorecen el desarrollo del cultivo de aguacate mientras se crea un ambiente supresivo a *Phytophthora cinnamomi*.

8. Referencias

Abawi, G. y Widmer, T. 2000. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. Applied Soil Ecology 15: 37-47.

Amador, J. A y Jones, R. D. 1993. Nutrient limitations on microbial respiration in peat soils with different total phosphorus content. Soil Biology and Biochemistry 25: 793-801.

Armistead, R. 2008. The impact of *Phytophthora cinnamomi* on the yellow-footed antechinus (mardo) (*Antechinus flavipes leucogaster*) (Marsupialia: Dasyuridae). Ph. D. Thesis. Murdoch University, Australia.

Aryantha, I.P., Cross, R. y Guest, D.I. 2006. Mycoparasitic and Antagonistic Inhibition on *Phytopthora cinnamomi* Rands by microbial agents isolated form manure composts. Plant Pathology Journal 5: 291-298.

Aryantha, I.P., Cross, R. y Guest, D.I. 2000. Supression of *Phytophthora cinnamomi* in potting mixes amended with uncomposted and composted animal manures. Phytopathology 90: 775-782.

Backman, P.A., Brannen, P.M., Mahaffee, W.F. 1994. Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. In: Ryder, M.H., Stephens, P.M., Bowen, G.D. (Eds.). Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria. CSIRO, Adelaide, Australia. Pp. 3-8.

Baise, H. P., Fall, R. y Vivanco, J. M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidpsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology 134: 307-319.

Berger, F., Li, H., White, D., Frazer, R., and Leifert, C. 1996. Effect of pathogen inoculums, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* Cot1 in high-humidity fogging glasshouses. Phytopathology 86: 428-433.

Brannen, P. M. y Kenney, D. S. 1997. Kodiak® - a successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 19: 169-171.

Broadbent, P. y Baker, K. 1974. Behaviour of Phytophthora cinnamomi in soils suppressive and conducive to root rot. Aust. J. agric. Res. 25: 121-137.

Chen, W., Hointink, H. A. J. y Madden, L. V. 1988. Microbial activity and biomass in container media for predicting suppresiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. Phytopathology 78: 1447-1450.

Cook, B.G., Pengelly, B.C., Brown, S.D., Donnelly, J.L., Eagles, D.A., Franco, M.A., Hanson, J., Mullen, B.F., Partridge, I.J., Peters, M. y Schultze-Kraft, R. 2005. Tropical Forages: an interactive selection tool., [CD-ROM], CSIRO, DPI&F(Qld), CIAT and ILRI, Brisbane, Australia.

Coffey, M.D. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. In Plant Diseases of International Importance. Vol. 3. Diseases of Fruit Crops. J. Kumar, H. S. Chaube, U. S. Singh and A. N. Mukhopadhyay (eds.). Prentice Hall, Englewood Cliffs.

Coffey, M.D. 1987. *Phytophthora* Root rot of Avocado An Integrated Approach to Control in California. Plant Disease 71(11): 1046-1052.

Coffey., M. D. y Campbell, S. D. y Guillemet, F. B. 1984. Chemical control of *Phytophthora cinnamoi* on Avocado rootstocks. Plant Disease 68: 956-958.

Costa, J. L., Menge, J. A. y Casale, W. L. 2000. Biological control of *Phytophthora* root rot of avocado with microorganisms grown in organic mulches. Brazilian Journal of Microbiology 31: 239-246.

Departamento de Agricultura. Oficina de Estadísticas Agrícolas © 2010. Estado Libre Asociado de Puerto Rico. www.gobierno.pr/NR/rdonlyres/EF6A0AB0-8FA4-43AE-AF8B-2D69674A0DB1/0/EscritoIngresoBrutoAgricola200809.pdf

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

Erwin, D.C. y Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press. St. Paul Minnesota. Pp. 177 – 183.

Eskridge, K. M. 1995. Statistical Analysis of Disease Reaction Data Using Nonparametric Methods. HortScience 30: 478 – 480.

Estación Experimental Agrícola. 1998. Conjunto Tecnológico de Producción de Aguacate. Universidad de Puerto Rico. Rio Piedras, Puerto Rico. 1998.

