

Estudio

Fitosanitario y fisiológico

DEL CULTIVO DE CEBOLLA DE BULBO
EN EL ÁREA DE INFLUENCIA DEL DISTRITO DE RIEGO
DEL ALTO CHICAMOCHA - BOYACÁ

Rodolfo Alfonso Gamboa Becerra

Gabriel Ricardo Cifuentes Osorio

Andrea Wilches Torres



UB Universidad de Boyacá

CENTRO DE INVESTIGACIONES PARA EL DESARROLLO -CIPADE-
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Gamboa Becerra, Rodolfo Alfonso

Estudio fitosanitario y fisiológico del cultivo de cebolla de bulbo en el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha - Boyacá / Rodolfo Alfonso Gamboa Becerra, Gabriel Ricardo Cifuentes Osorio, Andrea Wilches Torres. -- Tunja : Ediciones Universidad de Boyacá, 2014.

188 páginas ; 24 cm.

Incluye bibliografía.

ISBN 978-958-8642-51-2

1. Cebolla cabezona - Cultivo - Alto Chicamocha (Boyacá, Colombia) 2. Cebolla cabezona - Enfermedades y plagas - Alto Chicamocha (Boyacá, Colombia) 3. Abonos y fertilizantes
I. Cifuentes Osorio, Gabriel Ricardo II. Wilches Torres, Andrea III. Tit.

635.25 cd 21 ed.

A1438897

CEP-Banco de la República-Biblioteca Luis Ángel Arango

Estudio **F**itosanitario y
isiológico
DEL CULTIVO DE CEBOLLA DE BULBO
EN EL ÁREA DE INFLUENCIA DEL DISTRITO DE RIEGO
DEL ALTO CHICAMOCHA - BOYACÁ

GRUPO DE INVESTIGACIÓN
Gestión Ambiental

Investigadores

RODOLFO ALFONSO GAMBOA BECERRA
GABRIEL RICARDO CIFUENTES OSORIO
ANDREA WILCHES TORRES

UB Universidad de Boyacá
CENTRO DE INVESTIGACIONES PARA EL DESARROLLO - CIPADE-
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

RODOLFO ALFONSO GAMBOA BECERRA

Licenciado en Ciencias de la Educación Biología y Química

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

Magíster en Docencia de la Química

Universidad Pedagógica Nacional

Director de Posgrados. Facultad de Ciencias e Ingeniería

Universidad de Boyacá

Profesor Asociado

Universidad de Boyacá

Vinculado desde el año 1994 como profesor de tiempo completo en las áreas de Biología Celular y Química Analítica. Ha sido Director del Departamento de Biología y Microbiología

GABRIEL RICARDO CIFUENTES OSORIO

Licenciado en Ciencias de la Educación Biología y Química.

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

Especialista en Química Ambiental.

Universidad Industrial de Santander

Magíster en Ciencias Ambientales.

Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano

Director de Investigaciones. Facultad de Ciencias e Ingeniería.

Universidad de Boyacá

Profesor Titular.

Universidad de Boyacá.

Vinculado desde el año 1995 como profesor de tiempo completo en las áreas de Química General y Química Ambiental. Ha sido Director del Departamento Química y Bioquímica y Jefe de los Laboratorios de Química y Bioquímica y Análisis Ambiental.

ANDREA WILCHES TORRES

Química de Alimentos

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

MSc. Bioquímica

Universidad Nacional de Colombia

(c) PhD. Ciencias-Química

Universidad Nacional de Colombia

Profesor Asociado

Universidad de Boyacá

Vinculada desde el año 2007 como docente del Departamento de Química y Bioquímica en las áreas de Biología Molecular, Química y Bioquímica. Se ha desempeñado como Coordinadora del Semillero de Investigación IMAN – Investigación en Modelos Animales- de la Facultad de Ciencias e Ingeniería.

© Los autores

Rodolfo Alfonso Gamboa Becerra,
Gabriel Ricardo Cifuentes Osorio, Andrea Wilches Torres

RECTORA

Dra. Rosita Cuervo Payeras

VICERRECTOR ACADÉMICO

Ing. Rodrigo Correal Cuervo

VICERRECTOR DESARROLLO INSTITUCIONAL

Ing. Andrés Correal Cuervo

VICERRECTORA INVESTIGACIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Ing. Claudia Patricia Quevedo Vargas

VICERRECTORA EDUCACIÓN VIRTUAL

Ing. Carmenza Montañez Torres

CORRECCIÓN DE TEXTO Y ESTILO,

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN

División de Publicaciones

©

EDICIONES

UNIVERSIDAD DE BOYACÁ

Carrera 2ª Este N° 64-169

TEL.: (8) 7452742 - 7450000

Ext. 3106

www.uniboyaca.edu.co

informa@uniboyaca.edu.co

publicaciones@uniboyaca.edu.co

TUNJA-BOYACÁ-COLOMBIA

ISBN: 978-958-8642-51-2

Primera impresión: abril de 2014

Oferta nacional: 100

Reimpresión: abril de 2015

Oferta nacional: 100

Esta edición y sus características gráficas son propiedad de la

UB Universidad de Boyacá

© 2015

Queda prohibida la reproducción parcial o total de este libro, por medio de cualquier proceso reprográfico o fónico, especialmente fotocopia, microfilme, offset o mimeógrafo (Ley 23 de 1982).

DOI: <https://doi.org/10.24267/9789588642512>

PRESENTACIÓN

En marco del convenio interinstitucional establecido entre la Gobernación de Boyacá y la Universidad de Boyacá, se adelantó un estudio sobre la cebolla de bulbo, que da como producto la presente publicación, que expone los fundamentos del tema abordado y los resultados de la experiencia investigativa.

El cultivo de cebolla de bulbo, es muy importante en la economía boyacense, debido a que es la principal hortaliza cultivable. Dentro del departamento, la mayor tasa de producción se encuentra en el Distrito de Riego del Alto Chicamocha (DRAC), ya que las condiciones ambientales que ofrece son apropiadas para el desarrollo del cultivo; además, el Distrito se encuentra ubicado cerca de los sitios de comercialización del producto, lo que permite fortalecer su condición financiera.

Esta condición se encuentra afectada por la presencia de un diverso número de plagas y enfermedades que afectan el cultivo de cebolla, causando detrimento en su calidad y producción, siendo los hongos causantes de la mayoría de daños, especialmente *Sclerotium cepivorum* agente etiológico de la pudrición blanca, enfermedad limitante del cultivo debido a su difícil control por sus características de propagación y diseminación. La pudrición blanca, produce pérdidas económicas importantes por la presencia de estructuras de resistencia del hongo, llamadas *esclerocios*, que pueden permanecer viables en el suelo por veinte años en ausencia del cultivo de cebolla.

Este tipo de experiencias de trabajo investigativo conjunto entre la Universidad, el Estado y el Productor, favorece la generación de conocimiento desde los grupos de investigación con intervención de los entes territoriales, quienes fijan las políticas de desarrollo de las regiones y el cultivador que pone en práctica los resultados obtenidos y mejora las condiciones de producción.

Claudia Patricia Quevedo Vargas

Vicerrectora de Investigación Ciencia y Tecnología

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	17
Antecedentes históricos del cultivo cultivo de cebolla de bulbo	23
Cebolla de bulbo (<i>Allium cepa</i> L.)	30
Zona de estudio: distrito de riego del alto Chicamocha	55
Municipios pertenecientes al DRA	56
Cuantificación de la densidad de inóculo	58
Caracterización fisiológica	59
Pruebas de antagonismo	61
Pruebas in vitro de biocontrol	61
Determinación de la densidad poblacional para los diferentes grupos fisiológicos	63
Evaluación de la actividad enzimática	67
Evaluación de extractos vegetales	71
Cuantificación de la densidad de inóculo y viabilidad de esclerocios	78
Según la caracterización fisiológica	79
Según aislamiento de biocontroladores	93
Pruebas de antagonismo	95
Según microorganismos celulolíticos por municipio	106
Según microorganismos nitrificantes por municipios	110
Según microorganismos solubilizadores de fosfato (bacterias), por municipio	117
Según el recuento de microorganismos proteolíticos por municipios	121
Según la correlación entre los grupos de microorganismos nitrificantes y proteolíticos	126
Según la correlación entre los grupos de microorganismos con algunos parámetros fisicoquímicos de los suelos	127

Cuantificación de la actividad enzimática de los suelos	129
Cuantificación de la evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales, sobre <i>Sclerotium cepivorum in vitro</i>	150
Análisis del estudio	162
Bibliografía	182

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de cebolla de bulbo.	31
Figura 2. Sintomatología típica de la pudrición blanca causada por el hongo <i>Sclerotium cepivorum</i>	38
Figura 3. Cepa de <i>Sclerotium cepivorum</i> en agar PDA34	39
Figura 4. Mapa del departamento de Boyacá, indicando la localización del DRAC.	56
Figura 5. Procesamiento de Solubilizadoras de Fosfato	64
Figura 6. Procesamiento de Celulolíticos	65
Figura 7. Procesamiento de Proteolíticos	66
Figura 8. Procesamiento de Nitrificantes	67
Figura 9. Procedimiento Actividad Celulasa	68
Figura 10. Procedimiento Actividad Proteasa	69
Figura 11. Procedimiento Actividad Fosfatasa Ácida	70
Figura 12. Diagrama de flujo para la evaluación de los extractos vegetales	71
Figura 13. Obtención de extractos vegetales siguiendo el método Soxhlet modificado.	73
Figura 14. Diseño metodológico de la determinación de actividad antifúngica según Llerena y modificada por los autores	74
Figura 15. Diseño metodológico para la evaluación de la actividad antifúngica	76
Figura 16. Diseño metodológico para determinación del porcentaje de germinación.	77

Figura 17. Número de esclerocios aislados en los 5 municipios evaluados del Distrito de Riego del Alto Chicamocha	78
Figura 18. Número de esclerocios aislados en cada lote y viabilidad de estos	79
Figura 19. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 3.9 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	80
Figura 20. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 4.8 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	80
Figura 21. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 5.9 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	81
Figura 22. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 6.9 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	82
Figura 23. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 7.5 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	82
Figura 24. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 7.9 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	83
Figura 25. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 8.9 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	84
Figura 26. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de glucosa 0.0 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	85
Figura 27. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de glucosa 0.05 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	85
Figura 28. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de glucosa 0.145 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	86
Figura 29. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de glucosa 0.25 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	87
Figura 30. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de glucosa 0.5 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	87
Figura 31. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de NaCl 0.0 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	88

Figura 32. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de NaCl 0.145 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	89
Figura 33. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de NaCl 1.0 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	89
Figura 34. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto del oxígeno del medio ambiente para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	90
Figura 35. Porcentaje de germinación de esclerocios a temperatura de 15°C, para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8. ...	91
Figura 36. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la temperatura de 20°C para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	92
Figura 37. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la temperatura de 25°C para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8	92
Figura 38. Número de esclerocios aislados según municipio	93
Figura 39. Número de esclerocios aislados en cada lote y viabilidad de estos	94
Figura 40. Enfrentamiento de <i>Trichoderma sp</i> con <i>Sclerotium cepivorum</i>	99
Figura 41. Enfrentamiento de <i>Clonostachys rosea</i> con <i>Sclerotium cepivorum</i>	99
Figura 42. Esquema de lectura en cámara de Neubauer	103
Figura 43. Número de esclerocios degradados y no degradados para cada uno de los tratamientos y sus controles	104
Figura 44. Esclerocios no degradados	105
Figura 45. Esclerocios degradados	106
Figura 46. Recuento de microorganismos celulolíticos en el municipio de Sogamoso	107
Figura 47. Recuentos de microorganismos celulolíticos en el municipio de Tibasosa	108
Figura 48. Recuento de microorganismos celulolíticos en el municipio de Nobsa	108

Figura 49. Recuento de microorganismos celulolíticos en el municipio de Paipa	109
Figura 50. Recuento de microorganismos celulolíticos en el municipio de Firavitoba	110
Figura 51. Curva de calibración de trabajo	111
Figura 52. Recuento de microorganismos nitrificantes en el municipio de Sogamoso.	112
Figura 53. Recuento de microorganismos nitrificantes en el municipio de Tibasosa	113
Figura 54. Recuento de microorganismos nitrificantes en el municipio de Firavitoba	114
Figura 55. Recuento de microorganismos nitrificantes en el municipio de Paipa	115
Figura 56. Recuento de microorganismos nitrificantes en el municipio de Nobsa	116
Figura 57. Recuento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato de Tibasosa	117
Figura 58. Recuento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato de Firavitoba	118
Figura 59. Recuento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato de Sogamoso	119
Figura 60. Recuento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato de Paipa	119
Figura 61. Recuento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato de Nobsa	120
Figura 62. Recuento de Microorganismos Proteolíticos de Sogamoso	122
Figura 63. Recuento de Microorganismos Proteolíticos de Tibasosa	122
Figura 64. Recuento de Microorganismos Proteolíticos de Firavitoba	123
Figura 65. Recuento de Microorganismos Proteolíticos de Paipa	124

Figura 66. Recuento de Microorganismos Proteolíticos de Nobsa	124
Figura 67. Recuento de microorganismos proteolíticos según municipios	125
Figura 68. Distribución de los microorganismos proteolíticos y nitrificantes según municipios	126
Figura 69. Recuento de los microorganismos solubilizadores de fosfato BSF según municipios	127
Figura 70. Relación entre el pH vs Materia Orgánica, según el municipio	128
Figura 71. Curva de Calibración actividad Celulasa	130
Figura 72. Actividad Celulasa Municipio de Tibasosa	131
Figura 73. Actividad Celulasa Municipio de Sogamoso	132
Figura 74. Actividad Celulasa Municipio de Nobsa	133
Figura 75. Actividad Celulasa Municipio de Firavitoba	135
Figura 76. Actividad Celulasa Municipio de Paipa	136
Figura 77. Curva de calibración actividad fosfatasa ácida	137
Figura 78. Actividad Fosfatasa ácida en Firavitoba	138
Figura 79. Actividad Fosfatasa ácida en Nobsa	139
Figura 80. Actividad Fosfatasa ácida en Tibasosa	140
Figura 81. Actividad Fosfatasa ácida en Paipa	141
Figura 82. Actividad Fosfatasa ácida en Sogamoso	142
Figura 83. Curva de Calibración actividad Proteasa	143
Figura 84. Actividad Proteasa en Firavitoba	144
Figura 85. Actividad Proteasa en Nobsa	145
Figura 86. Actividad Proteasa en Tibasosa	147
Figura 87. Actividad Proteasa en Paipa	148
Figura 88. Actividad Proteasa en Sogamoso	149
Figura 89. Prueba de inhibición por difusión, con el extracto obtenido a partir de hoja de ruda mediante el método Soxhlet modificado. (Día 12)	151

Figura 90. Prueba de inhibición por pozo, con el extracto obtenido a partir de hoja de ruda mediante el método Soxhlet modificado. (Día 11)	152
Figura 91. Prueba de inhibición por el método de difusión, con extracto de hoja de ruda en proporción 1:6. (Día 15)	154
Figura 92. Prueba de inhibición por el método de pozo, con extracto de hoja de ruda en proporción 1:6. (Día 13)	154
Figura 93. Esclerocios germinados, impregnados con N-Hexano (control negativo)	155
Figura 94. Esclerocios germinados, impregnados con el extracto óptimo de inhibición (800 μ l de extracto, llevados a 1ml)	156
Figura 95. Germinación de los esclerocios impregnados con N-hexano. (Día 2)	156
Figura 96. Germinación de los esclerocios impregnados con extracto óptimo de inhibición. (Día 9)	157
Figura 97. Esclerocios germinados, impregnados con agua destilada estéril (control negativo)	158
Figura 98. Esclerocios germinados, impregnados con infusión de hoja de ruda en agua, 1:6 p/v.	158
Figura 99. Esclerocios germinados, impregnados con infusión de hoja de ruda en agua, 1:12 p/v.	158
Figura 100. Germinación de los esclerocios impregnados con agua destilada estéril. (Día 13)	159
Figura 101. Germinación de los esclerocios impregnados con extracto de ruda en agua, en proporción 1:6. (Día 7)	159
Figura 102. Germinación de los esclerocios impregnados con extracto de ruda en agua, en proporción 1:12. (Día 9)	160
Figura 103. Correlación entre el pH y la Actividad Proteasa	175
Figura 104. Correlación entre la materia orgánica y la Actividad Proteasa	176
Figura 105. Correlación entre el pH y la Actividad Fosfatasa ácida	177
Figura 106. Correlación entre la Materia Orgánica y la Actividad Fosfatasa ácida	177

Figura 107. Correlación entre el Fósforo y la Actividad Fosfatasa ácida	178
---	-----

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales fitopatógenos que atacan a la cebolla de bulbo	36
Cuadro 2. Principales insectos plaga que atacan la cebolla de bulbo	37
Cuadro 3. Elaboración de las concentraciones según volúmenes ..	75
Cuadro 4. Nomenclatura de los tratamientos empleados	95
Cuadro 5. Lectura de las pruebas de antagonismo de los tratamientos evaluados según escala de Ethur. (Periodo de cada lectura, corresponde a 2 días de crecimiento)	96
Cuadro 6. Característica de lectura para crecimiento de los controles (para biocontroladores y patógeno)	100
Cuadro 7. Control de crecimiento de Biocontroladores según días de lectura	101
Cuadro 8. Control de crecimiento para patógeno según días de lectura	102
Cuadro 9. Recuento de esporas y dilución final de trabajo (10 ⁵) ..	102
Cuadro 10. ANOVA Sogamoso según lotes: Nitrificantes	112
Cuadro 11. ANOVA Tibasosa según lotes: Nitrificantes	113
Cuadro 12. ANOVA Firavitoba según lotes: Nitrificantes	114
Cuadro 13. ANOVA Paipa según lotes: Nitrificantes	115
Cuadro 14. ANOVA Nobsa según lotes: Nitrificantes	116
Cuadro 15. ANOVA municipios según microorganismos nitrificantes	117
Cuadro 16. ANOVA Tibasosa según lotes para solubilizadoras de fosfato	118
Cuadro 17. ANOVA Nobsa según lotes para solubilizadoras de fosfato	120

Cuadro 18. ANOVA municipios según lotes para solubilizadoras de fosfato	121
Cuadro 19. ANOVA Municipios según microorganismos proteolíticos	125
Cuadro 20. Curva de calibración actividad celulasa	129
Cuadro 21. Datos de la actividad celulasa municipio de Tibasosa.	130
Cuadro 22. Datos actividad celulasa municipio de Sogamoso	132
Cuadro 23. Datos actividad celulasa municipio de Nobsa	133
Cuadro 24. Datos actividad celulasa municipio de Firavitoba	134
Cuadro 25. Datos actividad celulasa municipio de Paipa	135
Cuadro 26. Curva de calibración actividad fosfatasa ácida	136
Cuadro 27. Datos actividad fosfatasa ácida municipio de Firavitoba	137
Cuadro 28. Datos actividad fosfatasa ácida municipio de Nobsa	138
Cuadro 29. Datos actividad fosfatasa ácida municipio de Tibasosa	140
Cuadro 30. Datos actividad fosfatasa ácida municipio de Paipa.	141
Cuadro 31. Datos actividad fosfatasa ácida municipio de Sogamoso	142
Cuadro 32. Curva de calibración actividad Proteasa	143
Cuadro 33. Datos actividad proteasa municipio de Firavitoba	144
Cuadro 34. Datos actividad proteasa municipio de Nobsa	145
Cuadro 35. Datos actividad proteasa municipio de Tibasosa	146
Cuadro 36. Datos actividad proteasa municipio de Paipa	147
Cuadro 37. Datos actividad proteasa municipio de Sogamoso	148
Cuadro 38. Prueba de inhibición por el método de extracción Soxhlet modificado	150
Cuadro 39. Prueba de inhibición por el método de extracción de infusión	153

INTRODUCCIÓN

El suelo es un ambiente apropiado para el desarrollo de microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias, arqueas y actinomycetes), estos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas, complejas y también contribuyen a las características propias del suelo. Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia ya que constituyen la parte viva y se relacionan con la dinámica de transformación y desarrollo en relación con procesos de edafogénesis: Ciclos biogeoquímicos (Schloter, 2003, pp. 255-262), de elementos como el carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, hierro y otros metales; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos.

Tanto en la evolución como en la productividad de los suelos agrícolas intervienen notablemente la diversidad de microorganismos, animales y vegetales, que contribuyen a mantener el nivel de materia orgánica, que a su vez influye sobre la aireación, drenaje y estructura física.

La calidad del suelo, considera a la actividad microbiana del suelo importante, ya que conduce a la liberación de nutrientes aprovechada por las plantas pero también a la mineralización y movilización de contaminantes.

Dada la intensificación agrícola, las regulaciones de las funciones a través de la biodiversidad del suelo son reemplazadas progresivamente por la regulación a través de entradas químicas y mecánicas.

En los suelos se encuentran grupos de microorganismos funcionales: bacterias y hongos que interactúan con el ciclo del Carbono (celulolíticos), los que participan en la mineralización de fósforo orgánico (Solubilizadores de fosfato), hacen parte del ciclo del nitrógeno (nitrificantes) y los microorganismo proteolíticos que realizan la degradación de proteínas, por ende contribuyen en el ciclo del nitrógeno que es un elemento que aunque es abundante en la naturaleza, se encuentra en su forma no disponible para la mayoría de organismos.

Igualmente se encuentra que el uso irracional de algunos químicos, que en algunos casos son poco efectivos e incrementan los costos

de producción, afecta notablemente la economía del productor y de su familia. Además, al consumidor se le ofrece en los puntos de venta un producto de baja calidad con un precio elevado, por esto en el esfuerzo de controlar el hongo *Sclerotium cepivorum* se han encontrado estrategias encaminadas a reemplazar el uso de químicos por agentes biocontroladores. Entre ellos los hongos del género *Trichoderma sp* y *Clonostachys rosea*.

El cultivo de cebolla tiene un gran valor a nivel departamental, por lo cual es importante conservar la calidad y la productividad de éste en la región. Esta situación hace necesario el desarrollo de diversos estudios que permitan mejorar las condiciones del cultivo y disminuir la incidencia del hongo en el distrito.

Como parámetros considerados importantes para determinar la calidad del suelo, -diferentes a los anteriormente mencionados- están: los de tipo físico, físico-químico y bioquímico, siendo estos últimos, debido a su sensibilidad, los que permiten conocer de una manera rápida los cambios que se producen en el suelo objeto de estudio.

Las actividades enzimáticas del suelo dan cuenta de las reacciones bioquímicas que suceden en él; además, están estrechamente relacionadas con las propiedades físicas, químicas y biológicas, y son sensibles a los cambios generados por manejo.

Las plantas, tanto en su ambiente natural como en ambientes de cultivo, necesitan defenderse de condiciones adversas y de enemigos naturales. Sin embargo, los cultivos agrícolas se han especializado en la producción de sustancias energéticas, reduciendo su capacidad para defenderse, de esta manera se genera una dependencia de recursos externos para su protección contra animales, malezas y microorganismos fitopatógenos.

Los cultivos se ven constantemente amenazados por enfermedades originadas por agentes infecciosos que atacan diferentes órganos de las plantas, donde la severidad del daño depende de la susceptibilidad de estos y de las condiciones ambientales favorables que permiten el rápido desarrollo de organismos fitopatógenos.

Los productos agrícolas obtenidos no sólo en la zona andina sino a lo largo del país, son afectados por enfermedades que causan pérdidas

económicas significativas. En el cultivo de cebolla de bulbo (*Allium cepa L*), una de las enfermedades de mayor importancia es la pudrición blanca de la cebolla. De acuerdo con Cruz de Matos (2000), el principal método de control del fitopatógeno (*Sclerotium cepivorum*) se ha basado en el uso de agroquímicos, aunque esta práctica parece haber perdido su eficacia para controlar la enfermedad.

En virtud de esta situación, se ha trabajado en la búsqueda de alternativas que disminuyan el crecimiento de dichos hongos en el campo, tal es el caso del control biológico, cuya principal propiedad es la estabilidad ecológica. Este medio ofrece grandes perspectivas para minimizar el efecto de las enfermedades en la producción agrícola, sin agudizar los problemas de contaminación ambiental que amenazan el balance ecológico en el presente y en el futuro inmediato.

Según Ribeiro (1999), con el fin de reducir la severidad e incidencia de la enfermedad, se han utilizado estrategias alternas contra la pudrición blanca, entre ellas el control biológico con el uso de extractos vegetales que, en algunas investigaciones, revelan un efecto positivo sobre el control de hongos fitopatógenos.

Lo anteriormente expuesto indica el valor que tiene el cultivo de cebolla a nivel departamental, por lo cual se debe mantener la calidad y la productividad de este cultivo en la región. Esta situación permite el desarrollo de diversos estudios que permitan mejorar las condiciones del cultivo y disminuir la incidencia del hongo en el distrito, para responder a la demanda que tiene el producto en el mercado. Además, se debe considerar que la presencia de esta enfermedad difiere de una región a otra, dependiendo de las características ambientales de la zona, lo que conlleva al desarrollo de estudios que permitan entender la dinámica temporal de la pudrición blanca y su interacción con el hospedante.

“En la naturaleza las plantas viven en permanente interacción con poblaciones de microorganismos como hongos filamentosos, levaduras y bacterias, permaneciendo en continuo contacto con estas, albergándose en la superficie de las hojas, flores y fruto” (Orietta, 2001, pp. 96-100).

Los nutrientes para el crecimiento de microorganismos sobre la superficie de los vegetales son generados de manera habitual dentro de la

planta y en forma de exudados que se difunden o se secretan a la superficie, los cuales contienen gran cantidad de materiales orgánicos que incluyen azúcares simples, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y hormonas de crecimiento de la planta, que pueden ser empleados eficientemente como sustrato por los microorganismos, razón por la cual estos son capaces de colonizar las plantas, causando perjuicio tanto a nivel económico como de producción.

De acuerdo con Cotes (2002), la cebolla de bulbo es una hortaliza que se encuentra afectada principalmente por el patógeno *Sclerotium cepivorum* causando la pudrición blanca. Esta enfermedad es uno de los problemas fitosanitarios más difíciles de manejar por sus características de propagación y diseminación, además por poseer estructuras de resistencia que imposibilitan el control de tipo químico para la erradicación del patógeno, aumentando los costos de manejo y producción, haciendo insostenible el tratamiento de los cultivos y en muchas ocasiones, causando la inutilización de los terrenos durante largos períodos de tiempo y pérdidas económicas a los agricultores.

Se han estudiado diferentes alternativas para el manejo de la situación, sin embargo, las mismas no dan una solución completa al problema, por lo cual actualmente se ha difundido a escala mundial el control de los patógenos por antagonistas, logrando de forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, la erradicación de los fitopatógenos. (Orietta, 2001, p. 98)

La actividad enzimática de los suelos está fuertemente ligada a la actividad microbiana y al tipo de vegetación. A su vez, los cambios de temperatura y nutrientes disponibles afectan directamente su energía de activación. Es por tal razón que el estudio de dicha actividad está tomando mayor importancia, ya que existe gran relación entre los factores ambientales y el desempeño de las enzimas en el desarrollo de suelos bajo cultivos. La actividad de la mayoría de las enzimas se ve afectada por cambios en el medio donde llevan a cabo sus reacciones, es decir, cambios en el pH, la temperatura y la humedad causando su inactivación.

Para aproximarse al entendimiento de los ciclos de los nutrientes y a los niveles de actividad microbiana responsables de estos procesos, se investigan varias actividades enzimáticas del suelo porque dan cuenta de las reacciones bioquímicas que suceden dentro de este heterogéneo

y complejo sistema; además, están estrechamente relacionadas con las propiedades físicas, químicas y biológicas y son sensibles a los cambios generados por manejo. Por ende, las actividades enzimáticas permiten monitorear el funcionamiento del suelo respondiendo a la necesidad de entender los efectos positivos y negativos sobre las propiedades y procesos que suceden dentro de esta matriz, así como también las relaciones entre estos factores, los usos y prácticas de manejo.

Las potenciales aplicaciones y expectativas al seguir la catálisis biológica del suelo son tan amplias e importantes como los usos, preocupaciones y esfuerzos por conservar este preciado recurso.

Teniendo en cuenta que el cultivo de cebolla de bulbo en el departamento de Boyacá representa un importante renglón dentro de la economía y constituye un ingreso significativo para las familias que se dedican a su producción y comercialización. Docentes-investigadores del grupo de investigación en Gestión Ambiental desarrollaron el presente proyecto enmarcado en la línea de investigación de biotecnología, el cual tiene como principal objetivo, establecer un sistema integrado de manejo para la producción sostenible y la disminución de problemas fitosanitarios ocasionados por *Sclerotium cepivorum* en Cebolla de Bulbo (*Allium cepa* L). Este proyecto evaluó la variación de las características fisiológicas de los diferentes aislamientos del patógeno *Sclerotium cepivorum* en la zona de influencia del DRAC, por su importancia económica en la producción de cebolla de bulbo del departamento, la cual se ve notoriamente disminuida por el ataque de este fitopatógeno.

Otros aspectos importantes del presente proyecto radican en que se evaluaron algunos grupos fisiológicos microbianos (microorganismos solubilizadores de fosfato, amilolíticos, proteolíticos, celulolíticos y fijadores libres de N), contribuyendo de esta manera al conocimiento de la diversidad microbiana de los grupos funcionales presentes en los cultivos de cebolla.

Igualmente, se determinó la importancia de los extractos vegetales como alternativa importante de biocontrol del hongo *Sclerotium cepivorum*, evaluando extractos de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) *In Vitro*, con el fin de disminuir la pudrición blanca en el cultivo de cebolla de bulbo y proponer entre la población afectada el uso

de productos naturales que conlleven a una disminución del uso de fungicidas sobre los suelos.

Dado lo anterior, se plantea establecer un sistema integrado de manejo para la producción sostenible y la disminución de problemas fitosanitarios ocasionados por *Sclerotium cepivorum* en cebolla de bulbo (*Allium cepa L*) en el área de influencia del distrito de riego del alto Chicamocha – DRAC. Teniendo como base:

- * La valoración de las condiciones fitosanitarias del cultivo de cebolla de bulbo e identificar las características agronómicas específicas de la región.
- * La evaluación de los aislamientos de microorganismos nativos como posibles biocontroladores en el modelo *Sclerotium cepivorum-Allium cepa L.* a nivel de campo.
- * Y el establecimiento del efecto de algunos extractos vegetales sobre el hongo *Sclerotium cepivorum* a nivel de laboratorio y, posteriormente, en campo.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL CULTIVO DE CEBOLLA DE BULBO

Historia de la cebolla de bulbo (*Allium cepa*).

El botánico francés Pyramus de la Candolle, en su libro “*Origen de las especies Cultivadas*” (1853), afirma que la cebolla es originaria de Asia, probablemente de Irán o Afganistán, ya que en ambos países esta planta bulbosa se encuentra en estado espontáneo o salvaje. Su cultivo es de origen antiquísimo; se expandió a África y Europa, donde pasó a ser consumida por griegos y romanos. En Egipto era el alimento principal de los pueblos esclavos que trabajaban en la construcción de las pirámides.

Muchos historiadores sitúan los primeros cultivos de cebolla a orillas del mediterráneo, unos 5.000 años atrás. La Asociación Nacional de Cebolla dice que las cebollas fueron sembradas primero en Irán y Paquistán, pero es muy probable que se haya consumido durante miles de años. La cebolla de bulbo fue traída de África por los portugueses. Posteriormente comenzó a sembrarse en todo el continente americano alrededor del año 1629.

Historia de la pudrición blanca de la cebolla. (*Sclerotium cepivorum*).

En 1841 Berkeley describió en Inglaterra una enfermedad de la cebolla, que ahora se denomina podredumbre blanca. En 1902 Voglino la cita como una enfermedad dañina del ajo en el norte de Italia. Se ha considerado una enfermedad común y algunas veces destructora de la cebolla, ajo, chalote, cebolleta Gales y puerro en toda Europa Occidental, lo mismo que en Chipre, Egipto, India, Ceilán, Australia, África del Sur, Islas Canarias, Argentina y Brasil. En los Estados Unidos la podredumbre blanca en las cebollas y ajos recolectados en el nordeste de Oregon se detectó en 1918.

“El potencial de daño de la pudrición blanca se ha observado en los cultivos de cebolla en Egipto, donde el sembrado se redujo en un 60% en un periodo de 13 años y la producción en un 81% debido al incremento de la contaminación de los suelos del Valle del Nilo”. (Coley y Smith, 1990, p. 186).

Historia de la Alelopatía

El término alelopatía fue acuñado por Molisch, en 1937, para definir la interacción bioquímica entre las plantas. Ya en los 300 años a.C, Teofasto describe en su obra: *Inquisición sobre las plantas*, la capacidad que tiene el garbanzo para agotar la tierra. En el siglo IV a.C, Demócrito ofrece rectas para el control de malezas, empleando sustancias hechas de la combinación de varios vegetales. Así mismo, en el siglo I, Plinio vuelve a tratar sobre el poder del garbanzo, además de la cebada para agotar la tierra.

En el último decenio del siglo XX, 1992 fue un año importante para el desarrollo de la alelopatía, porque varios investigadores dieron a conocer el resultado de sus estudios en los cuales se demuestra el efecto promotor o inhibidor de ciertas plantas en el desarrollo de otras. Estos estudios giran alrededor de ciertas sustancias sintetizadas por ellas, como: los taninos, terpenoides, flavonoides, alcaloides, aminoácidos, purinas y nucleótidos.

Producción de cebolla en Colombia

La producción mundial de cebolla de bulbo a partir de 1998 se ha incrementado notablemente hasta llegar en el año 2004 a 3'069.493 ha cultivadas, una producción de 53'591.283 ton y un rendimiento promedio de 17.45 ton/ha. Colombia ocupa el puesto 20 a nivel mundial en la producción de cebolla de bulbo siendo una de las principales hortalizas cultivadas; para el 2003, el área cultivada era 11.020 ha, la producción 231.632 ton y un rendimiento de 21.693 Kg/ha.

“La producción se concentra en nueve departamentos, destacándose Boyacá como el mayor productor, registrando 4.696 ha sembradas, con producción de 109.704 ton y un rendimiento de 23.361 kg/ha”. (Melo, 2000, p. 369)

En Colombia, una de las principales hortalizas cultivadas es la cebolla de bulbo, reportándose que en Boyacá se produce cerca del 52% del total en el país. Sin embargo la presencia de diferentes enfermedades que afectan esta hortaliza ha ocasionado que la producción disminuya notablemente, con pérdidas del 30%. Incluso en algunos casos los productores han llegado a perder la totalidad de sus cosechas.

Según el Ministerio de Agricultura (2002), el cultivo de cebolla de bulbo es atacado principalmente por el fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* agente causal de la pudrición blanca, enfermedad que a nivel mundial y nacional causa pérdidas hasta del 100%.

En el año 2000, Castillo, determinó que el rendimiento y la calidad en la producción se ha reducido ocasionando problemas de tipo socioeconómico de zonas tradicionalmente productoras, presentando persistencia en los suelos infectados haciendo que muchas áreas destinadas para el cultivo no puedan ser utilizadas, provocando el desplazamiento de los productores de los municipios tradicionalmente cultivadores de cebolla a otras zonas debido a los altos costos que implica el manejo de este problema afectando el equilibrio ecológico y la fertilidad natural tanto de los suelos abandonados como de los nuevos en donde se establece el cultivo.

Dentro del departamento de Boyacá hasta hace poco los municipios de Samacá y Villa de Leyva eran los mayores productores de cebolla de este tipo; debido a los problemas fitosanitarios se ha presentado la migración de cultivadores a otras zonas, dentro de las que se destaca la influenciada por el Distrito de Riego del Alto Chicamocha (DRAC) en los municipios de Sogamoso, Firavitoba, Nobsa, Tibasosa y Paipa, zona que por su temperatura, la humedad relativa y las características de los suelos se ajusta a las condiciones.

Actualmente en este distrito de riego el cultivo de cebolla de bulbo ocupa un renglón importante en la economía; en el año 2003 se reportaron 2.088 ha sembradas con una producción aproximada de 10.974 ton, en las que la pudrición blanca causó pérdidas durante el cultivo, embarque y almacenamiento; a pesar de los tratamientos fitosanitarios que el cultivo recibe, el problema persiste y tiende a aumentar con la consecuente reducción de rendimiento (Centro Urpa, 2003, Corpoica, 2002), generando preocupación en los productores y dueños del terreno.

Evaluaciones agropecuarias realizadas por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia en el 2007, indican que la producción de cebolla de bulbo se concentra en nueve departamentos, destacándose Boyacá como el mayor productor y el que registra los mejores rendimientos por ha. En el DRAC, el cultivo de cebolla de bulbo se ha incrementado notablemente en el período comprendido entre los años 2000 y 2005, debido a diversos aspectos favorables en la cadena productiva entre los que se destaca el radio de acción de distribución del producto (pues cubre gran parte del territorio nacional), el déficit de la producción nacional respecto de la demanda y el que sea un producto que se pueda industrializar. Este aumento confirma el censo de uso de suelo de USOCHICAMOCHA (Asociación de usuarios del DRAC) registrado en diciembre de 2004, donde se tiene a 260 productores de cebolla de bulbo con áreas de cultivo superiores a 0.5 ha, lo que constituye un ingreso significativo para las familias que se dedican a su producción y comercialización.

En general, la cebolla de bulbo es afectada por un número diverso de plagas y enfermedades que causan detrimento en su calidad y producción, siendo los hongos los causantes de la mayoría de daños, especialmente *Sclerotium cepivorum* que causa la pudrición blanca, enfermedad limitante del cultivo debido a su difícil control por la formación de estructuras de resistencia que pueden permanecer por muchos años y que sólo germinan en presencia de cultivos del género *Allium*. En el DRAC se ha observado que en un 16.5% de las pérdidas del producto es por la acción de hongos, daños mecánicos, sobreproducción y humedad. (Punja, 1992, p. 86. Melo, 2000, p. 35)

Actualmente, se está presentando aumento de la enfermedad en el área de influencia del DRAC, esto debido a la alta explotación de las zonas con este cultivo, por el arriendo de los terrenos en plazos largos con mal manejo de los cultivos o el desconocimiento de los propietarios acerca del problema, afectando el equilibrio ecológico y la fertilidad natural del suelo, disminuyendo la productividad y el rendimiento. Así mismo se están generando desechos de cultivo con la enfermedad que están siendo enterrados, estableciéndose como posibles focos de la enfermedad.

También se ha presentado aumento de la enfermedad debido a la variabilidad que presenta las cepas del fitopatógeno de una región a otra, el efecto de las condiciones climáticas y nutricionales para la

germinación de esclerocios, por tal razón es necesario estudiar cepas de cada región para llevar a cabo un control efectivo de la enfermedad.

La pudrición blanca es una de las enfermedades fúngicas más extendida y destructiva de las especies de *Allium*; la incidencia de ésta difiere de una región a otra, se ha reportado que niveles de inóculo tan diferentes como 1.5 y 9000 esclerocios/kg de suelo se requieren para alcanzar incidencias de la enfermedad de 40 y 25%.

“Las variaciones en el número de esclerocios se han atribuido principalmente a diferencias en condiciones climáticas, características físicas, químicas y biológicas del suelo, prácticas culturales y susceptibilidad de especies hospedantes”. (Crowe, F. & Hall, D., 1980, pp. 74-76).

La mayoría de los estudios realizados trata de mejorar características fitosanitarias del cultivo de cebolla de bulbo, identificando la densidad de inóculo, la incidencia de la enfermedad, la variabilidad patogénica de cepas y el control químico y biológico del cultivo; pero en el departamento los estudios realizados no hacen referencia a la variabilidad fisiológica del fitopatógeno, característica de gran importancia para el manejo de la enfermedad debido a que se ha observado que la población de esclerocios/Kg de suelo, solo son representativas para la época y lugar en que fueron recolectadas las muestras ya que a través el tiempo éstas pueden modificarse por diversos factores ambientales. (Castillo, 2000, p. 17).

Estudios realizados en México por Sánchez y Zavaleta (2000), indican que en 4 aislamientos de *S. cepivorum* de cuatro regiones productivas del género *Allium* presentan diferencias en la intensidad y tasa de avance de la enfermedad, así como en la supervivencia del inóculo en el suelo y en su habilidad para macerar tejidos, indicando una fuerte variación patogénica entre aislamientos. Estas diferencias se presentan probablemente por la adaptación de las poblaciones de *S. cepivorum* a las condiciones particulares de cada área.

En cuanto a la densidad de inóculo, Castillo (2000, p. 28) afirma que: “varía de una región a otra, debido a que en la evaluación que realizó en suelos de 3 municipios de Boyacá encontró diferencias en la población de esclerocios por 100g de suelo, fluctuando entre 16 y 40 esclerocios”. Confirmando que este patógeno tiene una gran variabilidad provocada probablemente por falta de un manejo aceptable de los residuos de

cosecha afectados, cultivos de cebolla en períodos seguidos y falta de desinfección de herramientas y maquinaria. También indica que una población baja de esclerocios tiene similar capacidad de provocar la misma incidencia y severidad de la enfermedad que una alta densidad de inóculo en el suelo en las mismas condiciones ambientales, debido a que a partir de 100 esclerocios / Kg de suelo, la incidencia de la enfermedad es de 93%, la cual no sufre cambios significativos si la cantidad de esclerocios aumenta a 300 esclerocios / Kg de suelo con incidencia del 93% y 500 esclerocios / kg de suelo el 100% de la incidencia.

Materia orgánica

Concentraciones de 20-50% de materia orgánica inhiben el desarrollo de esclerocios, principalmente en meses de invierno cuando se dan períodos extensos de saturación con bajas temperaturas (0° – 10°C). (Granados, 2005, pp. 57-66).

Temperatura del suelo

Es el factor climático que más influye en la germinación y desarrollo de esclerocios. Estudios realizados por Crowe y Hall (1980), encontraron que la germinación e infección de *S. cepivorum* ocurre entre los 9°C y 24°C, con un óptimo de 15°C, y su viabilidad disminuye en un intervalo de 21°C a 30°C, permaneciendo las plantas sanas incluso en suelos muy infectados (Ponce, 2008, pp. 71-83). Situación confirmada por Sánchez y Zavaleta (2000, p. 62), quienes reportan en aislamientos de *S. cepivorum* en México que la tasa de germinación de esclerocios es significativamente más alta y mayor a 19°C y 24°C. Un estudio realizado por Castillo (2000) en el municipio de Cuacita (Boyacá) indica que cepas de *S. cepivorum* de esta región se desarrollan mejor a temperatura ambiente (20°C) que a temperatura de refrigeración (5°C) o a altas temperaturas (27°C).

Absorción de diferentes nutrientes

Este factor presenta marcada influencia sobre la severidad del daño del fitopatógeno sobre el cultivo de cebolla, un desbalance en las relaciones de nutrientes incrementa el porcentaje de daño, niveles adecuados de Potasio, Calcio, Magnesio, Cobre y Zinc cumplen un rol importante en la tolerancia de la planta a la pudrición blanca, niveles altos de Nitrógeno, Fósforo y Azufre pueden incrementar la susceptibilidad de

Allium cepa al ataque del patógeno. (Aguirre, E, Menjivar F, J C., Piraneque G., N. V. 2006, p. 22-26)

Con el objetivo de determinar el efecto de algunas prácticas agroecológicas sobre algunas poblaciones microbianas y su posible relación con el desarrollo de un cultivo de zanahoria y cebolla, se montó una huerta experimento de 40m² con dichos cultivos, en la reserva natural Karagabí, en el municipio de Pueblo Rico - Risaralda (Colombia). En la huerta se utilizaron algunas prácticas de agricultura ecológica: asociación de cultivos, cubierta del suelo, mantenimiento de arvenses y alelopatías.

Para la fertilización orgánica se usaron compost tipo bocashi y un biofertilizante líquido aerobio (Repia) y se definieron tres tratamientos: T1: compost a base de bagazo de caña y pulpa de café, más biofertilizante, T2: compost a base de bagazo de caña, más biofertilizante y T3: control, sin compost ni biofertilizante. A partir de muestras de suelo tomadas antes de la siembra y al momento de la cosecha para cada tratamiento, se realizó un análisis microbiológico de los grupos de hongos filamentosos, bacterias no filamentosas y actinomicetos, determinando el tamaño de sus poblaciones, su diversidad y algunos grupos funcionales dentro de cada gran grupo de microorganismos, así: fijadores de nitrógeno en bacterias, solubilizadores de fosfatos en hongos y celulolíticos, xilanolíticos, amilolíticos, proteolíticos y solubilizadores de fosfatos en actinomicetos.

Igualmente se ha reportado que especies de *Trichoderma sp*, *Clonostachys rosea* y *Beauveria spp* tienen una gran capacidad para controlar el desarrollo del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* ya que poseen un gran porcentaje de protección frente a éste siendo de un 60% en reducción del micelio y del inóculo de *S. cepivorum*.

En condiciones de invernadero parece ser que también existen microorganismos capaces de disminuir el crecimiento de hongos fitopatógenos como lo es el caso de *Sclerotium cepivorum*, demostrado en un estudio donde la utilización de *Trichoderma harzianum* como biocontrolador redujo el número de plantas enfermas y disminuyó la densidad del inóculo del fitopatógeno, además de esto se logró que con la reducción del inóculo del fitopatógeno se aumentara el peso y el diámetro de los bulbos de la cebolla.

Se han demostrado resultados de biocontrol de *Sclerotium cepivorum* usando un aislamiento de *Trichoderma harzianum*, el cual es tolerante al Iprodione; el tratamiento combinado del fungicida con el hongo dió como resultado del 6% de incidencia del hongo, mientras que en la aplicación del fungicida se presentó incidencia del 51% del hongo patógeno; la utilización de sólo *Trichoderma harzianum* produjo como resultado una incidencia del 13% de *Sclerotium cepivorum*.

Existen diferentes características que presentan las especies del género *Trichoderma sp* aisladas de diferentes lugares de Colombia ya que aquellas que provienen de la región de Tumaco - Nariño (Natu*2) revelaron una gran capacidad para reducir el número de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, además de mostrar en el suelo un efecto más prolongado que el benomyl un fungicida utilizado en el control de *S. cepivorum* a nivel de ajo.

CEBOLLA DE BULBO (*Allium cepa* L.)

La cebolla de bulbo, también conocida como cebolla cabezona o de huevo, se considera como la segunda hortaliza más importante después del tomate a pesar de no ser una especie reconocida por su importancia alimenticia pues su utilización está orientada como condimento o materia prima para la industria alimenticia o farmacéutica.

La cebolla pertenece al género *Allium*, que incluye cultivos como la cebolla, ajo, puerro, chalota y cebollino chino. Este género contiene aproximadamente 500 especies ampliamente distribuidas. Las especies más importantes cultivadas son la cebolla (*A. cepa* L.), puerro (*A. ampelopraso* L.), cebolla japonesa (*A. fistulosum* L.), rakkio (*A. chinense* G. don), cebollino chino (*A. tuberosum* Roll. Ex -spr.) Cebollino (*A. schoenoprasum* L.).

La cebolla de bulbo se agrupa en cinco tipos según el color del bulbo, el fotoperiodo, el sabor y la forma. Según la primera característica, existen las de bulbo blanco, amarillo pardojizo y morado. Según el fotoperiodo, se encuentran los tipos de día corto (10-12 horas luz/día, 0-24° de latitud), de día intermedio (11-14 horas luz/día, 28-40° de latitud), de día largo 15 o más horas de luz/día, 40° de latitud). Según el sabor, se dispone de los tipos picantes y suaves; según la forma existen: globular achatada y de trompo.

La siembra de la cebolla se produce mejor en lugares soleados con suelos ligeros (suelos), con buen drenaje y ligeramente ácidos (pH de 6.2 a 6.8) con un alto nivel de materia orgánica. Se deben evitar suelos más pesados (arcillosos) y tierras negras a menos que se modifiquen con materia orgánica para mejorar la aireación y drenaje. Las cebollas se pueden cultivar a partir de semillas, bulbos inactivos o trasplantes.

Los bulbos pequeños e inactivos se siembran directamente en el huerto. Deben sembrarse a una profundidad de 1 a 2 pulgadas y con una separación de 2 a 3 pulgadas entre las plantas. La siguiente figura representa un cultivo típico de cebolla de bulbo.

Figura 1. Cultivo de cebolla de bulbo.



Fuente: Gamboa R. Evaluación de las condiciones fitosanitarias del cultivo de cebolla de bulbo en el área de influencia del Distrito De Riego del Alto Chicamocha - Boyacá (2012).
[Fotografía]

Taxonomía y Morfología

Pertenece a la familia *Liliaceae* y su nombre científico es *Allium cepa* L. Morfológicamente posee hojas tubulares o cilíndricas y alargadas que se juntan en una base que se llama bulbo, que es la principal parte comestible. El poseer hojas alargadas con tendencia a permanecer verticalmente erectas la convierten en una excelente captadora de la radiación solar. Tiene raíces muy cortas, que salen de la parte inferior del tallo, situación que debe tenerse muy en cuenta en lo relacionado con los riegos.