Estevez de Jensen, C. 2000. Etiology and control of dry bean root rot in Minnesota. Ph.D. Thesis. University of Minnesota, St. Paul, MN.

FAO. 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. http://www.fao.org/corp/statistics/en/

Foreign Agricultural Service. 2008. Market News Avocado Update. United States Department of Agriculture.
http://www.fas.usda.gov/htp/horticulture/Avocados/2008_Avocado_Article.pdf

French, E. C., Prine, G. M. y Blount, A. R. 2006. Perenial Peanut: an alternative forage of growing importance. SS-AGR-39. University of Florida. http://edis.ifas.ufl.edu

Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopahtology 96: 190-194.

Hoitink, H. A. J. y Boehm, M. J. 1999. Control within the context of soil microbial communities: A substrate dependent phenomenon. Annual Review of Phytopatholy 37: 427-446.

Holmes, K. A., and Benson, D. M. 1994. Evaluation of *Phytophthora parasitica* var. nicotianae as a biocontrol for *Phytophtora parasitica* on *Catharanthus roseus*. Plant Disease 78: 193-199.

Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87(1): 4-10.

Huguenin, B. B., Boher, B., Haury, A. y Laville, E. 1975. Etude de *Phytophthora* cinnamomi de lávocatier au Cameroun. (Study on *Phytophthora cinnamomi* on avocado in Cameroun.) Fruits 30: 525-533.

Ibar, L. 1979. Cultivo del aguacate, chirimoyo, mango, papaya. Editorial Aedos, España: 9 – 120.

InfoStat (2009). InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Joshi, R. y McSpadden Gardener, B. B. 2006. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. Phytopathology 96: 145-154.

Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J. P., Thonart, P. y Ongena, M. 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. Molecular Plant-Microbe Interactions 22: 456-468.

Kannwischer, M. E., y Mitchell, D.J. 1978. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. Phytopathology 68: 1760-1765.

Kavroulakis, N., Papadopoulou, K. K., Ntougias, S., Zervakis, G. I. y Ehaliotis, C. 2006. Cytological and other aspects of pathogenesis – related gene expression in tomato plants grown on a suppressive compost. Annals of Botany 98: 555-564.

Kloepper, J. W., Ryu, C.-M. y Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94: 1259-1266.

Köller, Wolfram. 1992. Target Sites of Fungicide Action. CRC Press. Florida, USA. Pp. 78 – 83.

Litz, R.E., Raharjo, S.H.T. y Gómez – Lim, M.A. 2007. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Volume 60. Transgenic Crops V. Edited by E.C. Pua and M.R. Davey. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Liyanage, L. V. K., Jayasundara, H. P. S. y Gunasekera, T. G. L. G. 1988. Potential uses of nitrogen-fixing tres on small coconut plantations in Sri Lanka. In: Multipurpose tree species for small-farm use. Proceedings of an International Workshop in Pattaya, Thailand.

Marais, L. J., Menge, J. A., Bender, G. S. y Faber, B. 2002. *Phytophthora* Root Rot. AvoResearch Focused Research – Global Collaboration – Maximum Yields. California Avocado Commission.

Matheron, M. E., y Matejka, J. C. 1988. Persistence of systemic activity for fungicides applied to citrus trunks to control *Phtyophthora* gummosis. Plant Disease 72: 170-174.

Matheron, M. E., y Porchas, M. 2000. Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl-Al, and metalaxyl on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three Phytophthora spp. Plant Dis. 84: 454-458.

Medina-Gaud, S., Segarra-Carmona, A.E. y Franqui, R.A. 1991. The avocado lacewing bug, *Pseudocysta perseae* (Heidemann) (Hemiptera:Tingidae), in Puerto Rico. Research Note. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 75: 185-188.

Menge, J.A. 1998. Strategies to control *Phytophthora cinnamomi* root rot of avocado. http://cesandiego.ucdavis.edu/bender/p%20cinnamomi%20root%20rot.htm.