En cuanto al color, la clasificación más corriente es de blancas y rojas presentándose diferentes niveles de cada color. Las de color rojo son

más resistentes a enfermedades que las blancas porque tienen un compuesto llamado Catecol, que las protege de los hongos. Así mismo las cebollas rojas tienden a ser más picantes.

Ecología del cultivo

La ecología hace relación a los factores ambientales que se presentan en el cultivo, tales como: el fotoperíodo, el clima, el suelo, la fertilización y el riego; estos influyen en la cebolla en relación al tamaño, la forma, el inicio de la floración y la capacidad de acumulación de nutrientes en el bulbo. A continuación se relacionan estos factores.

Fotoperíodo

La duración del día tiene vital importancia en la adaptación de las variedades de cebolla, es el factor del clima más determinante para la producción, debido a que condiciona la formación del bulbo. Este factor actualmente permite clasificar las variedades existentes en cebollas de días largos, intermedio y corto. Todas las variedades de cebolla de bulbo que se siembran en Colombia deben ser de día corto, es decir, las plantas, no requieren de días largos para la formación del bulbo y no florecen con los días cortos. (Melo, 1998, p. 368)

Suelo

La cebolla requiere de suelos sueltos y livianos, franco arenoso o franco arcillosos, con un buen contenido de materia orgánica y buen drenaje. El pH debe estar entre 6.0 y 7.0, debido a que la cebolla no tolera alta acidez. (Melo, 1998, p. 316).

Fertilización

Depende del tipo de suelo, en general un cultivo de cebolla requiere niveles adecuados de Nitrógeno, Fósforo y Potasio teniendo en cuenta los niveles de estos en el suelo. Una deficiencia de Nitrógeno, reduce el tamaño de los bulbos al acelerarse el proceso de crecimiento, y un exceso de éste producirá cambios en la maduración fisiológica.

Estructura global de la planta

El tallo que se encuentra por debajo del nivel del suelo se aplana para formar un disco en la base de la planta. En la parte central superior del disco se encuentra el ápice caulinar, a partir del cual se forman

las hojas opuesta y alternativamente, de manera que emergen en dos hileras separadas 180 grados unas de otras. Cada hoja consta de un limbo y una vaina. La vaina se curva hasta rodear completamente el punto de crecimiento y por último forma un tubo que encierra a las hojas jóvenes y ápice caulinar. Lo que a primera vista aparece es el tallo de la planta de hecho un “falso” tallo o “pseudotallo”, constituido por las vainas concéntricas de la hojas y las hojas jóvenes que crecen desde el interior de las vainas circundantes más viejas.

En la unión del limbo con la vaina existe una apertura o poro por donde puede verse el extremo del limbo de la hoja más joven siguiente. Por último, el limbo de la hoja más joven se alarga y emerge a través de este orificio. En una hoja completamente expandida, el poro es visible en la parte superior del pseudotallo, elongándose los limbos verdes más jóvenes a través de éste. A medida que se inicia la formación y expansión de nuevas hojas, las vainas basales más viejas son empujadas lejos del ápice, mediante una expansión lateral continua del tallo discoidal.

Aspectos agronómicos

Clima

La temperatura óptima para el desarrollo del cultivo está alrededor de los 13°C y 14°C con máxima de 30°C y mínima de 7°C. Las temperaturas durante el desarrollo deben ser frescas para permitir buena formación de raíces y follaje, y más altas durante el llenado de bulbo y la cosecha. Las temperaturas bajas alargan el ciclo vegetativo dando lugar a la acumulación de carbohidratos en el follaje que luego pasan a los bulbos. La temperatura influye en la formación del bulbo y en la floración. Los bulbos se desarrollan más rápidamente al incrementar la temperatura. “La precipitación puede llevar a un exceso de humedad en el suelo y en el aire, lo que favorece el desarrollo de microorganismos causantes de enfermedades, conduciendo también a la brotación de bulbos que son cosechados con alta humedad y llevados así al almacenamiento. Es preferible sembrar la cebolla en zonas secas con posibilidad de riego para asegurar buen desarrollo y adecuado rendimiento y calidad de la cosecha”. (Jaramillo, 1986, pp 82-89).

Suelos

Los mejores suelos para la cebolla de bulbo son los minerales con contenido de materia orgánica; franco arcilloso y franco arenoso, profundo y

con buena capacidad de retención de humedad. Las cebollas sembradas en suelos muy orgánicos, limosos y franco limosos, resultan muy flojas, con muchas hojas y bulbos de poca densidad. El pH óptimo está entre 6.0 y 6.5 y no tolera suelos ácidos. Se ha observado también que la siembra en suelos muy pesados induce la formación de bulbos deformes, pero no se tiene referencia del defecto sobre su rendimiento.

Siembra y transplante

La cebolla es una planta típica de transplante pero se puede sembrar directamente. Para la siembra de una ha, se requiere preparar alrededor de 200 m² de semillero. Si el terreno ha sido convenientemente preparado y desinfectado, se requiere de 1.5 a 4 Kg. de semilla para sembrar una ha. Durante la etapa de semillero, las plántulas se deben proteger contra el ataque de plagas y enfermedades del cultivo. La cebolla también se puede sembrar directamente en el campo para lo cual se requiere la semilla recubierta o paletizada. La siembra directa acorta la duración del cultivo en el campo y se evita el costo del transplante, pero aumenta el costo para el combate de malezas y la protección de las plántulas.

Una vez sacadas las plántulas del semillero se hace una selección de las más vigorosas y sanas, éstas se llevan al sitio definitivo. Se deben descartar las plántulas enfermas porque pueden morir más tarde e infestar el suelo, así como las plantas poco vigorosas porque van a dar bulbos pequeños, todo lo cual afectará considerablemente los rendimientos finales. El transplante se debe hacer en días nublados o en horas de la tarde. Es importante regar el lote inmediatamente después de la siembra. Las plántulas se llevan a campo una vez tengan 45 a 50 días de sembradas, en este estado se inicia un leve abultamiento del bulbo.

Fertilización

Las aplicaciones del fertilizante dependerán del análisis de los suelos. La cebolla de bulbo con un sistema radicular reducido, responde bien a la fertilización. En general el nitrógeno es importante para unos buenos rendimientos, pero el exceso de este elemento resulta en un exagerado crecimiento vegetativo con una formación de bulbos pobre y tardía. Por esto, en los suelos orgánicos son importantes las aplicaciones de fósforo y potasio. Los fertilizantes con productos a base de azufre favorecen la intensidad del sabor, el olor y alto contenido de

sólidos solubles, puesto que este elemento es responsable del olor característico de la cebolla.

Riego

La cebolla es uno de los cultivos más exigentes en riego debido a su sistema radicular superficial y fibroso. Los periodos críticos para el riego de la cebolla son el trasplante y el llenado de bulbos. Una vez que el follaje ha comenzado a doblarse se suspenden los riegos.

Cosecha

Al terminar su ciclo, la cebolla suspende la producción de hojas, con lo cual su follaje comienza a doblarse. A partir de este momento se terminan de trasladar los alimentos almacenados en el follaje. Las recomendaciones para iniciar la cosecha se basan en esta etapa y se realiza cuando haya entre el 50 y el 100% de plantas dobladas. El curado es una práctica aconsejable pero requiere condiciones ambientales secas para dejar las plantas secándose en el suelo. De esta forma el bulbo mejora su capacidad de almacenamiento y se evitan pérdidas posteriores por brotación de hojas y raíces.

Enfermedades y plagas

Un apreciable número de insectos y de microorganismos fitopatógenos afecta al cultivo de cebolla de bulbo, sin embargo, sólo algunos de ellos alcanzan importancia económica en dicho cultivo. Las enfermedades presentan mayores problemas que los insectos plaga, ya que las condiciones de humedad favorecen el crecimiento de fitopatógenos. (López, 1996, pp. 19-32).

Enfermedades

El fitopatógeno de mayor importancia es *Sclerotium cepivorum* debido a que a nivel mundial causa pérdidas económicas de gran importancia (Sánchez, 2002, p. 105). El cuadro 1 presenta una síntesis de los diferentes fitopatógenos que atacan a la cebolla de bulbo.

Plagas

Las plagas que atacan la cebolla pueden ser de suelo o de follaje. El cuadro 2 presenta los principales insectos que atacan la cebolla de bulbo.

Cuadro 1. Principales fitopatógenos que atacan a la cebolla de bulbo

AGENTE CAUSAL	SÍNTOMAS
<p>Mildeo Velloso <i>(Peronospora destructor)</i></p>	<p>La enfermedad se caracteriza por lesiones elípticas grandes a lo largo de la hoja, cuando ocurren infecciones suaves del patógeno, se presenta amarillamiento y flacidez de las hojas confundiendo con una maduración normal, en ataques severos la planta permanece pequeña y el bulbo es de mala calidad. El patógeno puede permanecer viable unos 5 a 6 años.</p>
<p>Mancha Púrpura <i>(Alternaría porri)</i></p>	<p>Afecta hojas, bulbos y tallos florales. Inicialmente las lesiones son pequeñas y hundidas, de forma elíptica o irregular, las cuales adquieren mayor tamaño cuando las condiciones ambientales son favorables. Sobre las lesiones crecen estructuras en forma de anillos concéntricos oscuros y en las márgenes de las lesiones se desarrolla un pigmento rojo rodeado por un área amarilla.</p>
<p>Pudrición Blanca <i>(Sclerotium cepivorum)</i></p>	<p>Los síntomas iniciales se manifiestan en las hojas en forma de amarillamiento progresivo de las puntas hacia la base. En el bulbo se observa el desarrollo de un micelio blanco algodonoso con pudrición blanca en el bulbo y raíces. El hongo dura en el suelo hasta 15 años.</p>
<p>Fusarium <i>(Fusarium sp)</i></p>	<p>Afecta el tallo, el pseudotallo y bulbo en campo y en almacenamiento. En campo se observa un amarillamiento y muerte descendente de las puntas de las hojas, las raíces toman un color rosado y se pudren. El hongo penetra por heridas en el bulbo. El hongo vive en el suelo.</p>

Fuente: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2005). *La cadena de cultivos ecológicos en Colombia*. Recuperado de http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/20051121601_caracterizacion_ecologicos.pdf

Cuadro 2. Principales insectos plaga que atacan la cebolla de bulbo

INSECTO PLAGA	DAÑO CAUSADO
DEL SUELO	
Chiza (<i>Ancoqnata scarabaciodes</i>) (<i>A. ustulata</i>)	Son ocasionales y su daño consiste en cortar las raíces de las plántulas.
Mosca de la Raíz (<i>Delia antiqua</i>)	Las larvas perforan el tallo a la altura del cuello de la raíz y barrenan bulbos ocasionando amarillamiento y marchitez en la planta. Los ataques más frecuentes son en suelos húmedos con alto contenido de materia orgánica.
DEL FOLLAJE	
Trips (<i>Frankliniella occidentalis</i>), Trips tabaco	Raspan superficialmente las estructuras de la planta y chupan el contenido de las células.
Minador de la Cebolla (<i>Liriomyza huidrobrensis</i>)	El daño lo hacen las larvas al construir minas y galerías en las hojas, llegando a secarlas o doblarlas.

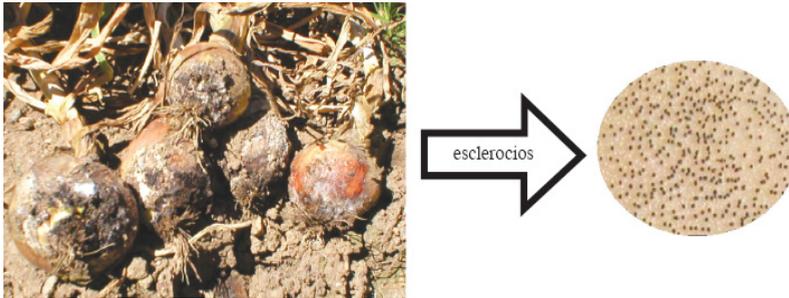
Fuente: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2005). *La cadena de cultivos ecológicos en Colombia*. Recuperado de http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/20051121601_caracterizacion_ecologicos.pdf

Pudrición Blanca

Es una enfermedad causada por el fitopatógeno *Sclerotium cepivorum*, considerada como una de las más importantes de las plantas del género *Allium*. El patógeno coloniza la planta por estimulación de sustancias exudadas por el hospedero, produciendo abundante micelio blanco, compacto y algodonoso que rápidamente forma esclerocios, los cuales infectan el suelo. Se ha encontrado en países de Europa,

Oceanía, África y América ocasionando pérdidas considerables en los cultivos de ajo y cebolla (Granados, 2005, pp. 143-156). La siguiente figura muestra una cebolla de bulbo atacada por el hongo *Sclerotium cepivorum*.

Figura 2. Sintomatología típica de la pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum*.



Fuente: Granados, M. (2005). Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. *Agronomía Costarricense*, 29(2), 143-156.

Agente causal

Según lo planteado por Galli (1980), *Sclerotium cepivorum* es un hongo imperfecto perteneciente al grupo de los *Deuteromycetes*, Orden *Mycelia Sterilia* (descrito en Inglaterra por Berkeley en 1841). Se desconocen estructuras de reproducción sexual y asexual, su propagación se da por la formación de estructuras de resistencia denominados esclerocios, que se comportan como propágulos y que en su interior tienen micelio estéril (Crowe, 1995, p. 73).

Su taxonomía está orientada por las siguientes taxas

DOMINIO	EUKARYA
REINO	LACTAE
DIVISIÓN	MYCOTA
Subdivisión	EUMYCOTINA
Clase	Deuteromiceto
Orden	Mycelia Sterilia
Género	Sclerotium (Aethalia)
Especie	cepivorum
Nombre científico	<i>Sclerotium cepivorum</i>

La siguiente figura es una muestra de La cepa de *Sclerotium cepivorum*.

Figura 3. Cepa de *Sclerotium cepivorum* en agar PDA



Fuente: Gamboa R. Evaluación de las condiciones fitosanitarias del cultivo de cebolla de bulbo en el área de influencia del Distrito De Riego del Alto Chicamocha - Boyacá (2012).
[Fotografía]

Morfología del hongo

De acuerdo con Agrios (1996), *S. cepivorum* está constituido por células hifales hialinas de 8 a 9 μm de diámetro y de 30 μm a 400 μm de longitud. Las hifas forman estromas en donde se producen estructuras de resistencia denominadas esclerocios los cuales alcanzan un diámetro alrededor de 200 μm a 500 μm . Los esclerocios son de tamaño uniforme, esféricos, corteza diferenciada lisa negra, un fino tejido medular y cortical hialino, cuando están maduros se encuentran libres de filamentos miceliales y son producidos en grandes cantidades sobre los tejidos infectados

Ciclo de vida

Los esclerocios representan el inóculo primario para el desarrollo de esta enfermedad, éstos pueden permanecer viables de 10 a 20 años en condiciones de campo y sin necesidad del hospedero. En un estudio sobre la viabilidad de los esclerocios se determinó que el porcentaje de sobrevivencia se mantiene por encima del 92% y la viabilidad puede llegar hasta un 96% entre los 5 a 10 años de entierro, si el período de

entierro aumenta a 15 ó 20 años los porcentajes de viabilidad oscilan entre 72 y 96% dependiendo de la profundidad (Coley, 1990, p. 218). La germinación de los esclerocios es de forma eruptiva o miceliogénica, el primer signo de germinación es la aparición de una protuberancia en la superficie del esclerocio, luego la cáscara sufre una ruptura y uno o más tapones grandes y densos de micelio son empujados hacia fuera; las hifas empiezan a crecer y ramificarse a partir de cada tapón, produciéndose anastomosis libremente.

Este proceso es estimulado solamente por exudados de las raíces de las especies del género *Allium*. Los exudados están constituidos por sustancias no volátiles de sulfóxidos de alkyl y alkenyl-cisteína, los cuales son metabolizados por la microflora del suelo, especialmente por bacterias presentes en la rizósfera, para producir compuestos volátiles (sulfuros de *n*-propil y alil cisteína) que activan los esclerocios latentes hasta una distancia de 10 cm de la raíz y 30 cm de profundidad.

De acuerdo con Sánchez (1987), sólo se requiere de un tiempo de exposición de 15 min para estimular la germinación y el nivel óptimo de germinación se alcanza después de 24 h o más. Una vez que el esclerocio ha germinado, penetra en las raíces por medio de un apresorio, después crece intra e intercelularmente en las células parenquimáticas, el tejido cortical se desintegra y luego el tejido vascular es invadido y macerado.

El micelio se puede propagar planta a planta por el contacto de las raíces infectadas con las sanas, si se encuentran a una distancia de 1 a 2 cm. Unos pocos esclerocios pueden ser formados en las raíces, sin embargo, la mayoría es formada en la base del bulbo una vez que el hongo ha logrado invadir y desarrollarse en esta parte.

Supervivencia e incidencia de *S. cepivorum*

Los esclerocios son exógenamente latentes en ausencia de plantas del género *Allium* por un período de 20 años. De acuerdo con Clarkson et al, (2004, p. 356), la temperatura y el pH óptimos para la germinación de esclerocios es 20°C con un rango óptimo de 15-25°C y un pH de 4.8, aunque pueden germinar en pH cercanos a 8. Por otro lado, la temperatura y el pH óptimos para el desarrollo de la enfermedad es de 15°C con un rango de 10-18°C y el pH es de 6,1 con un rango óptimo de 5.4-7.8. Mesen (1997) menciona que a temperaturas mayores de

24°C las plantas permanecen saludables aún en un suelo fuertemente infectado y que la enfermedad se desarrolla más rápidamente en suelos secos (40% de humedad) que en suelos húmedos (60-80% de humedad). El patógeno crece, sobrevive y ataca las plantas con mayor frecuencia cerca de la superficie del suelo, debido a que la temperatura es favorable y el abastecimiento de sustancias orgánicas que el hongo utiliza para su nutrición es mayor, a la vez que hay una menor competencia o antagonismo con otros organismos del suelo (Instituto Colombiano Agropecuario, 1992, p. 48). Los esclerocios desaparecen del suelo cuando germinan, por lo tanto, el mantenimiento y el incremento en la población esclerocial es solamente dependiente de la capacidad del patógeno, para sobrevivir en ausencia del huésped y de la producción de nuevos esclerocios para continuar la infección. (Ayala, 1983, pp. 85-89)

Estudios realizados por Ethur (2005, pp. 128-130), determinaron cuatro factores importantes que determinan la población de esclerocios en el suelo:

Primero: La población esclerocial sobreviviente de cultivos previos.

Segundo: La cantidad de esclerocios germinados estimulados por el hospedero.

Tercero: La producción de nuevos esclerocios durante la infección al hospedero.

Cuarto: La remoción y muerte de los esclerocios.

Las variaciones en la incidencia de la enfermedad están asociadas con la variabilidad patogénica del hongo. Ésta se puede explicar por diferencias entre aislamientos por una o varias características:

- * Tasa de germinación de esclerocios y tasa de crecimiento micelial en el suelo.
- * Respuesta a los componentes estimulantes de la germinación.
- * Diferencias cuantitativas y cualitativas en la producción tanto de enzimas degradadoras de paredes celulares como de toxinas.
- * Capacidad para sobrepasar las defensas de la planta.
- * Capacidad adaptativa a factores físicos y químicos del sustrato, por ejemplo pH y temperatura.

Síntomas

Esta enfermedad puede afectar plantas en cualquier estado de desarrollo y se incrementa conforme se desarrolla el sistema radical. Los síntomas usualmente se notan a los 60 días después de la siembra y difieren de acuerdo con el estado de desarrollo de la planta y la duración de las condiciones favorables en el suelo, principalmente la temperatura. El primer síntoma coincide con el período de bulbificación y se presenta como un amarillamiento general, continuado por muerte descendente de las hojas más externas y retardo del crecimiento. El deterioro gradual se da por varios días o semanas hasta concluir con el colapso final de las hojas y una pudrición basal seca o semiacuosa.

Simultáneamente, en las raíces y hojas inferiores, hay abundancia de micelio blanco, lanoso y superficial que pronto produce esclerocios negros y esféricos sobre la superficie o dentro de los tejidos enfermos. En este grado de desarrollo de la enfermedad las plantas afectadas son fácilmente arrancadas del suelo. Cuando hay alta densidad de inóculo las plantas pueden morir de forma repentina en grandes áreas del campo; si la infestación es baja, pueden morir en grupos de 2 a 40, siendo las plantas centrales del parche las primeras en morir.

Si los bulbos son atacados al final del ciclo del cultivo, la enfermedad se expresa como una pudrición durante el almacenamiento. (Agrios, 1996, p. 514)

Ecología fisiológica de los microorganismos

El crecimiento, supervivencia y actividad metabólica de los microorganismos están sometidos a la influencia de numerosos factores abióticos físicos y químicos. En algunos casos la actividad de un microorganismo está limitada por la disponibilidad de un nutriente esencial, y en otros casos, algunos factores ambientales pueden superar la tolerancia mínima o máxima de una población microbiana particular.

Entre los factores que ejercen mayor influencia sobre los microorganismos se encuentra los siguientes: la radiación electromagnética, que en forma de luz visible es la principal fuente de energía para el ecosistema pero posee capacidad destructora en forma de radiación ionizante de alta energía; la temperatura, determina la velocidad de

crecimiento y la actividad; el potencial redox, con efectos sobre el tipo de metabolismo microbiano; el pH, de cuyos valores depende la supervivencia y el suministro de nutrientes y la concentración, la forma química de los compuestos orgánicos e inorgánicos, que pueden ser nutrientes esenciales o actuar como sustancias inhibitoras y tóxicas.

EL SUELO

Según Cerón (2005, p. 20), el suelo es un recurso viviente, dinámico y no renovable, cuya condición y funcionamiento es vital para la producción de alimentos, y para el mantenimiento de la calidad ambiental local, regional y global.

Las propiedades de los suelos varían naturalmente a través del tiempo por factores que determinan su formación como la precipitación, el material parental, los organismos que lo habitan, la actividad antropogénica, entre otros. En consecuencia, no existe una sola medida biológica o química para determinar el estado de salud y calidad de un suelo.

Las etapas esenciales de los ciclos globales del agua, C, N, P y S suceden en el suelo, la velocidad del ciclaje y la disponibilidad de estos elementos están siendo alteradas continuamente por muchos factores como las diferentes formas de vida, la constante búsqueda de fuentes de alimento y energía, las prácticas de manejo convencionales como el arado, los patrones de cultivo y el uso de plaguicidas y fertilizantes que además han tenido influencia sobre la calidad del agua y de la atmósfera, ya que han generado cambios en la capacidad del suelo para producir y consumir gases como monóxido de carbono, óxido nitroso y metano. Al mismo tiempo, el manejo convencional ha promovido la pérdida de la materia orgánica reduciendo la fertilidad, la capacidad de campo y la estabilidad estructural, esto ha incrementado la erosión y el CO₂ atmosférico que contribuye al calentamiento global. De esta manera, el suelo no sólo es la base para la agricultura y para los diferentes ecosistemas, sino que además de él depende toda la vida del planeta.

La materia muerta (necromasa) que se incorpora al suelo procede de plantas y animales, así como de los propios organismos que viven en el suelo. La composición de esa necromasa está formada por biomoléculas entre las que hay que destacar: almidón, celulosa, hemicelulosa,

lignina, quitina, pectina, exopolisacáridos microbianos, proteínas y péptidos, lípidos, peptidoglicano y ácido teicoico. En conjunto, éstas biomoléculas constituyen más del 95 % de la materia seca que aporta la necromasa, pero los mecanismos enzimáticos que intervienen en su descomposición son muy variados, dando lugar a la aparición de una gran cantidad de metabolitos secundarios, susceptibles a su vez a múltiples procesos de descomposición, condicionados por los factores ecológicos y ambientales específicos para cada escenario.

La gran variabilidad en la composición de los suelos referida a la cantidad y el tipo de sustancias nutritivas, la humedad, la aireación, la temperatura, el pH, las interacciones, la presencia de raíces y las prácticas agrícolas, entre otras; producen grandes diferencias en la densidad y diversidad de la población microbiana. Además, todos estos factores ocasionan una compleja red trófica o trama alimentaría en el suelo, que permite la sobrevivencia de unos y la inhibición de otros.

La gran mayoría de estudios de cálculo de la diversidad se han efectuado en flora y fauna (organismos macroscópicos), pero en el caso de los microorganismos el fenómeno es más complejo debido a la dificultad de establecer el concepto de especie pues en los microorganismos se presenta variedades y subespecies.

Diversos componentes del suelo funcionan como nutrientes para los microorganismos que lo habitan, entre ellos se encuentran: los minerales, materia orgánica, exudados radicales y biomasa, siendo la materia orgánica fuente primordial de energía para los microorganismos.

La biomasa microbiana del suelo es la fuerza de conducción de la mayoría de los ecosistemas terrestres ya que esta biomasa controla la tasa de reciclamiento y mineralización de los substratos orgánicos.