Menge, J.A., Crowley, D., Crowley, M., Pond, E., Borneman, J., Mckee, B., Faber, B., Bender, G., Mauk, P., Downer, J., Clark, P. y McDonald, V. 2000. Biocontrol of *Phytophthora* Root rot of Avocado with Mulch and Biocontrol Agents. http://www.avocadosource.com/ARAC/Sumposium_2000/18mengebio.htm Department of Plant Pathology, UC Riverside.

Messenger, B.J., Menge, J. A. y Pond, E. 2000. Effects of gypsum soil amendments on avocado growth, soil drainage, and resistance to *Phytophthora cinnamomi*. Plant Disease 84: 612 – 616.

Morton, J. 1987. Avocado. p. 91–102. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL.

Mount, H. R., y Lynn, W. C. 2004. Soil survey laboratory data and soil descriptions for Puerto Rico an the U. S. Virgin Islands. United States Department of Agriculture, Natural

Resources Conservation Service, National Soil Survey Center, Soil Survey Investigations Report No. 49. Pp. 161-162.

National Agricultural Statistics Service. 2004. Census of Agriculture 2002 - Puerto Rico. United States Department of Agriculture. Vol.1 Geographic Area Series Part 52. http://www.agcensus.usda.gov/Publications/2002/Outlying_Areas/cenpr02.pdf

Ouimette, D. G. y Coffey, M. D. 1989. Phosphonate levels in avocado (*Persea americana)* seedlings and soil following treatment with fosetyl-Al or potassium phosphonate. Plant Disease 73: 212-215.

Pérez, C., Dill-Macky, R. y Kinkel, L. L. 2008. Management of soil microbial communities to enhance populations of *Fusarium graminearum* – antagonists in soil. Plant Soil 302: 53-69.

Rands, R. D. 1922. Streepkanker van kaneel, veroorzaakt door *Phytophthora cinnamomi* n. sp. (Stripe canker of cinnamon caused by *Phytophthora cinnamomi* n. sp.). Meded. Inst. Plantenziekt. 54:41.

Ruiz Rosado, M. 1991. Methods of assessment for resistance of avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi* in Puerto Rico. M.S. Tesis. Univerisidad de Puerto Rico, Mayaguez. Pg. 26.

Salazar-Garcia, S. y Lazcano-Ferrat, I. 2003. Site-specific fertilization increased yield and fruit size in Hass avocado. Better Crops International. Vol.17:1.

Schaad, N. W., Jones, J. B. y Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. Pg. 3.

Schnϋrer, J. y Rosswall, T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. Applied Environmental. Microbioly 43: 1256-1261.

Smith, R. y Franzen, Dave. 2007. Evaluating, preparing and amending lawn and garden soil. NDSU Extension Service. North Dakota State University Fargo, ND.

Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. y Holt, J. G. 1986. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology Volume 2. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland. Pp. 1104, 1105, 1130,1127

Sotomayor-Ramirez, D., Espinoza, Y. y Rámos-Santana, R. 2006. Short-term tillage practices on soil organic matter pools in a tropical Ultisol. Australian Journal of Soil Research 44: 687-693.

Thien, S. J. y Graveel, J. G. 2003. Laboratory manual for Soil Science – Agricultural & Environmental Principles. Eighth Edition. McGraw Hill, New York, NY. Pp. 181 – 196.

Torres – Ordoñez, B. 2009. Relación entre propiedades del suelo y el efecto de cobertores vegetales, en aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis Maestro en Ciencias. Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez: 39-53.

Torres Ordoñez, B., Estévez de Jensen, C., Snyder, V. y Vázquez, M. 2006. Relationship between vegetative covers and soil physical properties of one Mollisole in the *Phytophthora cinnamomi* occurrence in Avocado *Persea americana* Mill., in Puerto Rico. Poster Presentation. CFCS.

Tsao, P. H. 1964. Effect of certain fungal isolation agar media on *Thielaviopsis basicola* and on its recovery in soil dilution plates. Phytopathology 54: 548 – 555.

Turner, J. T., y Backman, P. A. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. Plant Disease 75: 347-353.

United States Department of Agriculture Soil Conservation Service. 1979. General soil map Ponce area of southern Puerto Rico. College of Agricultural Sciences University of Puerto Rico, Mayaguez Campus.