Los microorganismos y sus actividades, no se encuentran a lo largo de todo el suelo, concentrándose únicamente en ciertos nichos, como la rizósfera, cerca de substratos orgánicos e inorgánicos disponibles, y los más pequeños en los poros del suelo llenos de agua donde sus depredadores se ven excluidos.

En la biomasa microbiana del suelo se encuentran: a) bacterias que tienen una gran variedad de funciones en el suelo, estas tienden a ser los miembros más numerosos de la comunidad microbiana del suelo

y su selectividad de los substratos varía de una especie a otra. b) actinomicetos que son saprófitos de vida libre, su función es descomponer una gran cantidad de substratos carbonados. No constituyen una parte importante de la comunidad de microorganismos del suelo, sólo en condiciones adversas y de gran estrés este grupo predomina en un suelo. c) hongos quienes dominan la microbiota del suelo, su papel más importante en el suelo desde el punto de vista ecológico, es la descomposición de la materia orgánica desde los azúcares simples y aminoácidos hasta polímeros muy resistentes como la lignina y complejos de ácidos húmicos del suelo.

Un buen diseño para el muestreo de microorganismos del suelo requiere decidir el método que se va a emplear teniendo en cuenta la especificidad del trabajo, esto debe hacerse con cuidado, ya que de esta manera se podrá resolver el problema planteado. Después de elegir el método, este debe ser cuidadosamente verificado y si es necesario debe modificarse, para lograr un buen resultado del sistema y del tipo de suelo particular del estudio.

El aislamiento de microorganismos del suelo incluye el traslado de estas poblaciones desde el suelo a condiciones artificiales que los induce al crecimiento, usualmente con el objetivo de obtener un cultivo puro. Este es un pre-requisito esencial para el estudio de las actividades naturales e individuales de los microbios. Sin embargo, los suelos son un extremado sistema heterogéneo, provisionando micro hábitats propios para una gran variedad de microorganismos y los requerimientos de los microorganismos para su crecimiento. Por lo tanto, es casi imposible idear un sólo procedimiento por el cual se puedan aislar todas las formas de microorganismos existentes en el suelo.

Una toma de muestras de suelo de campo puede ser recolectada por una o varias razones. Puede ser requerida sólo para aislamiento de una fuente de microorganismos productores de antibióticos, o también puede ser necesaria para estudios de los estados naturales del suelo. En el primer caso muy pocas precauciones de muestreo son necesarias, pero dentro de muchos casos se hará ya sea porque la muestra puede estar alterada así como por causa de cambios en la microflora.

Algunos autores plantean que en suelos planos traídos a los laboratorios y aire seco tamizado almacenado por algunos meses, pueden ser usados en estudios similares. Según el método descrito por Clarkson

(2002), es conveniente para este tipo de estudios. Aquí, las muestras gruesas, deben ser mezcladas completamente y debe ser tomada una gran cantidad (2 lb) estas deben ser puestas en una caja de polietileno o envasadas y selladas en cartón. Así mismo pueden ser usadas en el laboratorio teniendo la precaución de no exponerlas de manera indebida a calefacción o secado.

Las muestras pueden ser usadas de una vez o pueden ser almacenadas a 4°C por una o dos semanas. Antes del uso, las muestras pueden ser pasadas a través de una malla o tamiz, para homogenizar el material.

Dentro de los medios de aislamiento para microorganismos del suelo se encuentra la solución de sales minerales Winogradsky que se utiliza para bacterias nitrificantes. La composición de esta solución es Fosfato ácido de di potasio, Sulfato de Magnesio, Cloruro de sodio, Sulfato ferroso, Sulfato de manganeso, y agua destilada.

Varios métodos pueden estimar el número de bacterias u otros microorganismos en el suelo. Estos métodos tienen ventajas y limitaciones. El método elegido depende de muchos factores, incluyendo el tipo de microorganismo estudiado y el requerimiento nutricional de los microorganismos y las características de las colonias. Los métodos moleculares también están disponibles ahora para cuantificar bacterias en suelo.

El método de cuantificación en placa de dilución es utilizado para enumerar poblaciones bacterianas en suelos, ya que muchas de las bacterias de éste, tienen relativamente requerimientos nutricionales simples y crecimiento fácil sobre medios sólidos. El principio subyacente del método de conteo en caja es que cada célula bacteriana extraída de una muestra del suelo produce una colonia visible cuando está inoculada sobre un medio de cultivo sólido e incubada bajo condiciones apropiadas, este método cuenta únicamente las colonias viables.

Calidad del Suelo

La calidad y salud del suelo determina la sostenibilidad de la agricultura, la calidad ambiental y como consecuencia la salud de plantas, animales y del hombre. Pues su calidad se determina según si sostiene la productividad de los cultivos, mantiene la calidad del agua y aire, y proporciona condiciones saludables para plantas, animales y el hombre dentro de los límites de un ecosistema.

Como parámetros considerados clave para determinar la calidad del suelo, se indican algunos de tipo físico y físico-químico (estabilidad de agregados, pH, conductividad eléctrica), y químico (parámetros nutricionales y fracciones de carbono), así como de tipo microbiológico y bioquímico (carbono de biomasa microbiana, respiración microbiana o actividades enzimáticas), siendo estos últimos, debido a su sensibilidad, los que permiten conocer de una manera rápida los cambios que se producen en su calidad.

Medidas como el carbono de la biomasa microbiana y respiración basal pueden indicar la cantidad y actividad de la biomasa microbiana existente en el suelo, la cual estará expuesta a cualquier tipo de estrés, pero, las actividades enzimáticas, marcan de una manera específica la actividad microbiana mediante los cambios de sustratos directamente implicados en los ciclos de los elementos biogeoquímicos más importantes.

Las enzimas

Los ciclos de nutrientes en el suelo implican una serie de reacciones bioquímicas, químicas y físico-químicas, estando los procesos bioquímicos mediados por los microorganismos, raíces y animales del suelo.

Las enzimas son proteínas cuyo papel es catalizar las reacciones químicas en los sistemas vivos, actúan sobre sustratos específicos transformándolos en productos necesarios para los ciclos biológicos. Son catalizadores orgánicos que disminuyen la energía de activación de las reacciones metabólicas y permiten que se produzcan a temperaturas y presiones a las que normalmente no tendrían lugar.

Las proteínas enzimáticas presentan dos regiones o sitios importantes, uno de ellos reconoce y liga al sustrato (sitio de reconocimiento), y el otro cataliza la reacción (sitio catalítico), toda vez que el sustrato se ha unido. Estos dos sitios están adyacentes uno al otro en la forma activa de la enzima y en ocasiones, el sitio catalítico es parte del reconocimiento, estas dos regiones en conjunto reciben el nombre de centro activo.

Lo que distingue a las enzimas de las demás proteínas es precisamente que, una vez producido el reconocimiento molecular del sustrato, se realiza la transformación de la sustancia reconocida, o

sea, como consecuencia de diferentes interacciones entre la proteína enzimática y su sustrato este experimenta un reordenamiento de sus elementos constituyentes debido a la ruptura y formación de algunos enlaces químicos.

La mayor producción de enzimas extracelulares se le atribuye a una variedad de microorganismos por su gran biomasa, su alta actividad metabólica y su corto ciclo de vida, en contraste con otros organismos que también las pueden liberar como las plantas y los animales. Algunas enzimas, por ejemplo las deshidrogenasas, sólo se encuentran en células viables, pero la mayoría de las enzimas pueden existir secretadas por microorganismos, u originadas por desechos microbianos o residuos de plantas. Sin embargo, globalmente, son las bacterias las que contribuyen mayoritariamente, ya que se estima que son responsables de más del 90 % de los procesos de degradación de la materia orgánica sin dejar de lado la participación significativa de otros organismos o los exudados radiculares de las plantas.

Las enzimas del suelo

Las enzimas del suelo pueden proceder tanto de microorganismos como de plantas y animales, aunque se considera que la fuente principal de enzimas son los microorganismos. Su forma física más útil en el suelo es cuando se inmovilizan en coloides minerales (arcillas) u orgánicos (moléculas húmicas) ya que entonces son más resistentes a la degradación y permanecen activas en el suelo por más tiempo.

El estudio de las enzimas del suelo, ha experimentado un claro auge debido fundamentalmente, al papel que desempeñan las enzimas en los procesos degradativos de la materia orgánica. Las enzimas desempeñan un papel fundamental en los ciclos de elementos tan importantes como el nitrógeno (ureasa y proteasas), el fósforo (fosfatasa) o el carbono (β -glucosidasas), de ahí, la importancia del estudio de este tipo de enzimas cuando se realizan enmiendas orgánicas en los suelos: por una parte, el material orgánico puede incorporar directamente enzimas; y por otra, la materia orgánica adicionada potencia la actividad microbiana y en definitiva aumentará la actividad enzimática. Hasta el momento se han ensayado más de setenta actividades de enzimas extracelulares del suelo, pero es sólo cuestión de tiempo que nuevos ensayos hagan aumentar considerablemente la lista; se ha detectado la actividad de hidrolasas, transferasas, oxidorreductasas y liasas que están directamente relacionadas con los ciclos del C, N, P y S.

Las transformaciones de la materia orgánica se realizan principalmente por hidrólisis, oxidación-reducción, generación de radicales libres, condensación y polimerización o fototransformación. La mayoría de estos procesos están regulados por enzimas y afectan a los más de diez mil compuestos diferentes que pueden llegar a tener un suelo. De paso, las enzimas también intervienen en neutralizar y degradar compuestos tóxicos. Donde todavía no tienen capacidad de actuación las enzimas es sobre los compuestos xenobióticos, de ahí el riesgo que supone la presencia en el suelo, cada vez más abundante, de este tipo de compuestos.

Las celulasas

La celulosa es el componente más importante de la materia orgánica; las plantas están compuestas de un 40 a un 70%. La degradación microbiana de la celulosa se realiza por tres enzimas: β 1,4- endoglucanasa, que rompe los enlaces β 1,4 de la molécula de celulosa; la β 1,4- exoglucanasa que convierte la molécula en un disacárido: la celobiosa ésta a su vez es degradada por la enzima β 1,4- glucosidasa produciendo glucosa, Los hongos, las micobacterias y algunas eubacterias son algunos de los microorganismos aeróbicos más importantes degradadores de celulosa.

Las proteasas

La actividad proteasa cataliza las reacciones que degradan proteínas y péptidos, por lo que está involucrada al igual que la ureasa en el ciclo del nitrógeno. Su seguimiento permite evaluar los cambios producidos en las transformaciones de éste elemento esencial en los suelos. Hay que remarcar que la actividad proteasa determinada correspondió a la enzima que hidroliza la N- α -benzoil-L-argininamida (BAA), la cual usa como sustratos derivados de proteínas, polipéptidos simples y dipéptidos que, a su vez, han sido hidrolizados desde moléculas más complejas por otras proteasas, como la proteasa caseína.

Las fosfatasas ácidas y alcalinas

La asimilabilidad del fósforo para las plantas depende en gran parte de la mineralización que experimenten las diferentes fracciones de dicho fósforo unidas a formas orgánicas. Las enzimas fosfatasas tienen un papel importante en las reacciones que tengan lugar en dicho proceso, ya

que son las encargadas de hidrolizar fósforo en forma orgánica hasta formas inorgánicas, haciéndolo por tanto asimilable por las plantas.

Las fosfatasa catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos de fosfato, son responsables de la mineralización del fósforo orgánico del suelo y de la liberación del fósforo inorgánico necesario para los microorganismos y las plantas. Se clasifican en fosfatasa ácidas, y alcalinas: las ácidas son producidas por microorganismos y plantas superiores, mientras que las alcalinas son producidas principalmente por microorganismos. La fosfatasa (llamada también fosfomonoesterasa), es una enzima que participa en la mineralización del fósforo orgánico, y su mecanismo de acción es básicamente extracelular, es decir, una vez generada por los microorganismos o raíces de las plantas, puede ser estabilizada en la materia orgánica del suelo, o en las partículas coloidales inorgánicas y liberada gradualmente cuando exista poca disponibilidad de iones fosfatos en el suelo. Sin embargo, las prácticas de fertilización, la intensidad de labores agrícolas como la aradura, y sobre todo de fertilizantes fosfatados podrían a largo plazo suprimir la segregación de enzimas solubilizantes del fósforo orgánico.

Actividad enzimática

Debido a la dificultad en su localización, se tiene que tener presente, que son difíciles de extraer del suelo. Por lo que se estudian las enzimas indirectamente mediante su actividad. Las transformaciones en el suelo de los componentes orgánicos no se realizan exclusivamente por procesos enzimáticos, sino que también tienen lugar procesos abióticos, aunque mucho más minoritarios. La ventaja de los procesos enzimáticos reside en su capacidad de proporcionar a los microorganismos la energía que se libera al final de la reacción. Las actividades enzimáticas del suelo dan cuenta de las reacciones bioquímicas que suceden en el suelo; además, están estrechamente relacionadas con las propiedades físicas, químicas y biológicas y son sensibles a los cambios generados por manejo, por ende, las actividades enzimáticas permiten monitorear el funcionamiento del suelo respondiendo a la necesidad de entender los efectos positivos, negativos e interactivos sobre las propiedades y los procesos que suceden dentro de esta matriz y las relaciones entre estos factores, los usos y prácticas de manejo.

También está relacionada con las prácticas de cultivo y puede asociarse de una manera directa con la disponibilidad de los nutrientes del suelo, debido a que éstas juegan un papel importante en cada uno de los

ciclos biogeoquímicos de elementos requeridos para el crecimiento de las plantas.

Como la velocidad de la reacción catalizada por una enzima es dependiente del pH, de la fuerza iónica, de la temperatura y de la presencia o ausencia de inhibidores, conviene señalar que las actividades enzimáticas que se pueden medir, deben de ser consideradas como medidas potenciales, ya que se miden “*in vitro*” bajo condiciones óptimas de temperatura, pH, y otros condicionantes. Sin embargo, la información que ofrecen dichas medidas, permite aportar conocimientos sobre los procesos bioquímicos que se dan en el mismo, y por tanto se comportan como índices biológicos.

Varios factores tienen influencia en la actividad enzimática de los suelos, los factores naturales (cambios climáticos, condiciones geográficas, profundidad, propiedades físicas, químicas y biológicas) y los factores antropogénicos (contaminación, manejo agrícola). La catálisis enzimática en el suelo se posiciona dentro del conjunto de medidas que proporcionan información acerca de estos fenómenos, por su papel mediador en las transformaciones bioquímicas relacionadas en la descomposición de residuos orgánicos y en el ciclaje de los nutrientes.

El seguimiento de la catálisis biológica bajo los diferentes usos del suelo o las alteraciones que pueda experimentar dicho ecosistema, puede proveer información para el entendimiento de cómo ocurren los cambios en los procesos responsables de mantener funciones, como la producción de biomasa, la remediación de contaminantes y el ciclaje de nutrientes, y la tendencia de los mismos, si son positivos, negativos o interactivos (repetición de ciclos).

El papel determinante de catalizar las reacciones bioquímicas en dichos procesos, puede ser potencialmente explotado para el desarrollo de tecnologías dirigidas al uso directo en procesos ambientales, como la remediación de contaminantes en procesos industriales y en diversas aplicaciones de interés técnico.

Las actividades enzimáticas pueden mejorar el conocimiento sobre el efecto de pesticidas, enmienda orgánica, y otros compuestos sobre la calidad de los suelos. Todo ello demuestra el interés que pueden tener las actividades enzimáticas desde un punto de vista agronómico y ecológico. Las potenciales aplicaciones y expectativas al seguir la

catálisis biológica del suelo son tan amplias e importantes como los usos, preocupaciones y esfuerzos por conservar este preciado recurso.

Extractos vegetales

Un extracto vegetal se define como el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con diversos solventes tales como agua, alcohol o éter, que luego se concentran hasta una consistencia determinada. Para la preparación de extractos se puede utilizar planta fresca o seca, los preparados con plantas secas son más efectivos que los de planta fresca. Las plantas son la fuente de compuestos químicos orgánicos más importante que existe. Pascual (1996) afirma que se conocen más de treinta mil estructuras de metabolitos secundarios y ha recopilado más de 30 mil compuestos bióticos de origen vegetal, los cuales agrupó en compuestos nitrogenados (alcaloides, glicósidos, etc), fenólicos (flavonoides, cumarinas, taninos, etc) y terpenoides.

La preparación y el uso de extractos como purines, decocciones e infusiones con plantas silvestres, hortalizas y hojas de árboles son importantes en el manejo de enfermedades e insectos. Ellos actúan de dos formas, como reforzantes o nutrientes que fortifican o estimulan su crecimiento y a la vez repelen, atraen, inhiben o estimulan insectos patógenos.

Con la aplicación de estos extractos se disminuye la proliferación de organismos nocivos para los cultivos. Estos productos actúan en los organismos por contacto, ingestión, repelencia, disuasión, anteaalimentarias, o alteración del comportamiento. Las plantas utilizadas en la preparación de compuestos alelopáticos deben provenir de cultivos naturales, silvestres o biológicos, es decir, que no hayan tenido alteración alguna en su composición. Uno de los principios de la agricultura biológica es no perturbar los equilibrios naturales con intervenciones inadecuadas, los productos extraídos de plantas para prevenir o aplicar en un momento de suma urgencia, cumplen con esta necesidad. Además de que se descomponen rápidamente por ser de origen vegetal.

Ruda (*Ruta graveolens*)

Pequeño arbusto originario de los países Mediterráneos, Orientales y de Asia Menor, es de intenso olor y sabor picante, suele tener una larga vida y alcanzar una altura entre 80 y 90cm, sus hojas son verdes,

lisas, divididas en numerosos segmentos ovalados hasta de 10mm de ancho. Las flores son de un color entre amarillo y verde, se agrupan en las ramas terminales y en su mayoría tienen 4 pildoras, el fruto es una cápsula redonda con 4 lóbulos procedentes de la flor central. Toda la planta desprende un olor grave. En su composición química las hojas tienen pequeñas cantidades de un principio amargo, resina y goma. Tiene la capacidad de atraer moscas de casa y establos, se le debe sembrar cerca de las pilas de compost y al borde o alrededor de cultivos, su extracto posee acción insecticida que controla hongos.

Sauco (*Sambucus nigra* L.)

Árbol de 10 metros de altura, ramas retorcidas, tallo de 30 cm, hojas opuestas con 2 o 4 pares de foliolos, pecíolo con estípulas glandulares, flores aromáticas blanco amarillosas reunidas en penículas terminales, al madurar toma un color negro violáceo brillante. En su composición química las flores contienen flavonoides, esencia, mucílago y sales potásicas, mientras que los frutos se componen de azúcares reductores, peptinas, ácidos orgánicos y otras sustancias. Dentro de sus propiedades el extracto se utiliza para controlar pulgones, tiene efecto antiinflamatorio en animales de laboratorio posiblemente debido al ácido ursólico.

Extractor Soxhlet

Por este método se obtienen sustancias requeridas por medio de reflujo continuo. Consta de tres partes; matraz o balón, tubo extractor y refrigerante de reflujo. El tubo extractor va a contener el material vegetal a disolver, va en la parte central y el solvente en el balón. Al someter el solvente al calor el vapor sube por el tubo lateral del extractor y al condensarse en el refrigerante cae gota a gota sobre el material vegetal pasando por las hendiduras llevando consigo las sustancias solubles en él, luego pasa por un sifón y vuelve al balón. Este tipo de extracción se realiza a cada extracto vegetal por separado con cada solvente. La cuantía y la rapidez de disolución de un soluto y de las impurezas del sólido por un disolvente, son factores apreciables para determinar el tamaño del extractor, las temperaturas de ebullición del disolvente y de sus soluciones con el soluto, imponen normalmente límites a la temperatura de extracción, cuanto más elevada sea la temperatura más rápida y completa será la extracción.

Infusión de plantas

También llamado té, es el procedimiento más corriente y clásico de utilización de las plantas vegetales. Generalmente se prepara con partes tiernas de las plantas, tales como hojas, flores y sumidades floridas. En un recipiente se pone la cantidad adecuada de planta por un mililitro de agua; la planta debe estar preferiblemente desmenuzada, cortada, troceada, triturada o pulverizada; se le agrega agua hirviendo en la proporción indicada; se tapa bien el recipiente y se deja en reposo durante un periodo de 15 a 30 minutos; luego se cierne a través de un colador, paño o lienzo, se exprime y se guarda el líquido obtenido para luego ser usado.

Controladores biológicos

Trichoderma sp

Antagonista de hongos, impide el desarrollo de *S. cepivorum* a través de diferentes mecanismos de control como el antagonismo por antibiosis, competencia o hiperparasitismo. Este último es el más común, y se conoce que en algunos casos actúan enzimas hidrolíticas quitinasa y β -1-3 gluconasa causando la desintegración de la pared celular en las hifas del patógeno, para luego ser parasitadas por *Trichoderma sp*. Así también se ha estudiado la secreción de la enzima exo- α -1.3 glucanasa y endo- β -1,6 glucanasa por el hongo *T. harzianum*; esta enzima muestra actividad lítica y antifúngica contra hongos patógenos de plantas.

Clonostachys rosea

Es considerado como uno de los mejores microparasitos destructivos, ya que parasita las hifas de diversos hongos fitopatógenos por entrelazamiento, penetrándolas y desintegrandolas. También ha demostrado ser repetidamente parásito de esclerocios de numerosos hongos del suelo. Este hongo ha demostrado ser un gran antagonista de otros hongos como lo demuestran estudios realizados por Morandi (2001), donde *C. rosea* suprimió una marcada esporulación de *Botrytis cinerea* en hojas de rosa y pétalos sin importar su etapa de desarrollo, heridas de menor importancia, y densidades naturales de la microflora y se concluye que esta flexibilidad debe permitir que *C. rosea* controle con eficacia la producción del inóculo de *B. cinerea* en sistemas de producción de rosa.

ZONA DE ESTUDIO: DISTRITO DE RIEGO DEL ALTO CHICAMOCHA

El Distrito de Riego del Alto Chicamocha (DRAC), se encuentra ubicado en la cuenca Alta de Río Chicamocha en el Departamento de Boyacá, en jurisdicción de los municipios de Paipa, Duitama, Tibasosa, Nobsa, Sogamoso, Santa Rosa de Viterbo y Firavitoba; abarca un área de 9.300 ha y beneficia a 6.131 usuarios y sus familias con servicio de riego y drenaje. Para la regulación del caudal y almacenamiento de agua se cuenta con la represa de La Copa con una capacidad actual de 55 millones de m³ y con una proyección de 75 millones de m³. La conducción de agua se hace a través del Río Chicamocha.

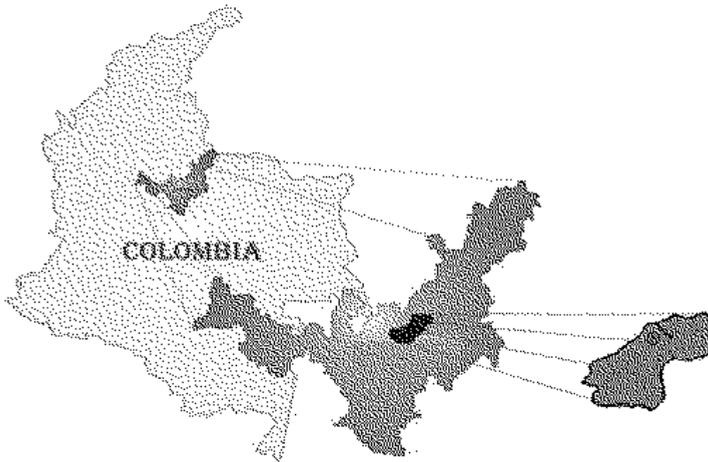
El sistema de riego es por aspersión, con once estaciones de bombeo y 300 Km de tubería enterrada para conducción y distribución. El sistema de drenaje está compuesto por una red de drenaje principal y secundaria con aproximadamente 240 Km, entre canales y ríos. La red vial está constituida principalmente por la Carretera Central de Norte y 250 km de vías municipales e intermunicipales, igualmente al distrito de riego y drenaje lo recorre la vía férrea del noreste.

En este lugar se producen cerca de 240.000 ton de alimentos al año, destacándose el cultivo de la cebolla de bulbo, especies frutales y en general hortalizas de clima frío (Pacheco, 2006, p. 183). La explotación ganadera con fines de producción láctea ocupa un lugar importante dentro de las actividades agropecuarias. Es un área rural estratégica para Boyacá, las unidades de Holanda, Surba, Vargas, Ayalas, Duitama, San Rafael, Cuche, Las Vueltas, Tibasosa, Ministerio, Monquirá y Nobsa se encuentran a una altura promedio de 2.300-2.500 metros sobre el nivel del mar, comunicadas con Bogotá por una red de carreteras en buen estado; la red hidrográfica de la cuenca alta está constituida por importantes ríos como son: el Chicamocha y el río Chiquito que son fuente abastecedora para cultivos y ganado.

Con la construcción del Distrito de Riego del Alto Chicamocha se han llevado a cabo una serie de transformaciones donde se manifiestan, en orden de importancia y magnitud, los impactos generados por los asentamientos urbanos, seguidos por actividades industriales, mineras y agropecuarias.

El Distrito de Riego y Drenaje del Alto Chicamocha, es un área rural estratégica para Boyacá. De conformidad con la visión del Gobierno Departamental, se proyecta como el eje articulador del Desarrollo Rural integral en el contexto de la Globalización para la sostenibilidad y la competitividad de la región. La siguiente figura presenta su ubicación geográfica.

Figura 4. Mapa del departamento de Boyacá, indicando la localización del DRAC.



Fuente. Microsoft Corporation. (2008). Biblioteca de Consulta Microsoft ® Encarta ®. Microsoft Corporation.

MUNICIPIOS PERTENECIENTES AL DRAC

Duitama: está localizado en el departamento de Boyacá, pertenece a la región geográfica Andina y se ubica en el Altiplano Cundiboyacense. Es capital de la provincia del Tundama y se encuentra sobre el corredor industrial de Boyacá. Su posición geográfica es a 5 grados, 49 minutos y 42 segundos latitud Norte; 1 grado, 2 minutos y 48 segundos de longitud en relación con el meridiano de Bogotá; y 73

grados, 3 minutos de longitud occidente de Greenwich. La Altitud aproximada es de 2.535 m.s.n.m. en la plaza de los Libertadores. La temperatura promedio es de 15º centígrados.

Paipa: el municipio de Paipa está localizado en el valle de Sogamoso, Su cabecera municipal se encuentra a los 5°47' de latitud norte y 73° 06' de longitud oeste. Presenta una temperatura promedio de 13°C., con una precipitación media anual: 944 mm. Abarca una extensión de 30.592,41 ha aproximadamente. Se localiza en la Cordillera Oriental de Colombia. Las cuencas hidrográficas que componen el municipio son: Cuenca del río Chicamocha, Cuenca del río Palermo y Cuenca de río Tolotá.

Sogamoso: es la segunda ciudad del departamento de Boyacá después de Tunja. Tiene una población de alrededor de 190.000 habitantes. También es llamada Ciudad del sol y del acero, Valle de Iraca, Roma de los chibchas, Paraíso del sol y del acero, donde nadie es forastero.

Tibasosa: está ubicada a 15 Km de Duitama en la vía que conduce a Sogamoso. Pertenece a la provincia de Sugamuxi. Su altura sobre el nivel del mar es de 2.538m. Tiene una población aproximada de 11.000 habitantes. Dentro de su actividad principal prima especialmente la Agricultura teniendo como productos bandera la producción de Feijoa y Cebolla.

Nobsa: municipio del departamento de Boyacá, localizado en la Región Centro Oriente del Altiplano Cundiboyacense. Su localización tiene influencia en la estructura nacional, regional y departamental. Por su localización hace parte del corredor industrial de la región centro oriente de Bogotá Distrito Capital; contiene en su territorio la industria pesada del departamento.

CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD DE INÓCULO

La cuantificación de la densidad de inóculo se realizó para determinar la cantidad de esclerocios por gramo de suelo presentes en cada una de las áreas de incidencia.

Muestreos: Los muestreos se realizaron en los municipios de Paipa, Firavitoba, Sogamoso, Nobsa, y Tibasosa, en donde se evaluaron los suelos para un total de cuarenta y tres (43) muestras. En cada lote se tomaron 5 submuestras de suelo de 200 g cada una, en 5 puntos de muestreo seleccionados al azar, para conformar una muestra global de 1000 g. Las muestras se tomaron con un barreno de 2 cm de diámetro, se colocaron en bolsas plásticas negras y se llevaron en hielera hasta el laboratorio.

Controles: Se tomó una muestra de suelo que no hubiera sido intervenida por cultivos, en cada municipio (1000 g), para un total de 5 muestras de suelo como controles.

Criterios de inclusión: El muestreo se realizó a partir de suelos de fincas que han sido cultivados, al menos una vez, con cebolla de bulbo, el lugar específico de muestreo no debía ser tan seco ni tan húmedo y el muestreo se desarrolló en una sola estación meteorológica.

Toma de las muestras: Se realizó un registro apoyado de una encuesta, la cual incluyó información de cada zona (lote o terreno), las condiciones de clima locales, los tipos de suelo y su textura, las características del suelo, prácticas de manejo y cobertura de planta, además de los datos del personal encargado de dichas prácticas.

Aislamiento de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*: Se realizó la técnica de tamizado húmedo para obtener esclerocios de las muestras recolectadas de acuerdo a la metodología propuesta por Dhingra & Sinclair. (1987, p. 75), la cual consistió en pesar 20g de suelo, dispersarla en

agua por agitación durante 30 segundos en un blender (licuadora) a baja agitación y pasarlo a través de tamices, en su orden: 0.850mm, 0.600mm, 0.500mm y 0.250mm. Colectar cada fracción separadamente dentro de cajas de petri y examinar usando un estereoscopio. Después de determinar la presencia de esclerocios en los suelos, se procedió a aislar el fitopatógeno, inoculando esclerocios descontaminados según lo propuesto por Clarkson (2002), así: tomar 10 esclerocios y sumergirlos en hipoclorito de sodio al 5%, dejarlos por 15 min y posteriormente lavarlos 3 veces con agua destilada estéril para luego sembrarlos en agar PDA .

Evaluación de viabilidad: Los esclerocios recolectados se sembraron en agar PDA y se evaluó el crecimiento, posteriormente se aislaron y conservaron en agua o en aceite. Luego se tomaron los aislamientos de los distintos lotes como una cepa independiente y se analizaron sus condiciones fisiológicas de crecimiento.

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

Estos análisis se realizaron con el fin de determinar las variaciones fisiológicas que existen entre los aislamientos de *S. cepivorum* de los distintos lotes. Para éste análisis se realizó la propagación de esclerocios para obtener esclerocios uniformes. A partir de un cultivo de *S. cepivorum* con 2 semanas de crecimiento y sin producción de esclerocios, adicionar 10 ml de agua destilada estéril y raspar, pasar este contenido a un frasco con 90 ml de agua destilada estéril; inocularlo en una bolsa, la cual contiene 1920 g de arena, 80 g de melaza y 175 ml de agua previamente esterilizada. Sellar las bolsas e incubarlas a 20°C durante 6 semanas, tiempo en el cual se han formado los esclerocios. Recuperar los esclerocios por tamizado húmedo, secar en cabina de flujo laminar por 12h y almacenar a 5°C.

Cinética de crecimiento: Se realizó la curva de crecimiento de cada cepa, teniendo en cuenta la metodología propuesta por Moore (1996). La cual establece tomar fragmentos de micelio de 6 mm de diámetro inocular en frascos con 25ml de caldo papa dextrosa (CPD), incubar a 20°C y cada dos días se determinar el peso seco de micelio, esta evaluación se debe realizar por 20 días. El peso del micelio, se determinó por filtración de este, en un papel filtro previamente pesado, luego se dejó secar a 60°C por 35 minutos en una balanza de humedad, obteniendo el % de sólidos presentes en la muestra.

Efecto de la concentración de Iones hidrógeno: Se evaluó cada cepa en diferentes condiciones de pH de acuerdo a lo propuesto por Sylvia et al (2005). Se realizó el % de germinación de cada aislamiento obtenido, sembrando 10 esclerocios por cepa en PDA a pH de 3,9; 4,8; 5,9; 6,9; 7,5; 7,9 y 8,9 evaluando la germinación por 22 días para evidenciar diferencias.

Efecto de la concentración osmótica: Se evaluó el crecimiento de las cepas aisladas del hongo en distintas concentraciones osmóticas en relación a Cloruro de Sodio (NaCl) y glucosa, lo cual permite clasificar al hongo como halófilo (microorganismo que requiere sal para crecer) y osmófilo (microorganismo que es capaz de crecer en ambientes con alta concentración de azúcar).

Efecto de la concentración de NaCl: Para poder clasificar a *S. cepivorum* como microorganismo halófilo se utilizó la metodología anteriormente explicada, analizando el % de germinación de cada aislamiento obtenido, sembrando 10 esclerocios por cepa en PDA con concentraciones de 0.145; 1; 2; 2.5 M de NaCl, evaluando la germinación por 22 días.

Efecto de la concentración de glucosa: Para identificar la habilidad de *S. cepivorum* de crecer en ambientes con diferentes concentraciones de azúcar e identificar si es osmófilo, se analizó el % de germinación, sembrando 10 esclerocios por cepa en PDA con concentraciones de 0.05; 0.145; 0.25; 0.5 M de glucosa, evaluando la germinación por 22 días.

Efecto de la aireación: Se evaluó el crecimiento de cada cepa en condiciones aeróbicas (concentraciones de oxígeno del medio ambiente), en 5% de CO₂ y en condiciones anaeróbicas, como se describió anteriormente, se realizó el % de germinación de cada cepa estudiada. Para obtener condiciones de anaerobiosis se utilizó Anaero Gen, y para evaluar las cepas en condiciones de 5% de CO₂ se utilizó CO₂ Gen. Estas cajas se incubaron posteriormente en cámaras de anaerobiosis.

Temperatura: Como se describió anteriormente se analizó el % de germinación de cada cepa en temperaturas de 4, 15, 20, 25 y 37°C.

Condiciones nutricionales: Se evaluó el crecimiento de cada cepa con diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno a diferentes concentraciones. Como fuente de Carbono, se evaluó la utilización de distintos azúcares (glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa); y como fuente

de Nitrógeno la utilización de nitrato, amonio y aminoácidos, para ello se utilizó el método de auxonograma propuesto por Koneman (1994). Este método se basa en la utilización de medios (Lodder y Bastide) sin Carbono para estudiar nutrientes que contienen este último y sin nitrógeno para alimentos nitrogenados. Se coloca en tubos de ensayo el medio de cultivo sin el alimento que se desea probar y se siembra un esclerocio.

Normalmente, en ausencia de un componente esencial, ningún cultivo se desarrollará en el medio, pero habrá crecimiento del hongo en el medio que contiene el alimento carbonado o nitrogenado, utilizable por el esclerocio.

PRUEBAS DE ANTAGONISMO

Con los biocontroladores aislados de suelos intervenidos con cultivos de cebolla se realizaron pruebas de antagonismo con el fitopatógeno y posteriormente se realizaron las lecturas de acuerdo a la escala presentada por Ethur, según esto se escogieron los mejores biocontroladores para la prueba de degradación esclerotial según la escala presentada a continuación.

Se enfrentará un hongo biocontrolador y el hongo fitopatógeno en agar PDA, cada uno a una distancia de 5 cm con respecto al otro y se observará su desarrollo cada 2 días para evaluarlo según la siguiente escala.

- * Antagonista crece por toda la caja de petri.
- * Antagonista crece sobre dos terceras partes de la caja de petri.
- * Antagonista y patógeno crecen hasta la mitad de la caja de petri.
- * Patógeno crece sobre dos terceras partes de la caja de petri.
- * Patógeno crece por toda la caja de petri.

PRUEBAS IN VITRO DE BIOCONTROL

Propagación de los biocontroladores *Trichoderma sp* y *Clonostachys rosea*: Los biocontroladores se sembraron masivamente en PDA, luego se incubaron a 25°C por 20 días, posteriormente se inoculó una concentración de 10⁵ esporas/ml en botellas con salvado de trigo previamente

preparadas (Botellas de 250 ml que contienen 12g de salvado de trigo estéril en 30 ml de agua previamente esterilizadas) y finalmente se incubó por 5 días a 25°C.

Inicialmente se realizó un raspado al cultivo de los biocontroladores y se mezcló este raspado con 10ml de agua destilada. Una vez homogenizado, se filtró la suspensión a través de una gasa para eliminar los residuos del medio de cultivo y restos de micelio que podrían obstruir el paso de la suspensión durante la inoculación, y se llevó a un volumen final de 30 ml. En cada extremo de la cámara se depositó una gota de la suspensión, se cubrió con una lamilla y se realizó una dilución hasta llegar a una concentración final de 10^5 . Como la cámara cuenta con dos campos de conteo, cada uno con nueve cuadrantes y a su vez, están divididos en cuadros más pequeños que tienen dimensiones conocidas, esto permitió obtener por medio de cálculos, el número de esporas por ml, es necesario realizar réplicas del conteo por lo menos seis veces con el fin de estimar un promedio.

Propagación de esclerocios: Se obtuvo a partir de cultivos de *S. cepivorum* de dos semanas de crecimiento a los cuales se les adiciono 10 ml de agua destilada estéril y con espátula se arrastraron los esclerocios para suspenderlos en beakers con 270 ml de agua destilada estéril, este se utilizó para inocular 3 bolsas cada una con 100 ml de esta suspensión, previamente preparadas con 1920 gr de arena lavada, 80 gr de melaza y 175 ml de agua destilada estéril, éstas se incubaron a 20°C por 7 semanas. Los esclerocios se recuperaron por medio de tamices de 0.595 y 0.210 mm de diámetro y con ayuda de un esteroscopio.

Prueba de degradación de esclerocios (*in vitro*): Se utilizó la metodología propuesta por Clarkson (2004), modificada por los autores como se describe a continuación: Introducir 100 esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, previamente propagado, en bolsas de malla de un diámetro de 150 μ m, adicionar 10g de una mezcla de arena/suelo 50:50, se inoculan los posibles biocontroladores *Clonostachys rosea* y/o *Trichoderma sp*, se sellan las bolsas y se depositan en bolsas que contienen 400 gr de suelo, más 75% agua, luego se incuban a 20°C por 9 semanas y luego se recuperan los esclerocios utilizando la técnica de flotación modificada por los autores.

El procedimiento se realizó por triplicado. Para valorar la degradación de los esclerocios se midió su estado con ayuda de una pinza y

observación micro y macroscópica. Para el control negativo se realizó el mismo procedimiento pero sin biocontrolador, y para el control positivo se realizó el mismo procedimiento pero con un biocontrolador comercial (en este caso se empleó vitavax®300, por ser fungicida sistémico recomendado para este fitopatógeno).

Teniendo en cuenta que la literatura refiere que efectivamente *Sclerotium cepivorum* es el hongo causante de la pudrición blanca de la cebolla; lo cual se evidencia con el desarrollo de los postulados de Koch, fue necesario tener cuenta lo siguiente:

- * El microorganismo debe estar presente en todas las cebollas con las mismas características de la enfermedad.
- * El microorganismo debe ser recuperado de la cebolla enferma y poder ser aislado en medio de cultivo.
- * El microorganismo proveniente de ese cultivo debe causar la misma enfermedad cuando se lo inocula a otro huésped, es decir; en “cebolla sana”.
- * La cebolla experimentalmente infectada debe contener el microorganismo.

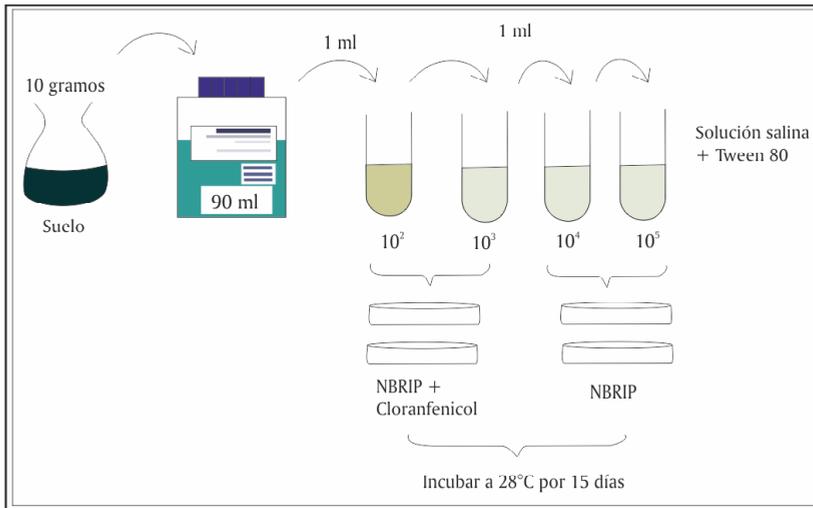
DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD POBLACIONAL PARA LOS DIFERENTES GRUPOS FISIOLÓGICOS

Las bacterias en una muestra del suelo pueden ser diluidas rápidamente con una técnica simple como la dilución en series. Una suspensión líquida de las células en la muestra del suelo es preparada, 10 gramos de suelo que se mezclan (equivalente seco de la masa) en 90ml de un diluyente estéril (agua o una solución tapón diluida). Este cociente del suelo en el diluyente, diluye la población bacteriana en aproximadamente uno en diez.

La suspensión original de células, por lo tanto; se señala como dilución 10^{-1} . Se realiza vortex por 10 segundos para suspender las células bacterianas en el líquido, esto permite que la muestra de suelo se sedimente al fondo de la botella de la dilución. Las siguientes diluciones se preparan transfiriendo un volumen definido de suspensión de células en tubos que contengan volúmenes definidos de dilución estéril. Las transferencias hechas son secuencialmente de tubo a tubo para obtener cada vez más las células en suspensión.

Solubilizadoras de Fosfato: Se tomaron las diluciones 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 y se sembraron por duplicado en el Medio NBRIP, las diluciones más diluidas para bacterias y las diluciones más concentradas para hongos (adicionando Cloramfenicol), incubando 15 días a temperatura ambiente. Se tomaron como colonias positivas las que presentaron halos transparentes alrededor de las colonias. La siguiente figura representa el proceso seguido para la dilución de los solubilizadores de fosfato.

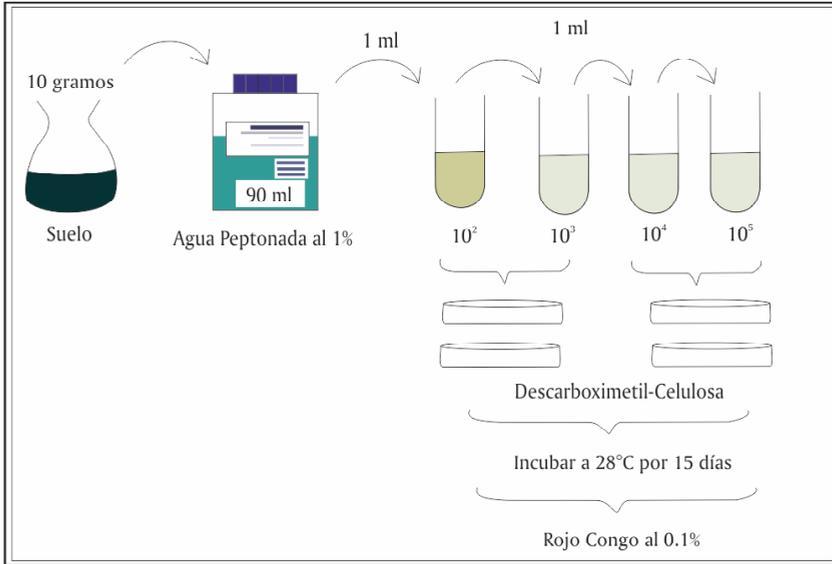
Figura 5. Procesamiento de Solubilizadoras de Fosfato



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (allium cepa L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Celulolíticos. Se tomaron las diluciones 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , se sembraron por duplicado en el Medio Dexcarboximetil – Celulosa las diluciones más diluidas para bacterias y las diluciones más concentradas para hongos (adicionando Cloramfenicol), incubando 15 días a temperatura ambiente. Luego para la lectura se adicionó sobre las colonias Rojo Congo (0.1%) por 30 minutos, se remueve el Rojo Congo y se adiciona NaCl 1M. Se tomaron como colonias positivas las que presentaron halos amarillos alrededor de las colonias. La siguiente figura representa el esquema seguido para el procesamiento de celulolíticos.

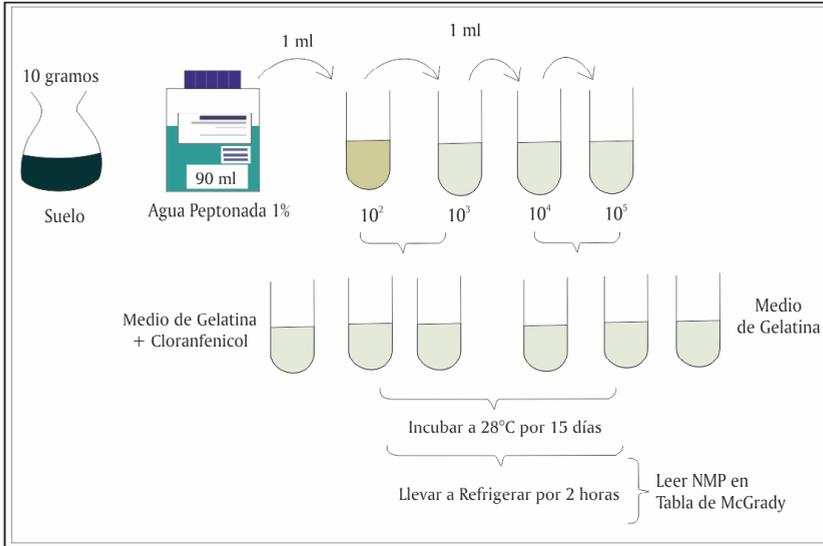
Figura 6. Procesamiento de Celulolíticos



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Proteolíticos. Se tomaron las diluciones 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , se sembraron por duplicado en el Medio Gelatina, las diluciones más diluidas para bacterias y las diluciones más concentradas para hongos (adicionando Cloramfenicol), incubando 15 días a temperatura ambiente. Luego de este tiempo de incubación, 2 horas a refrigeración. Se tomaron tubos positivos los que presentaron licuefacción. El resultado se leyó por Numero Más Probable (NMP) con la tabla de McGrady. La siguiente figura representa el esquema seguido para el procesamiento de Proteolíticos.

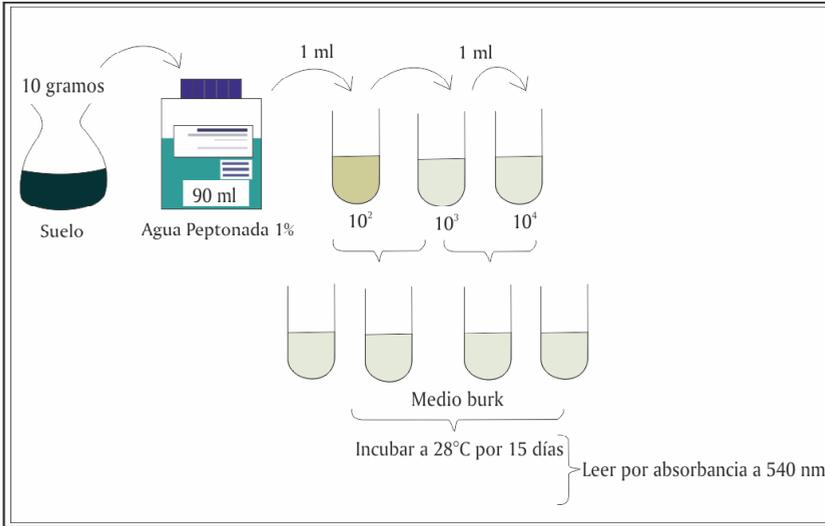
Figura 7. Procesamiento de Proteolíticos



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (allium cepa L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Nitrificantes. Se tomaron las diluciones 10³, 10⁴, 10⁵, se sembraron por duplicado en el Medio Burk, incubando 15 días a temperatura ambiente. Luego se leyó absorbancia a 540 nm. La siguiente figura representa el esquema seguido para el procesamiento de Nitrificantes.

Figura 8. Procesamiento de Nitrificantes



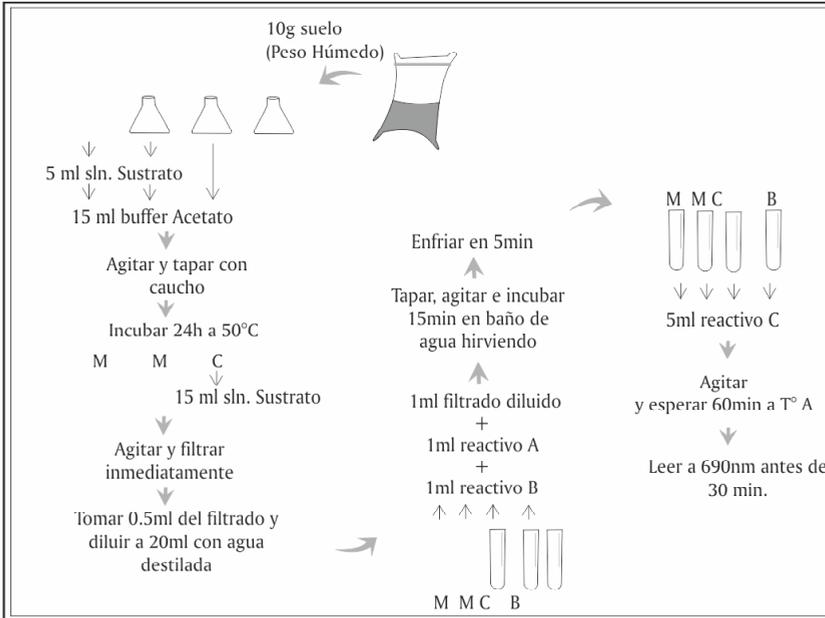
Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las muestras de suelo se analizaron siguiendo el protocolo propuesto por Schinner (1996). Se evaluó la actividad enzimática de celulasa, proteasa, fosfatasa ácida.