United States Department of Agriculture. 2009. Census of Agriculture 2007. Puerto Rico Island and Municipio Data. Vol. 1. Geographic Area Series. Part 52.

Watanebe, T. 1994. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Lewis Publishers (CRC Press LLC). Boca Ratón, Fl, USA.

Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology 22: 837-845.

Weindling, R. 1941. Experimental consideration of the mold toxin of *Gliocladium* and *Trichoderma*. Phytopathology 31: 991-1003.

Weindling, R. y Emerson, O. H. 1936. The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. Phytopathology: 1068-1070.

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

Zhang, W., Dick, W. A., y Hoitink, H. A. J. 1996. Compost – induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. Phytopathology 86: 1066 – 1070.

Zibilske, L. M. 1994. Carbon Mineralization. In Methods of Soil Analysis, Part 2. Micbrobiological and Biochemical Properties. SSSA, Madison, Wisconsin. Pp. 835-837.

9. Apéndice

9.1 Análisis Estadístico

9.1.1 Pruebas de Antagonismo In Vitro

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
SG Día 3	18	0.82	0.80	7.97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.75	2	1.88	34.88	<0.0001
Tratamiento	3.75	2	1.88	34.88	<0.0001
Error	0.81	15	0.05		
Total	4.56	17			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Log SG Día7	18	1.00	1.00	2.10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19.13	2	9.57	10171.62	<0.0001
Tratamiento	19.13	2	9.57	10171.62	<0.0001
Error	0.01	15	9.4E-04		
Total	19.15	17			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
RANG_033 Dia3	18	0.69	0.65	33.11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	326.08	2	163.04	16.48	0.0002
Tratamiento	326.08	2	163.04	16.48	0.0002
Error	148.42	15	9.89		
Total	474.50	17			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
033 Dia 7	18	0.99	0.99	3.47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	110.61	2	55.31	1017.40	<0.0001
Tratamiento	110.61	2	55.31	1017.40	<0.0001
Error	0.82	15	0.05		
Total	111.43	17			

9.1.2 Primer Experimento de Invernadero

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
log[%]	48	0.50	0.34	55.09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	38.06	11	3.46	3.23	0.0038
trt	14.13	5	2.83	2.64	0.0394
inoc	2.86	1	2.86	2.67	0.1108
trt*inoc	21.06	5	4.21	3.93	0.0061
Error	38.60	36	1.07		
Total	76.65	47			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
RANG_cfu/graiz	48	0.40	0.22	50.30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3684.75	11	334.98	2.21	0.0366
Tratamiento	2255.19	5	451.04	2.97	0.0241
Inoculo	858.52	1	858.52	5.65	0.0229
Tratamiento*Inoculo	571.04	5	114.21	0.75	0.5901
Error	5467.25	36	151.87		
Total	9152.00	47			

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² Aj	CV
% colonizacion	48	0.27	0.04	76.66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8825.00	11	802.27	1.20	0.3229
trt	1575.00	5	315.00	0.47	0.7956
inoc	1008.33	1	1008.33	1.51	0.2277
trt*inoc	6241.67	5	1248.33	1.86	0.1250
Error	24100.00	36	669.44		
Total	32925.00	47			

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² Aj	CV
C7	47	0.35	0.15	25.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8841123.03	11	803738.46	1.73	0.1072
trt	4613506.27	5	922701.25	1.99	0.1051
inoc	349513.03	1	349513.03	0.75	0.3917
trt*inoc	3864501.19	5	772900.24	1.66	0.1694
Error	16264043.06	35	464686.94		
Total	25105166.10	46			

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² Aj	CV
C14	47	0.43	0.25	21.19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	23412825.09	11	2128438.64	2.41	0.0239
trt	12015953.62	5	2403190.72	2.72	0.0355
inoc	172857.25	1	172857.25	0.20	0.6612
trt*inoc	11228999.95	5	2245799.99	2.54	0.0462
Error	30960272.17	35	884579.20		
Total	54373097.26	46			