Determinación de la actividad celulasa. Se hizo determinación colorimétrica (a 690nm) del complejo férrico de hexacianoferrato formado cuando la muestra de suelo se incuba con el sustrato Carboxi Metil-Celulosa (CM-Celulosa) por 24h a 50°C y pH de 5.5. La siguiente figura representa el procedimiento seguido para la identificación de la actividad celulasa.

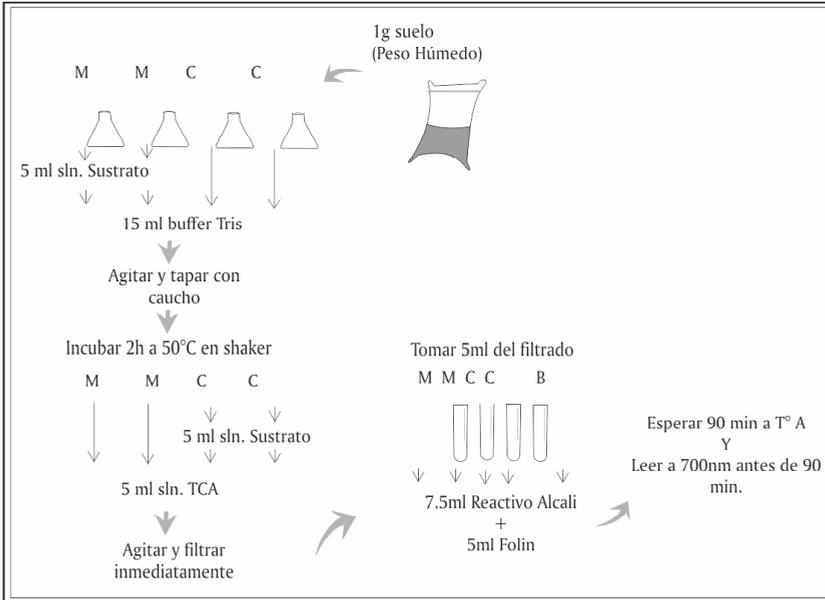
Figura 9. Procedimiento Actividad Celulasa



Fuente: URBANO, E., DUCÓN, J. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Determinación de la actividad proteasa. Se hizo determinación colorimétrica de los aminoácidos liberados cuando la muestra de suelo se incuba por 2h a 50°C y pH de 8.1, con caseína como sustrato. La siguiente figura representa el procedimiento seguido para la identificación de la actividad proteasa.

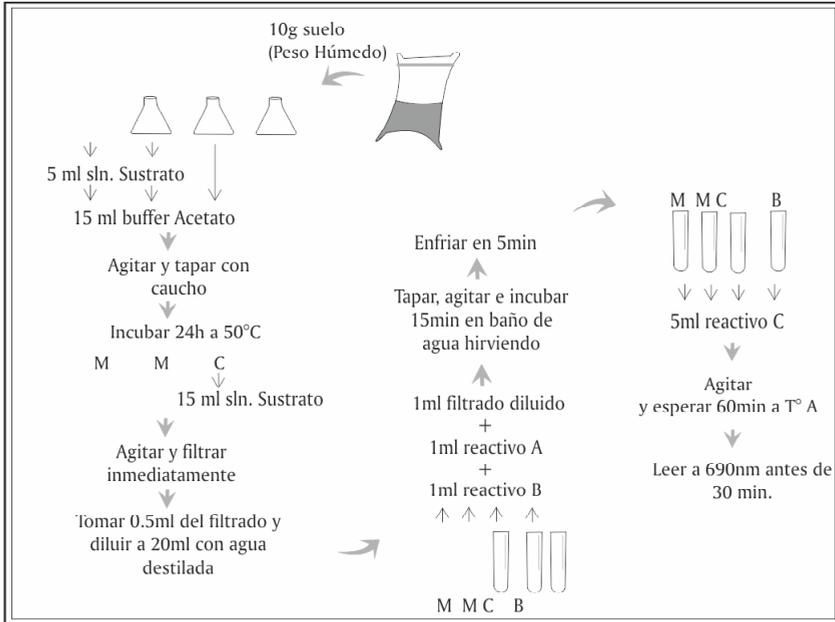
Figura 10. Procedimiento Actividad Proteasa



Fuente: Ducón, J., Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Determinación de la actividad fosfatasa ácida. Se hizo determinación colorimétrica del p-nitrofenol liberado cuando se incubaba la muestra de suelo con el sustrato p-nitrofenil-fosfato (pNF) por 1 hora a una temperatura de 37°C. La determinación se hizo por espectrofotometría visible a una longitud de onda de 420 nm. La siguiente figura representa el procedimiento seguido para la identificación de la actividad fosfatasa ácida.

Figura 11. Procedimiento Actividad Fosfatasa Ácida



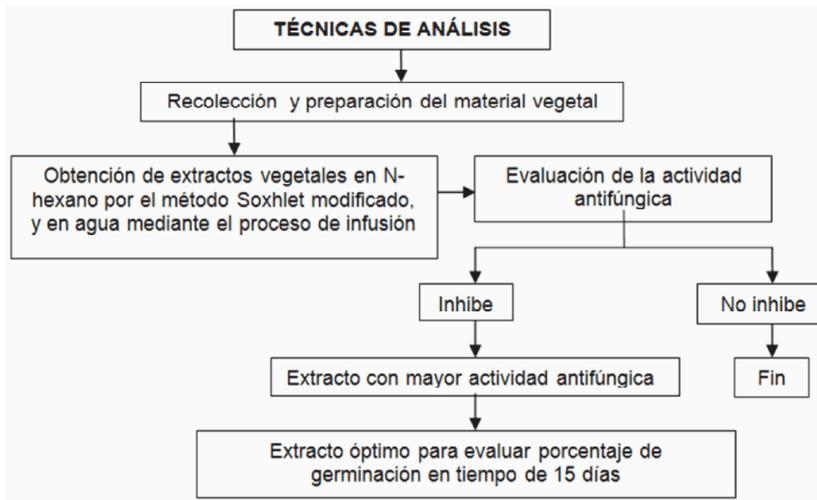
Fuente: Ducón, J., Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

Para efectuar los ensayos correspondientes a la fase *In Vitro*, se utilizó la cepa de *Sclerotium cepivorum* proveniente de Tibasosa (Boyacá).

Metodología de laboratorio. La siguiente figura presenta el esquema seguido para la evaluación de los extractos vegetales.

Figura 12. Diagrama de flujo para la evaluación de los extractos vegetales



Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Recolección del material vegetal. El material vegetal empleado para la investigación comprende hojas y flores de Saúco (*Sambucus nigra*), y Ruda (*Ruta graveolens*), dicho material se tomó de una zona libre de contaminación y donde no se utilizaron fertilizantes ni fungicidas para tratar cultivo alguno. Las plantas fueron recolectadas con guantes y con ayuda de un bisturí. Así mismo, se tuvo en cuenta que tanto hojas y flores estuvieran en buen estado, sin vestigios de enfermedad y secas. Posteriormente se empacaron en bolsas plásticas para ser trasladadas de forma inmediata al laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Boyacá.

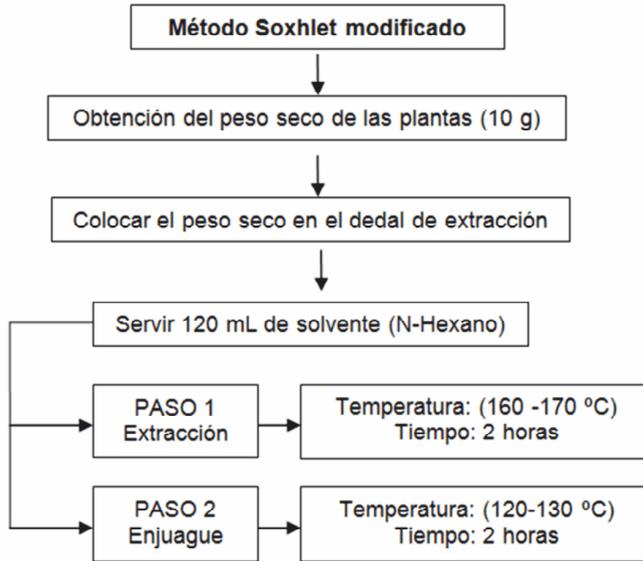
Preparación del material vegetal. Para realizar la extracción por el método Soxhlet modificado, en el laboratorio se separaron las flores de las hojas que fueron colocadas en bandejas de aluminio para el proceso de secado en horno a 60°C durante 12 horas. Luego del secado, las plantas se trituraron y se tomaron 10g como peso de referencia, tanto de las hojas como las flores de saúco y ruda. El material seco se colocó por separado en envases de vidrio estériles. Para la preparación de las infusiones se utilizó material vegetal limpio y fresco, en diferentes cantidades según la concentración a preparar.

Obtención de extractos vegetales

Método Soxhlet modificado. En forma general, el método Soxhlet para la obtención de grasas y aceites, comprende tres pasos: extracción, lavado y secado. Obteniendo al final un residuo seco en el que se encuentra este material oleoso. En la obtención de los extractos vegetales evaluados en ésta investigación, el método Soxhlet fue modificado, omitiendo el paso del secado, con la finalidad de obtener un extracto líquido en el que estén disueltos los compuestos obtenidos a partir del material vegetal.

Diez gramos de material seco fueron puestos en los dedales del equipo Soxhlet; posteriormente se realizó la extracción con 120ml del solvente orgánico N-hexano, llevando a cabo los pasos de extracción y lavado, durante 2 horas cada uno. Los extractos obtenidos fueron almacenados a 4°C, en recipientes de color ámbar estériles. La siguiente figura explica el proceso llevado a cabo, teniendo en cuenta que el peso seco utilizado, el volumen del solvente, los tiempos y las temperaturas empleadas, son aquellas con las cuales se han obtenido mejores resultados en las extracciones realizadas con el equipo Soxhlet del laboratorio de Análisis Ambiental de la Universidad de Boyacá.

Figura 13. Obtención de extractos vegetales siguiendo el método Soxhlet modificado.



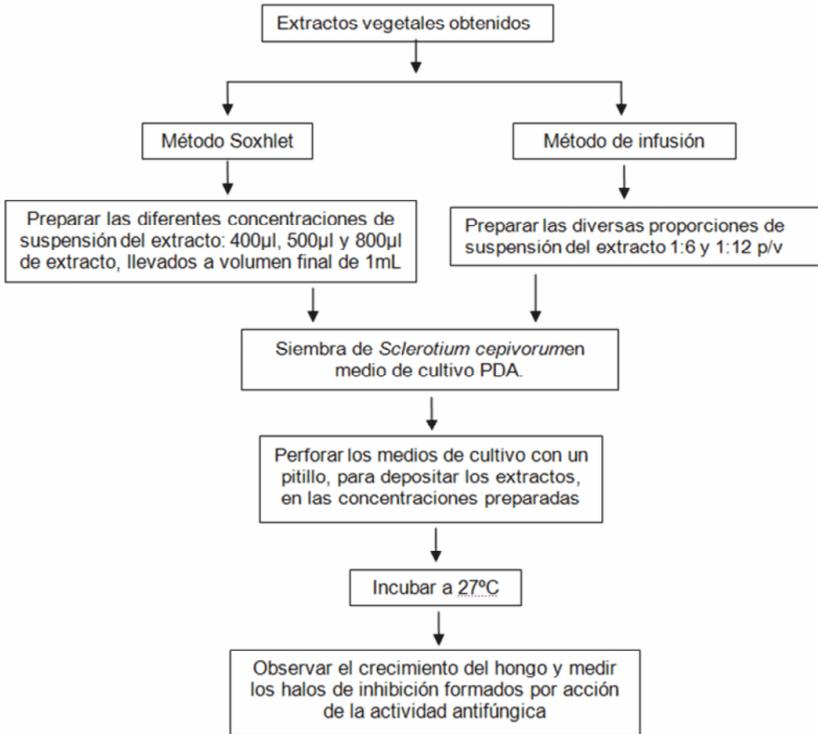
Fuente: Ramírez, L. (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Infusión. El material fresco, fue puesto en agua caliente a manera de infusión, en una proporción de 1:6 y 1:12 P/V y se llevó hasta punto de ebullición, donde permaneció por 30 minutos. La infusión obtenida fue filtrada y almacenada a 4°C, en recipientes de color ámbar estériles.

Evaluación de la actividad antifúngica. Para llevar a cabo este proceso con las muestras obtenidas mediante los dos métodos de extracción vegetal, se utilizó el medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa), sembrando los esclerocios en el centro de la caja de Petri. Este procedimiento se realizó por triplicado. Dos técnicas diferentes fueron aplicadas para la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos vegetales: la primera fue perforar los medios de cultivo con el fin de depositar los extractos puros o las diferentes concentraciones planteadas, en los pozos formados.

La segunda técnica consistió en el método de difusión con ayuda de sensidiscos de papel de filtro estériles impregnados del respectivo extracto a evaluar, puestos sobre el medio de cultivo en el cual se sembró el hongo. La siguiente figura resume el procedimiento seguido.

Figura 14. Diseño metodológico de la determinación de actividad antifúngica según Llerena y modificada por los autores



Fuente: Ramírez, L. (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (Ruta graveolens) y saúco (Sambucus nigra) sobre Sclerotium cepivorum, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

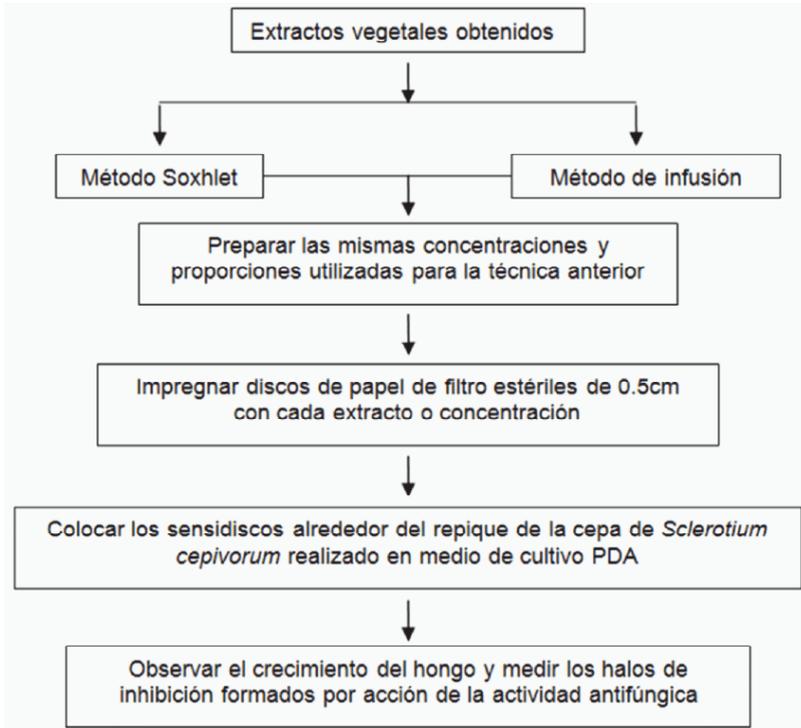
La preparación de las diversas concentraciones de los extractos obtenidos con el método Soxhlet modificado, se relaciona en el siguiente cuadro y figura:

Cuadro 3. Elaboración de las concentraciones según volúmenes

CONCENTRACIÓN	1	2	3	CONTROL
N-hexano	-	-	-	800 μ l
Extracto en N-hexano	400 μ l	500 μ l	800 μ l	-
Tween 20%	100 μ l	300 μ l	50 μ l	50 μ l
Agua destilada estéril	500 μ l	200 μ l	150 μ l	150 μ l
Volumen final	1ml	1ml	1ml	1ml

Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 15. Diseño metodológico para la evaluación de la actividad antifúngica

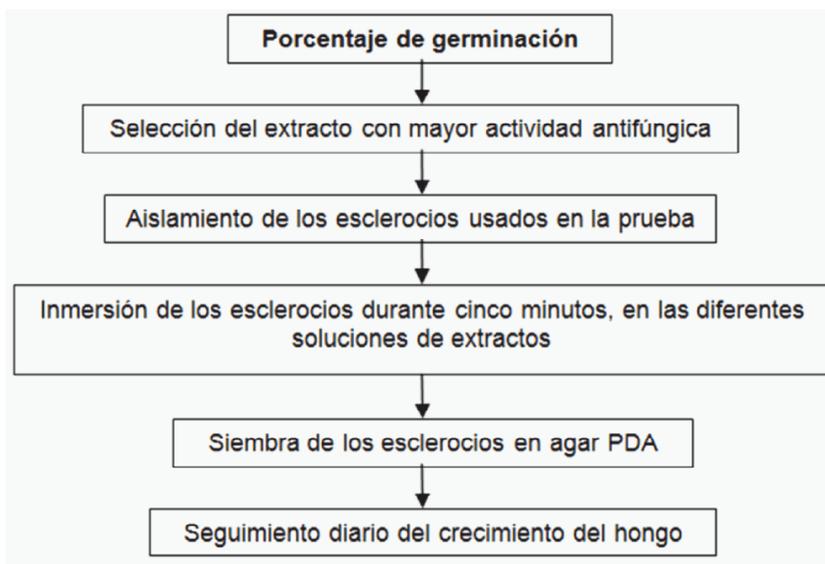


Fuente: Ramírez, L. (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Para el método de extracción Soxhlet modificado, el control negativo fue una mezcla de agua, solvente de extracción y buffer Tween al 20%. Para el método de extracción por infusión, el control fue agua destilada estéril. El control positivo para cada método fue un repique del hongo *Sclerotium cepivorum* en caja de Petri con agar PDA.

Evaluación del porcentaje de germinación. Una vez determinado el extracto que presentó mayor actividad antifúngica, se procedió a determinar el porcentaje de germinación, de la manera como se presenta en la siguiente figura.

Figura 16. Diseño metodológico para determinación del porcentaje de germinación.



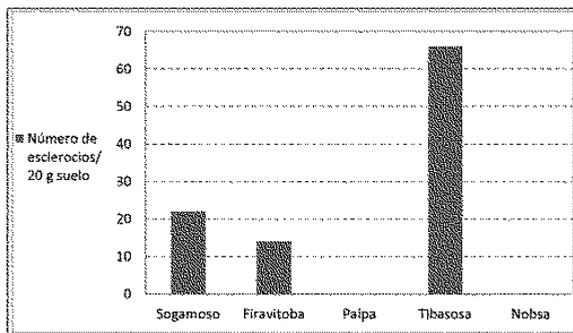
Fuente: Ramírez, L. (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Para la obtención de los esclerocios a probar se utilizó la cepa de muestra del estudio descrita previamente. Dicha cepa se sembró en agar PDA, obteniéndose esclerocios luego de aproximadamente 15 días de incubación. Cerca de 300 esclerocios fueron seleccionados para la prueba y se aislaron en una caja de Petri estéril; posteriormente fueron impregnados por cinco minutos en cada una de las concentraciones y proporciones preparadas para la prueba de inhibición, y finalmente se sembraron cinco esclerocios por cada caja de Petri con agar PDA. Con cada uno de los extractos se evaluaron 6 cajas de Petri. El seguimiento se realizó durante quince días, evaluando el crecimiento y la evolución del cultivo.

CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD DE INÓCULO Y VIABILIDAD DE ESCLEROCIOS

En el Distrito de Riego del Alto Chicamocha, en los municipios de Sogamoso, Paipa, Nobsa, Tibasosa y Firavitoba, se evaluaron 43 lotes para la determinación de la densidad de inóculo y viabilidad del hongo *S. cepivorum*. Se aislaron esclerocios en el 27.9% de los lotes evaluados, ubicados en los municipios de Tibasosa, Sogamoso y Firavitoba. En total se obtuvieron 102 esclerocios/20g de suelo, de los cuales 66 (64.7%) pertenecen al municipio de Tibasosa, 22 (21.6%) a Sogamoso y 14 (13.7%) a Firavitoba. La siguiente figura representa lo anteriormente expuesto.

Figura 17. Número de esclerocios aislados en los 5 municipios evaluados del Distrito de Riego del Alto Chicamocha

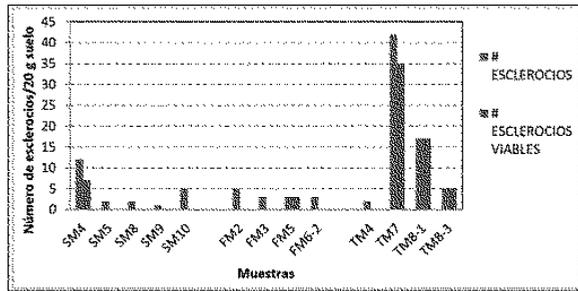


Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa* L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

En cuanto al número de esclerocios aislados en cada lote y la viabilidad de éstos, se observa en el municipio de Sogamoso que de los 5 lotes en dónde se encontraron esclerocios, sólo en el identificado como SM4 una viabilidad del 58.3% correspondiente a 7 esclerocios en

crecimiento de 12 aislados. En el municipio de Firavitoba la viabilidad es del 100% en el lote FM5 correspondiente a 3 esclerocios aislados y viables. En Tibasosa se encontró en el lote TM7 de 42 esclerocios aislados, sólo 35 fueron viables correspondientes al 83.3%; y en el lote identificado como TM8 la viabilidad es del 100%, observando germinación de 17 esclerocios encontrados en la submuestra TM8-1 y 5 en TM8-3, de acuerdo con lo presentado en la siguiente figura.

Figura 18. Número de esclerocios aislados en cada lote y viabilidad de estos



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

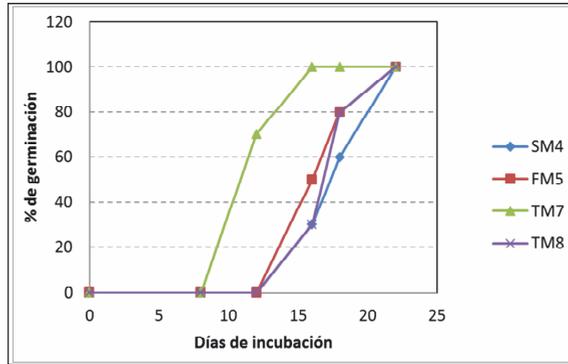
CUANTIFICACIÓN SEGÚN LA CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

Cinética de crecimiento. Los resultados obtenidos en este procedimiento no son significativos, debido a que la metodología propuesta no fue la adecuada para el desarrollo de la curva de crecimiento, encontrándose que *Sclerotium cepivorum* probablemente necesite más de 20 días de incubación para obtener datos representativos.

Efecto de la concentración de iones hidrógeno

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 3.9. Bajo el efecto de esta concentración de iones hidrogeno, se identifican diferencias entre las cepas evaluadas. Se observó que *S.cepivorum* TM7 inició la germinación en el día 12, siendo rápida en contraste con los otros aislamientos que lo iniciaron 16 días después, de acuerdo con lo presentado en la siguiente figura.

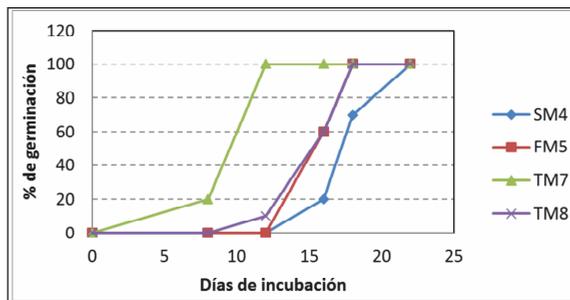
Figura 19. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 3.9 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8.



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno Sclerotium cepivorum de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 4.8. En este pH la germinación de TM7 inicia antes que todas las cepas, obteniendo el 100% de germinación el día 12 de incubación, FM5 y TM8 al día 18 y SM4 al día 22, conforme se presenta en la siguiente figura.

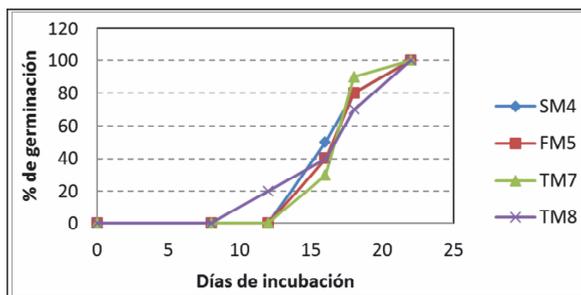
Figura 20. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 4.8 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno Sclerotium cepivorum de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación a pH 5.9. El comportamiento de las cepas bajo esta concentración de iones hidrogeno es similar, observando una mínima diferencia en TM8, para la cual la germinación inicia en el día 12. En las 4 cepas el 100% de germinación se presenta en el día 22 de incubación. Este pH tiene un efecto negativo sobre TM7 debido a que su inicio de germinación es más lento que los anteriores pH mencionados, como se aprecia en la siguiente figura.

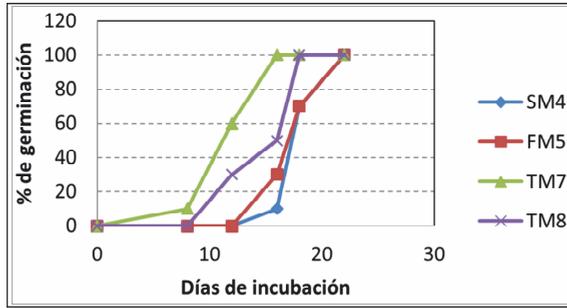
Figura 21. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 5.9 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno Sclerotium cepivorum de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 6.9. La siguiente figura presenta la heterogeneidad en los resultados de crecimiento bajo esta condición de pH. La cepa TM7 inicia el porcentaje de germinación a los 8 días, obteniendo el 100% a los 16 días. TM8 inicia el porcentaje de germinación a los 12 días y obtiene el 100% a los 18 días. SM4 y FM5 inician y obtienen el 100% de germinación en los mismos días de incubación, pero difieren en el porcentaje de germinación obtenido en el día 18, para SM4 es de 10% y para FM5 es de 30%.

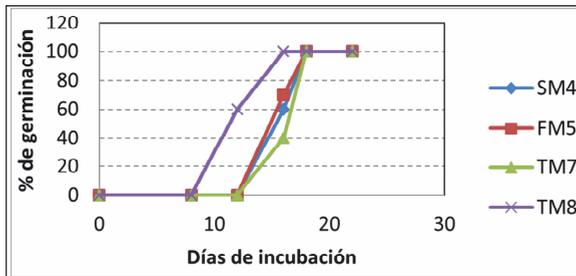
Figura 22. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 6.9 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8.



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 7.5. La cepa TM8 presenta diferencia con respecto a las otras, inicia su porcentaje de germinación a los 12 días y llega al 100% a los 16 días de incubación; SM4, FM5 y TM7 tienen similar comportamiento iniciando a los 16 días y terminando el 100% de la germinación a los 18 días, como se presenta en la siguiente figura.

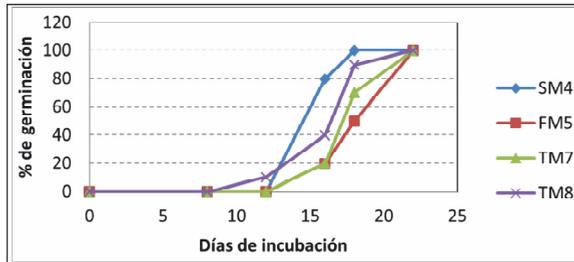
Figura 23. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 7.5 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8.



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 7.9. El comportamiento de la cepa SM4 bajo el efecto de este pH indica un tiempo de adaptación al medio debido a que en el día 16 de incubación presenta un % de germinación elevado del 80%, en las otras cepas el porcentaje de germinación va aumentando paulatinamente, observando similitudes en TM7 y FM5; en TM8 el inicio la germinación es en día 12 y culminando al igual que las dos cepas anteriormente mencionada el día 22 de incubación el 100% de la germinación. Los resultados de las pruebas se aprecian en la siguiente figura.

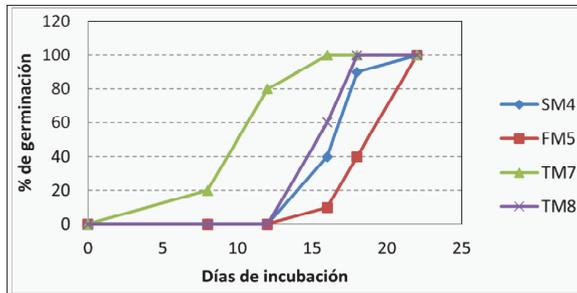
Figura 24. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 7.9 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8.



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno Sclerotium cepivorum de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 8.9. La cepa identificada como TM7 presenta un 100% de germinación al día 16, siendo más rápido que las otras cepas analizadas; SM4, FM5 y TM8 inician el porcentaje de germinación el día 16, terminando SM4 y FM5 el día 22 y TM8 el día 18 (ver siguiente figura).

Figura 25. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de pH 8.9 para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8.



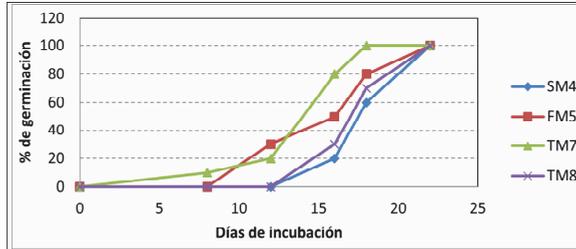
Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Efecto de la concentración osmótica

Bajo concentración de Glucosa. A continuación se presenta la evolución de la germinación de esclerocios bajo el efecto de diversas concentraciones de Glucosa.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración 0.0 M de glucosa. La cepa TM7 presenta un inicio de porcentaje de germinación a los 8 días de incubación llegando a los 18 días al 100% de esta; FM5 presenta inicio de porcentaje de germinación a los 12 días; TM8 y SM4 inician el porcentaje de germinación a los 16 días llegando al igual que FM5 al 100% el día 22 de incubación.

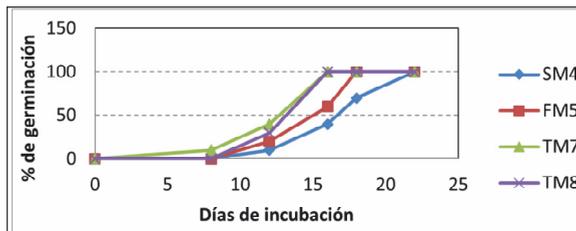
Figura 26. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de glucosa 0.0 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8.



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración 0.05 M de glucosa. Bajo esta concentración de glucosa, las cepas se comportan de manera diferente. TM7 presenta el 10% de germinación el día 8, llegando al 100% el día 16; este mismo porcentaje de germinación presenta TM8, pero iniciando a evidenciar este porcentaje el día 12 de incubación. FM5 y SM4 al igual que TM8 inicia el mismo día el porcentaje de germinación, pero la obtención del 100% para FM5 es el día 18 y para SM4 el día 22. Los resultados de ésta prueba se presentan en la siguiente figura.

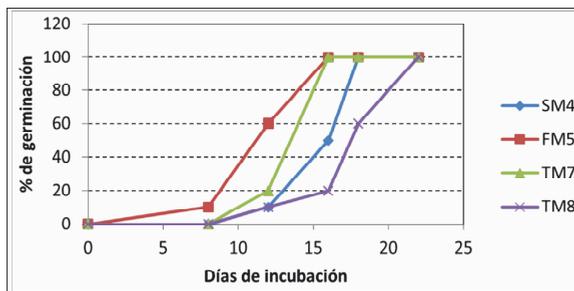
Figura 27. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de glucosa 0.05 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración 0.145 M de glucosa. El comportamiento de las cepas estudiadas bajo esta concentración de glucosa es diferente en todos los casos. Para FM5 inicia con el 10% de germinación el día 8, TM7 inicia el día 12 al igual que SM4 y TM8; el 100% de esta germinación en FM5 y TM7 es el día 16, para SM4 el día 18 y para TM8 el día 22, tal como se ve en la siguiente figura.

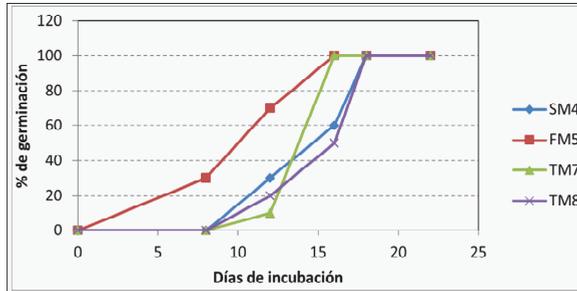
Figura 28. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de glucosa 0.145 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno Sclerotium cepivorum de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración 0.25 M de glucosa. Las cepas evaluadas en el estudio, presentan un comportamiento similar que el presentado bajo la concentración 0.145 M, observándose que para FM5, TM7 y SM4 el inicio y término del porcentaje de germinación es el mismo día, para TM8 inician el mismo día el porcentaje de germinación pero obtienen el 100% el día 18 de incubación. Dicho comportamiento se aprecia en la siguiente figura.

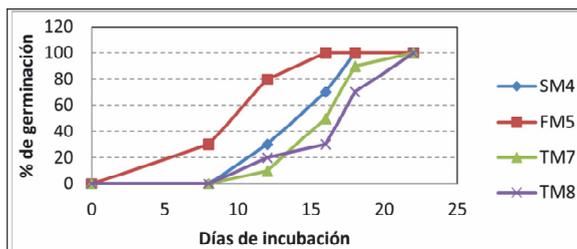
Figura 29. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de glucosa 0.25 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración 0.5 M de glucosa. La cepa FM5 tiene un comportamiento igual bajo las concentraciones de 0.145 M y 0.25 M en cuanto inicio y termino del porcentaje de germinación. Para SM4, TM8 y TM7 el inicio del porcentaje de germinación es el día 12, llegando al 100%, SM4 el día 18 y TM8 y TM7 el día 22 de incubación. Los resultados se presentan en la siguiente figura.

Figura 30. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de glucosa 0.5 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8

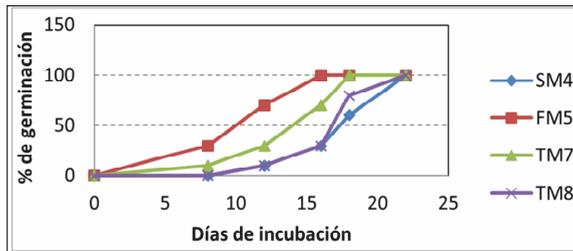


Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Bajo concentración de cloruro de sodio – NaCl. A continuación se presenta la evolución de la germinación de esclerocios bajo el efecto de diversas concentraciones de Cloruro de Sodio.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración 0.0 M de NaCl. Las cepas FM5 y TM7 inician su germinación el día 8, llegando al 100%, FM5 el día 16 y TM7 el día 18. Las cepas TM8 y SM4 tienen un comportamiento de porcentaje de germinación similar, presentando el 10% y 30% de germinación los días 12 y 16 de incubación respectivamente, variando el porcentaje de germinación para el día 18, para TM8 es del 80% y para SM4 es del 60%, obteniendo así el 100% de germinación el día 22 las dos cepas (ver siguiente figura).

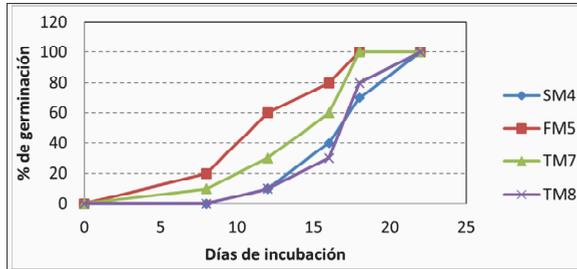
Figura 31. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de NaCl 0.0 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno Sclerotium cepivorum de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración 0.145 M de NaCl. El comportamiento de las 4 cepas estudiadas es similar al presentado bajo la concentración de 0.0 M. Las cepas FM5 y TM7 presentan inicio de porcentaje de germinación el día 8 y llegan a un 100% el día 18 de incubación. SM4 y TM8 inician el 10% de su germinación el día 12 y llegan al 100% el día 22, como se aprecia en la siguiente figura.

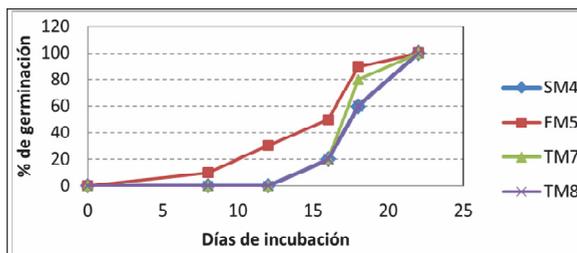
Figura 32. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de NaCl 0.145 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración 1.0 M de NaCl. Bajo esta concentración de sal, las cepas TM7, TM8 y SM4 presentan un comportamiento similar, iniciando con el 20% de germinación el día 18, llegando al 100% el día 22. Para FM5 inicia con el 10% de germinación el día 8 llegando al 100% al igual que las otras el día 22 de incubación. Los resultados de las pruebas se presentan en la siguiente figura.

Figura 33. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración de NaCl 1.0 M para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8



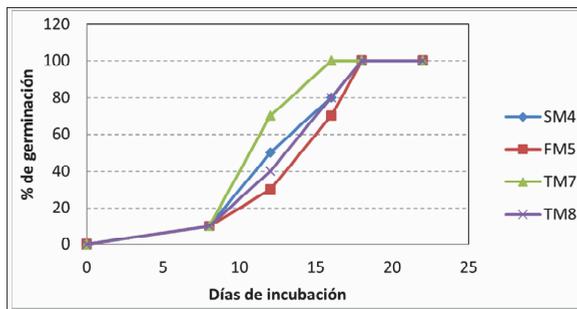
Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la concentración 2.0 y 2.5 M de NaCl. Los esclerocios evaluados de *Sclerotium cepivorum*, son inhibidos bajo la concentración de 2.0 y 2.5 M de NaCl, lo que indica que no soportan altas concentraciones de sal.

Efecto de la aireación

Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto del oxígeno del medio ambiente. El porcentaje de germinación de las cepas evaluadas es similar, inician el día 8 con el 10%, para el día 16 TM7 presenta el 100% de germinación, y las otras cepas el día 18 de incubación, como se ve en la siguiente figura.

Figura 34. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto del oxígeno del medio ambiente para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

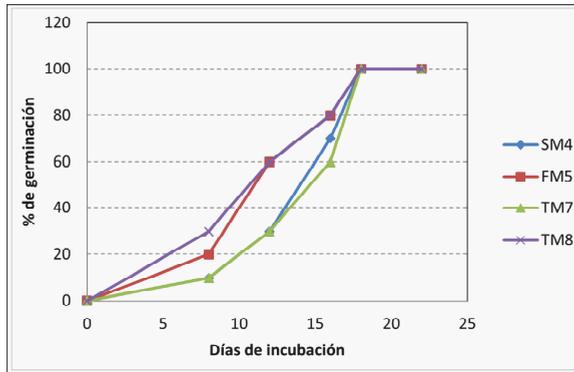
Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de 5.0% de CO₂ y anaerobiosis. El efecto de exponer los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* a condiciones de 5% de CO₂ y anaerobiosis es la inhibición total en el crecimiento de los cuatro aislamientos evaluados.

Efecto de la temperatura

Porcentaje de germinación de esclerocios a 15°C de temperatura. En estas condiciones de temperatura las cuatro cepas inician su porcentaje de germinación el día 8 y llegan al 100% el día 18 de incubación.

Todas presentan variación en el porcentaje de germinación desde el inicio de la incubación hasta la obtención del 100%, como se ve en la siguiente figura.

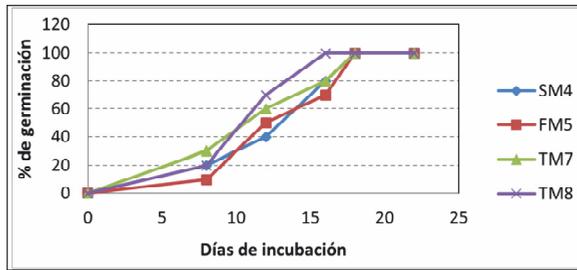
Figura 35. Porcentaje de germinación de esclerocios a temperatura de 15°C, para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios a 20°C de temperatura. El comportamiento de estas cepas es similar al presentado a temperatura de 15°C, inician el porcentaje de germinación el día 8 y llegan al 100% el día 18, exceptuando TM8 que obtiene éste porcentaje el día 16 de incubación.

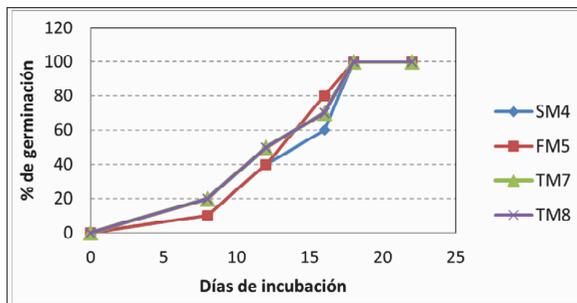
Figura 36. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la temperatura de 20°C para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8.



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno Sclerotium cepivorum de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Porcentaje de germinación de esclerocios a 25°C de temperatura. El comportamiento es igual que a 15°C en cuanto inicio y obtención del 100% de la germinación. El porcentaje de germinación de las cepas durante el tiempo de incubación fue similar, observando para TM7 y TM8 el mismo porcentaje, para SM4 y FM5 sólo varió en el día 16 con 60% y 80% de germinación respectivamente, como se presenta en la siguiente figura.

Figura 37. Porcentaje de germinación de esclerocios bajo el efecto de la temperatura de 25°C para las muestras SM4, FM5, TM7 y TM8.



Fuente: Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno Sclerotium cepivorum de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

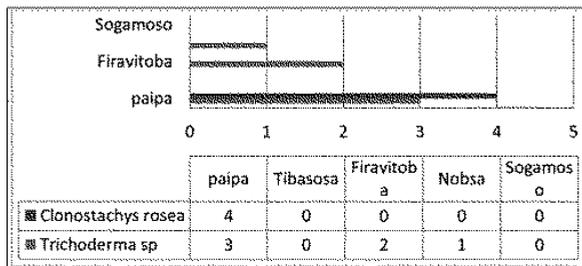
Porcentaje de germinación de esclerocios a 4°C y 37°C de temperatura. A una temperatura de 4°C se observó crecimiento de 1 esclerocio, correspondiente al 10% de germinación de la cepa TM8; para las otras cepas ésta temperatura inhibe el crecimiento. Para el caso de los 37°C, se evidenció que esta temperatura no permite la geminación de los esclerocios de las cepas evaluadas.

Condiciones nutricionales. En la evaluación realizada de *Sclerotium cepivorum* bajo este parámetro de crecimiento, no se obtuvo crecimiento del hongo con la metodología propuesta por Koneman (1994), que recomienda el medio de cultivo diseñado por Lodder y Bastide para la realización del auxonograma del hongo.

CUANTIFICACIÓN SEGÚN AISLAMIENTO DE BIOCONTROLADORES

En la siguiente figura se muestra la distribución de las cepas aisladas por municipio perteneciente al distrito de riego alto chicamocha (Tibasosa, Sogamoso, Firavitoba, Paipa y Nobsa), observándose un total de 10 aislamientos, de los cuales 4 (40%) corresponden a *Clonostachys rosea* provenientes del municipio de Paipa, 6 (60%) corresponden a aislamientos de *trichoderma sp* distribuidos de la siguiente manera: 3 (30%) del municipio de Paipa, 2 (20%) del municipio de Firavitoba y 1(10%) del municipio de Nobsa. También se pudo observar que en el municipio de Tibasosa y Sogamoso no se encontraron cepas de biocontroladores tanto de *Trichoderma sp* como de *Clonostachys rosea* y, en los municipios de Firavitoba y Nobsa, no se encontraron cepas de *Clonostachys rosea*.

Figura 38. Número de esclerocios aislados según municipio

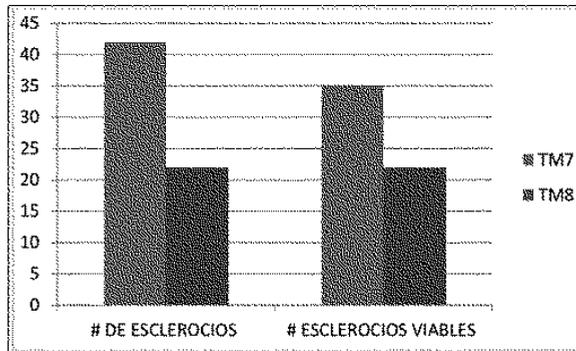


Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de *Trichoderma sp* y *Clonostachys rosea* como posibles biocontroladores del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo *Allium cepa L.* Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Según lo descrito anteriormente, se observa que la mayoría de los aislamientos de biocontroladores corresponden al municipio de Paipa, lo cual se puede relacionar con estudios que evalúan la densidad de inóculo del fitopatógeno en este municipio, igualmente como se muestra en la Figura 38, se observa que el número de esclerocios aislados en dicho municipio es de cero (0), lo cual estaría relacionado con el hecho de que posiblemente los agricultores tienen un mejor manejo de los cultivos, lo que les permitiría controlar la propagación de la enfermedad en sus lotes, ya que se encuentran en áreas en donde la incidencia es baja.

Para el fitopatógeno se evidenció que el municipio de Tibasosa correspondió al área de mayor densidad de inóculo, donde se tuvo en cuenta dos muestras que corresponden a las dos fincas con mayor número de esclerocios aislados y hacen referencia a TM7 y TM8 respectivamente como se muestra en la siguiente figura, donde se pueden ver los esclerocios aislados en cada lote. Sobre su viabilidad se puede afirmar que en el lote TM7, de 42 esclerocios aislados sólo 35 fueron viables, correspondientes al 83.3%; en el lote identificado como TM8 la viabilidad es del 100%, observando germinación de los 22 esclerocios encontrados en esta muestra.

Figura 39. Número de esclerocios aislados en cada lote y viabilidad de estos.



Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de Thichoderma sp y Clonostachys rosea como posibles biocontroladores del fitopatógeno Sclerotium cepivorum causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo Allium cepa L. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Como se aprecia en la figura, hay mayor número de esclerocios aislados en la muestra TM7, pero con menor número de esclerocios viables, a diferencia de la muestra TM8 donde se presentan menor número de esclerocios aislados pero con un índice de viabilidad del 100%. Lo anterior puede obedecer a las diferencias en el tiempo o periodo de permanencia en suelos cultivados con cebolla. Para estos esclerocios el porcentaje de sobrevivencia se mantiene por encima del 92% hasta un 98% entre los 5 a 10 años de permanencia de los mismos. Si el período de permanencia aumenta de 15 a 20 años, los porcentajes de viabilidad oscilan entre 72 y 96%.

PRUEBAS DE ANTAGONISMO

Para las pruebas de Antagonismo se designaron los tratamientos con una referencia, para permitir el análisis del mismo, tal como se presentan en el siguiente cuadro. Como ejemplo se presenta que el tratamiento: *Trichoderma* PM amarillo + TM7, equivale a una especie de *Trichoderma* encontrada en el municipio de Paipa con pigmentación amarilla, el cual fue enfrentado con una muestra de *Sclerotium cepivorum* del lote número siete (7) del municipio de Tibasosa.

Cuadro 4. Nomenclatura de los tratamientos empleados

TRATAMIENTO	REFERENCIA
Trichoderma PM amarillo + TM7	T1
Tichoderma PM amarillo + TM8	T2
Trichoderma PM5 + TM7	T3
Trichderma PM5 + TM8	T4
Trichoderma FM7 10 ² B+ TM8	T5
Trichoderma FM7 10 ² B +TM7	T6
Trichoderma FM6 10 ² +TM8	T7
Trichoderma FM6 10 ² +TM7	T8
Trichoderma PM4 BC2 +TM8	T9
Trichoderma PM4 BC2 + TM7	T10
Clonostachys PM3 +TM8	T11
Clonostachys PM3 + TM7	T12
Clonostachys 2PM2 + TM8	T13

TRATAMIENTO	REFERENCIA
Clonostachys 2 PM 2 + TM7	T14
Clonostachys 2(pend) PM3 +TM8	T15
Clonostachys 2(pend) PM3 +TM7	T16
Clonostachys 3 PM 2 +TM8	T17
Clonostachys 3 PM 2 +TM7	T18
Trichoderma NM5 10 ² A + TM7	T20

Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de Trichoderma sp y Clonostachys rosea como posibles biocontroladores del fitopatógeno Sclerotium cepivorum causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo Allium cepa L. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

NM: muestra de biocontrolador del municipio de Nobsa, PM: muestra biocontrolador del municipio de Paipa, FM: muestra biocontrolador del municipio de Firavitova, TM: muestra de esclerocios del municipio de Tibasosa.