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² Aj	CV
C21	47	0.43	0.25	20.27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	48772460.98	11	4433860.09	2.42	0.0232
trt	25211587.68	5	5042317.54	2.75	0.0337
inoc	1460841.06	1	1460841.06	0.80	0.3781
trt*inoc	22340770.82	5	4468154.16	2.44	0.0536
Error	64144124.01	35	1832689.26		
Total	112916584.99	46			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
C28	47	0.45	0.27	18.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	75480675.55	11	6861879.60	2.58	0.0164
trt	41698220.10	5	8339644.02	3.13	0.0194
inoc	856616.39	1	856616.39	0.32	0.5742
trt*inoc	33106088.87	5	6621217.77	2.49	0.0499
Error	93207946.36	35	2663084.18		
Total	168688621.91	46			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Tasa de Respiración	24	0.47	0.33	13.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	25358.30	5	5071.66	3.25	0.0291
Tratamiento	25358.30	5	5071.66	3.25	0.0291
Error	28123.34	18	1562.41		
Total	53481.64	23			

9.1.3 Segundo Experimento de Invernadero

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
RANG_severidad	35	0.37	0.23	49.75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1293.90	6	215.65	2.69	0.0345
Tratamiento	1293.90	6	215.65	2.69	0.0345
Error	2245.10	28	80.18		
Total	3539.00	34			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
RANG_% Infección	34	0.24	0.07	53.44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	750.90	6	125.15	1.43	0.2395
Tratamiento	750.90	6	125.15	1.43	0.2395
Error	2361.60	27	87.47		
Total	3112.50	33			

Peso Seco de Raíces

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Raíces	35	0.48	0.37	63.75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13.53	6	2.25	4.33	0.0033
Tratamiento	13.53	6	2.25	4.33	0.0033
Error	14.60	28	0.52		
Total	28.12	34			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Vástago	35	0.33	0.18	39.14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	77.05	6	12.84	2.26	0.0660
Tratamiento	77.05	6	12.84	2.26	0.0660
Error	158.81	28	5.67		
Total	235.86	34			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
log[cfu/g raiz]	34	0.60	0.51	6.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	23.74	6	3.96	6.66	0.0002
Tratamiento	23.74	6	3.96	6.66	0.0002
Error	16.03	27	0.59		
Total	39.77	33			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
log[Dia 7]	32	0.08	0.00	22.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.05	6	0.34	0.37	0.8884
Tratamiento	2.05	6	0.34	0.37	0.8884
Error	22.82	25	0.91		
Total	24.87	31			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
log[Dia 14]	32	0.24	0.06	5.84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.66	6	0.11	1.31	0.2896
Tratamiento	0.66	6	0.11	1.31	0.2896
Error	2.11	25	0.08		
Total	2.78	31			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
log[Dia 21]	32	0.09	0.00	6.46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.31	6	0.05	0.43	0.8543
Tratamiento	0.31	6	0.05	0.43	0.8543
Error	2.98	25	0.12		
Total	3.29	31			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
log[Dia 28]	32	0.08	0.00	5.12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.19	6	0.03	0.38	0.8854
Tratamiento	0.19	6	0.03	0.38	0.8854
Error	2.12	25	0.08		
Total	2.31	31			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Tasa respiracion	32	0.06	0.00	34.44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	22.02	6	3.67	0.28	0.9418
Tratamiento	22.02	6	3.67	0.28	0.9418
Error	329.63	25	13.19		
Total	351.65	31			

9.1.4 Experimento de Campo

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
% Infección	36	0.27	0.15	119.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1180.56	5	236.11	2.25	0.0751
Tratamiento	1180.56	5	236.11	2.25	0.0751
Error	3150.00	30	105.00		
Total	4330.56	35			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
RANG_cfu / g raiz	36	0.17	0.03	56.11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	652.33	5	130.47	1.21	0.3281
Tratamiento	652.33	5	130.47	1.21	0.3281
Error	3232.67	30	107.76		
Total	3885.00	35			

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
% Colonizacion	36	0.22	0.09	141.31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	928.47	5	185.69	1.72	0.1613
Tratamiento	928.47	5	185.69	1.72	0.1613
Error	3245.83	30	108.19		
Total	4174.31	35			