En el siguiente cuadro, se presentan los promedios obtenidos de las tres réplicas hechas para cada tratamiento, los cuales fueron leídos teniendo en cuenta la escala de Ethur. Sólo se muestran los datos de los tratamientos que fueron significativos (no se contaminaron) bajo la observación macroscópica, teniendo en cuenta las variables como distribución de la colonia en la caja y el tiempo de crecimiento. Esta observación permitió descartar los tratamientos: T5, T6, T13, T14, T17, T18, T19 y T20.

Cuadro 5. Lectura de las pruebas de antagonismo de los tratamientos evaluados según escala de Ethur. (Periodo de cada lectura, corresponde a 2 días de crecimiento)

TRATAMIENTO	LEC. 1	LEC. 2	LEC. 3	LEC. 4	LEC. 5	LEC. 6	LEC. 7	LEC. 8	LEC. 9
T1	1	1							
T2	2	1							
T3	2	1							
T4	2	2							

TRATAMIENTO	LEC. 1	LEC. 2	LEC. 3	LEC. 4	LEC. 5	LEC. 6	LEC. 7	LEC. 8	LEC. 9
T7	2	2							
T8	2	2							
T9	2	1							
T10	2	1							
T11	3	4	4	4	4	4			
T12	3	4	4	4	4	4	4		
T15	3	3	3	3	3	3	3		
T16	3	3	4	4	4	4	4	4	4

Fuente Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de *Thichoderma sp* y *Clonostachys rosea* como posibles biocontroladores del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo *Allium cepa* L. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

1, Antagonista (biocontrolador) crece por toda la caja de petri; 2, Antagonista (biocontrolador) crece sobre dos terceras partes de la caja de petri; 3, Antagonista (biocontrolador) y patógeno crecen hasta la mitad de la caja de petri; 4, Patógeno crece sobre dos terceras partes de la caja de petri; 5, Patógeno crece por toda la caja de petri.

La primera lectura corresponde a un periodo de crecimiento de dos días, allí se evidenció que para T2, T3, T4, T7, T8, T9 y T10, la lectura correspondía en la escala de Ethur a 2 (antagonista creció sobre las 2/3 partes de la caja de petri), a diferencia de T1 para la cual su lectura correspondía a 1 (antagonista crece por toda la caja de petri), lo cual demuestra que con la cepa PM amarillo el control fue más eficiente para TM8. Con respecto a las muestras T11, T12, T15 y T16; la primera lectura corresponde en la escala de Ethur a 3 (patógeno y antagonista crecen hasta la mitad de la caja). El comportamiento anterior indica que los tratamientos con *Clonostachys rosea* fueron diferentes ya que permitieron un mayor crecimiento del patógeno evidenciando que este necesita más tiempo para controlar eficazmente su desarrollo.

En la segunda lectura que corresponde a 4 días de crecimiento se evidenció que para T1, T2, T3, T9 y T10; el comportamiento fue de 1 en la escala de Ethur mientras que para T4, T7 y T8, el comportamiento fue igual al de la lectura anterior; a ninguno de estos tratamientos

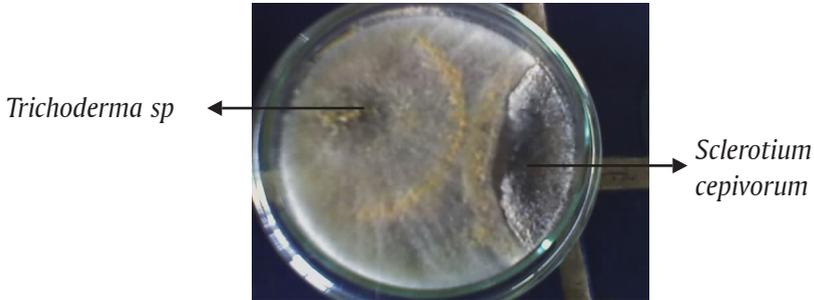
se les hicieron más lecturas debido a que el biocontrolador ya había crecido por toda la caja de petri. Para T11, su lectura correspondió a 4 en la escala de Ethur, y para T12, T15 y T16; fue de 3. Esto indica que para T1, T2, T3, T9 y T10; el biocontrolador ya había inhibido completamente el desarrollo del patógeno, en un periodo de tiempo muy corto, comparado con el de *Clonostachys rosea*.

A partir de la tercera lectura el comportamiento fue el mismo para T11 y T16 ya que su lectura correspondió a 4 en la escala de Ethur, y para los tratamientos T12 y T15 fue de 3.

Con base en lo anterior se deduce que el poder de control que ejerció el antagonista sobre el patógeno no fue el mejor porque su crecimiento era muy lento y permitía que el patógeno se desarrollara en un gran porcentaje del diámetro de la caja de petri. Al compararlo con los controles (ver cuadro 3) se observa que el biocontrolador cuando se encuentra enfrentado con el patógeno crece con mayor rapidez debido a que este compite por nutrientes y por espacio.

La siguiente figura muestra el tipo de antagonismo presentado por *Trichoderma sp* en donde se evidencia un contacto directo entre el patógeno y el antagonista, que se caracteriza por un entrecruzamiento de las hifas de *Trichoderma sp* con las de *Sclerotium cepivorum* iniciando en el lugar de contacto.

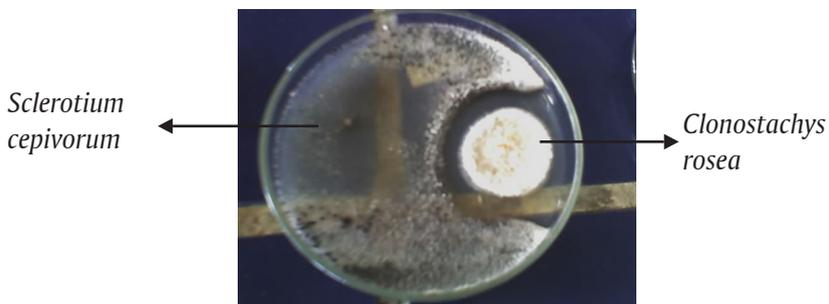
Figura 40. Enfrentamiento de *Trichoderma sp* con *Sclerotium cepivorum*



Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de *Trichoderma sp* y *Clonostachys rosea* como posibles biocontroladores del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo *Allium cepa L.* Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

En la siguiente figura se observa el tipo de antagonismo presentado por *Clonostachys rosea* donde se evidencia un halo de inhibición entre el patógeno y el antagonista en el lugar de enfrentamiento que se caracteriza por un mecanismo de antibiosis generado por el biocontrolador frente a *Sclerotium cepivorum*.

Figura 41. Enfrentamiento de *Clonostachys rosea* con *Sclerotium cepivorum*



Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de *Trichoderma sp* y *Clonostachys rosea* como posibles biocontroladores del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo *Allium cepa L.* Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Control de crecimiento para biocontrolador y patógeno. A continuación se presentan los resultados relacionados con los crecimientos de biocontrolador y patógeno respectivamente. El siguiente cuadro muestra la característica de lectura para el crecimiento de los controles.

Cuadro 6. Característica de lectura para crecimiento de los controles (para biocontroladores y patógeno)

ÍNDICE	INDICADOR
	PORCENTAJE DE CRECIMIENTO EN CAJA DE PETRI (%)
1	< 10
2	25
3	50
4	75
5	100

Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de Trichoderma sp y Clonostachys rosea como posibles biocontroladores del fitopatógeno Sclerotium cepivorum causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo Allium cepa L. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

En el cuadro 5 se observa el crecimiento del biocontrolador en el medio de cultivo sin patógeno, con el fin de evidenciar su desarrollo con respecto al tiempo. De acuerdo a lo anterior se aprecia que las cepas de *Trichoderma sp* en la primera lectura que corresponde a los dos días de crecimiento había abarcado el 25% del diámetro de la caja de petri, en la segunda lectura que corresponde a los 4 días de crecimiento, se nota que su distribución corresponde al 50% del diámetro de la caja de petri. La tercera lectura que corresponde al sexto día de incubación, permite observar que su distribución en la caja de petri corresponde al 75% del diámetro de ésta y, la cuarta lectura correspondiente al octavo día de crecimiento, evidenció una distribución del 100% del diámetro de la caja de petri.

A diferencia de *Trichoderma sp*, *Clonostachys rosea* presentó un crecimiento más lento: en la primera lectura que corresponde a los dos días de crecimiento se observó una distribución de menos del 10% del diámetro de la caja de petri, desde la segunda lectura hasta la

quinta lectura que corresponden al cuarto, sexto, octavo y décimo día de crecimiento se observó una distribución del 25% del diámetro de la caja de petri. La sexta y séptima lectura que corresponde al día doce y catorce de crecimiento se observó una distribución del 50% del diámetro de la caja de petri. A partir del día dieciséis se evidenció que el crecimiento se detuvo en un 50%. Por lo tanto, se realizó la lectura hasta el día dieciocho.

Cuadro 7. Control de crecimiento de Biocontroladores según días de lectura

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Th_PMa	2	3	4	5					
Th_FM6	2	3	4	5					
Th_PM5	2	3	4	5					
Th_PM4	2	3	4	5					
Clo_PM3	1	2	2	2	2	3	3	---	---
Clo_PM3pen	1	2	2	2	2	3	3	---	---

Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de Trichoderma sp y Clonostachys rosea como posibles biocontroladores del fitopatógeno Sclerotium cepivorum causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo Allium cepa L. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Th_PMa = Trichoderma PM Amarillo, Th_FM6 = Trichoderma FM6 10²A, Th_PM5 = Trichoderma PM5, Th_PM4 = Trichoderma PM4 BC2, Clo_PM3 = Clonostachys rosea PM3, Clo_PM3pen = Clonostachys rosea 2(pend) PM3.

Control de crecimiento para patógeno. En el cuadro 8, se observa el mismo comportamiento tanto en S_cp_TM7 como en S_cp_TM8, de acuerdo a los días de lectura y su distribución en la caja de petri. En la primera lectura que corresponde a los dos días de crecimiento se evidencia una distribución del 25% del diámetro de la caja de petri, en la segunda lectura se observa una distribución del 50% del diámetro de la caja de petri, con respecto a las lecturas 3, 4, 5, 6 y 7 se observó una distribución del 75% del diámetro de la caja de petri. A pesar de haber realizado nueve lecturas se aprecia que a partir de la tercera siempre se observó la misma distribución en el diámetro de la caja, mayor o igual al 75%.

Cuadro 8. Control de crecimiento para patógeno según días de lectura

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
S_cp_TM7	2	3	4	4	4	4	4	---	---
S_cp_TM8	2	3	4	4	4	4	4	---	---

Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de *Thichoderma sp* y *Clonostachys rosea* como posibles biocontroladores del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo *Allium cepa L.* Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

S_cp_TM7 = *Sclerotium cepivorum* aislado de Tibasosa Muestra 7;
 S_cp_TM8 = *Sclerotium cepivorum* aislado de Tibasosa Muestra 8.

Propagación de los biocontroladores. Los biocontroladores se sembraron masivamente en APD durante 20 días, posteriormente se inoculó una concentración de 10^5 esporas/ml en botellas con salvado de trigo.

Cuadro 9. Recuento de esporas y dilución final de trabajo (10^5)

	A	B	C	D	E	SUMA	CONCENTRACIÓN DE ESPORAS C1 (ml)	VOLUMEN V1 (ml)	CONCENTRACIÓN FINAL C2
Th_PMa	21	22	21	17	20	100	1,00E+09	0,003	1,00E+05
Th_FM6	25	31	22	25	28	130	1,30E+09	0,0023	1,00E+05
Th_PM5	7	8	11	10	7	43	4,30E+08	0,01	1,00E+05
Th_PM4	10	12	15	13	13	64	6,40E+06	0,47	1,00E+05
Clo_PM3	17	11	11	14	17	70	7,00E+05	4,27	1,00E+05
Clo_PM-3pen	53	65	72	61	81	331	3,30E+06	0,91	1,00E+05

Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de *Thichoderma sp* y *Clonostachys rosea* como posibles biocontroladores del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo *Allium cepa L.* Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Th_PMa = Trichoderma PM Amarillo, Th_FM6 = Trichoderma FM6 10²A, Th_PM5 = Trichoderma PM5, Th_PM4 = Trichoderma PM4 BC2, Clo_PM3 = Clonostachys rosea PM3, Clo_PM3pen = Clonostachys rosea 2(pend) PM3.

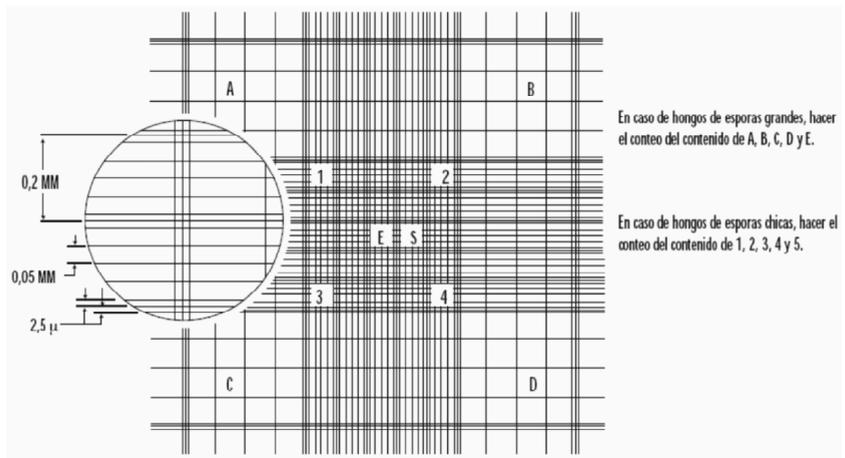
El cálculo para obtener la concentración requerida para el inóculo se realizó por conteo en cámara de Neubauer de la siguiente manera:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

Donde: V_1 = Volumen de esporas del conteo de la cámara.
 C_1 = Concentración de esporas.
 V_2 = 30 ml.
 C_2 = Concentración final de trabajo (10⁵).

Con los datos obtenidos del recuento de la cámara, se determina el valor de la media, que a su vez se multiplica por una constante (según cámara), obteniendo así la concentración de conidios (o esporas) por ml; concentración que corresponde a la suspensión inicial. La siguiente figura presenta el esquema de lectura seguido.

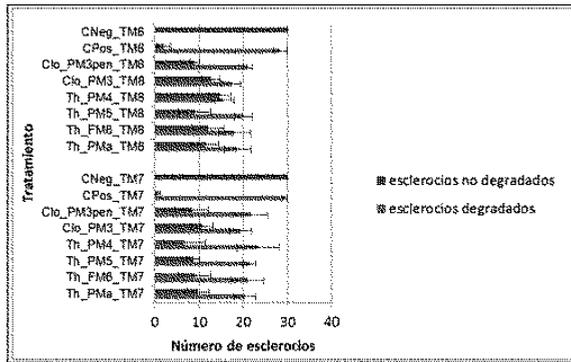
Figura 42. Esquema de lectura en cámara de Neubauer



Fuente: Gilchrist - Saavedra, L. (2005) Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada.. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 2 ed. Mexico. p. 78.

Prueba de degradación de esclerocios. La figura 43, muestra el número de esclerocios tanto degradados como no degradados de las muestras TM8 y TM7 cada uno con un tratamiento diferente respectivamente. Se aclara que para realizar las lecturas se tomaron 30 esclerocios de los 100 utilizados en el estudio.

Figura 43. Número de esclerocios degradados y no degradados para cada uno de los tratamientos y sus controles



Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de *Trichoderma sp* y *Clonostachys rosea* como posibles biocontroladores del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo *Allium cepa* L. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Th_PMa = *Trichoderma* PM Amarillo, Th_FM6 = *Trichoderma* FM6 10²A, Th_PM5 = *Trichoderma* PM5, Th_PM4 = *Trichoderma* PM4 BC2, Clo_PM3 = *Clonostachys rosea* PM3, Clo_PM3pen = *Clonostachys rosea* 2(pend) PM3.

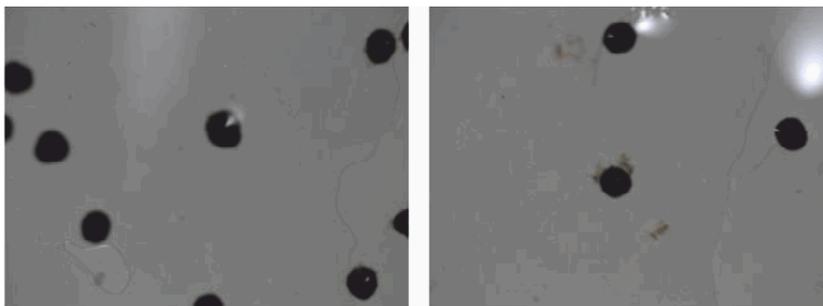
Número de esclerocios degradados por *Clonostachys rosea*. Con respecto a Clo_PM3pen_TM8 se observa que de 30 esclerocios, 21 (70%) fueron degradados, mientras que con el tratamiento Clo_PM3pen_TM7 22 esclerocios (72%) fueron degradados. Con el tratamiento Clo_PM3_TM8 se observa que de 30 esclerocios, 17 (57%) fueron degradados, mientras que en el tratamiento Clo_PM3_TM7, 19 esclerocios (64%) fueron degradados.

Número de esclerocios degradados por *Trichoderma sp*. Con respecto a Th_PM4_TM8 se observa que de 30 esclerocios, 15 (50%) fueron degradados, mientras que en Th_PM4_TM7, 23 esclerocios (77%) fueron

degradados, el tratamiento Th_PM5_TM8 muestra que 20 esclerocios (66%) fueron degradados, mientras que en Th_PM5_TM7, 21 esclerocios (70%) fueron degradados. En el tratamiento Th_FM6_TM8 se muestra que 18 esclerocios (60%) fueron degradados, mientras que en Th_FM6_TM7, 21 (70%) fueron degradados. Con el tratamiento Th_PMa_TM8 se ve que 18 esclerocios (60%) fueron degradados, mientras que en Th_PMa_TM7, 20 (66%) fueron degradados.

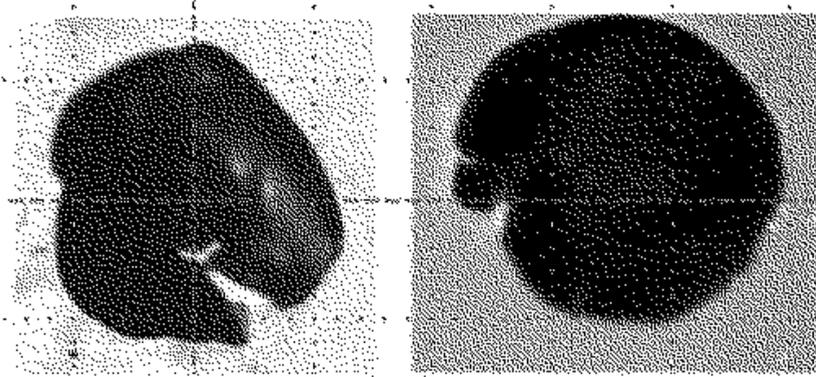
Según lo anterior, se deduce que tanto *Clonostachys rosea* como *Trichoderma sp* presentaron el mismo comportamiento, ya que en TM7 hay mayor degradación de esclerocios por parte de los dos microorganismos y en TM8 menor degradación de esclerocios por parte de estos. Se ha encontrado que hay mecanismos de destrucción de los esclerocios del patógeno por parte de algunos microorganismos como es el caso del micoparasitismo observado en *Trichoderma spp*, *Coniothyrium minitans*, *Sporidesmium sclerotivorum* y *Chaetomium globosum*. Las siguientes dos figuras muestran tanto los esclerocios degradados como aquellos no degradados.

Figura 44. Esclerocios no degradados



Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de *Trichoderma sp* y *Clonostachys rosea* como posibles biocontroladores del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo *Allium cepa* L. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 45. Esclerocios degradados

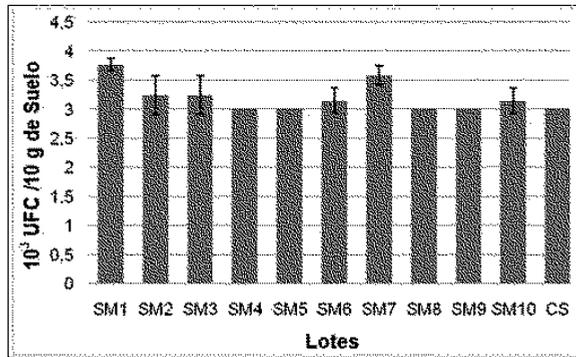


Fuente: Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de *Thichoderma sp* y *Clonostachys rosea* como posibles biocontroladores del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo *Allium cepa* L. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

CUANTIFICACIÓN SEGÚN MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS POR MUNICIPIO

Municipio de Sogamoso. El recuento de microorganismos celulolíticos fue mayor en los lotes SM1 a SM3, SM6, SM7 y SM10 con un promedio de 3.36 ± 0.09 UFC. $10g^{-1}$ de suelo. Al compararlo con el control 2.99 UFC. $10g^{-1}$ de suelo, se observa que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$). El lote que mayor presencia fue SM1 reportando valores de 3.77 ± 0.10 UFC. $10g^{-1}$ de suelo. La siguiente figura presenta el recuento de organismos para el municipio de Sogamoso.

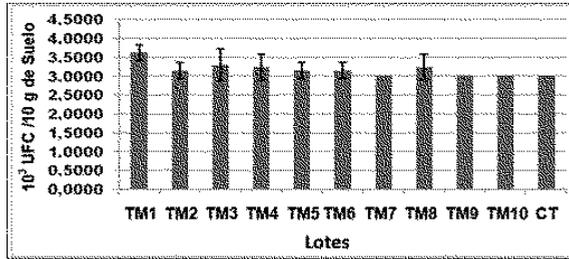
Figura 46. Recuento de microorganismos celulolíticos en el municipio de Sogamoso



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Tibasosa: El crecimiento de microorganismos celulolíticos fue mayor en los lotes TM1 hasta TM6 y TM8 con un recuento superior a 3.26 ± 0.18 UFC.10g⁻¹ de suelo, con respecto al control cuyo recuento fue menor 2.99 ± 0.00 UFC.10g⁻¹ de suelo. Sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre el control y el recuento de celulolíticos en los lotes. La siguiente figura presenta el recuento de organismos para el municipio de Tibasosa.

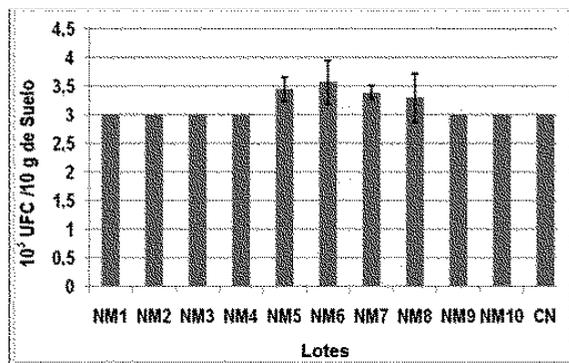
Figura 47. Recuentos de microorganismos celulolíticos en el municipio de Tibasosa



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Nobsa. El crecimiento de microorganismos celulolíticos fue mayor en los lotes NM5, NM6, NM7, NM8 con un recuento superior a 3.43 ± 0.14 UFC. $10g^{-1}$ de suelo, con respecto al control cuyo recuento fue menor 2.99 ± 0.00 UFC. $10g^{-1}$ de suelo. Sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre el control y el recuento de celulolíticos en los lotes. La siguiente figura presenta el recuento de organismos para el municipio de Nobsa.

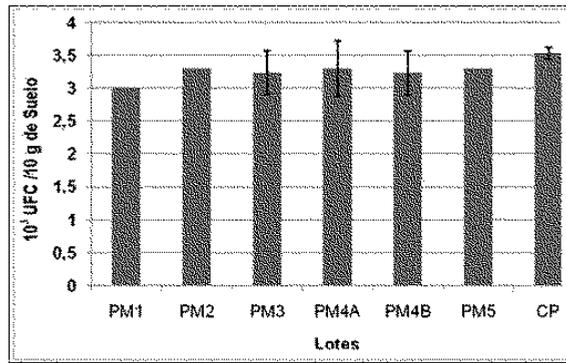
Figura 48. Recuento de microorganismos celulolíticos en el municipio de Nobsa



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Paipa. El recuento de microorganismos celulolíticos fue mayor en el control cuyo recuento fue de 3.54 ± 0.08 UFC. $10g^{-1}$ de suelo. Sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre el control y el recuento de celulolíticos en los lotes. La siguiente figura presenta el recuento de organismos para el municipio de Paipa.

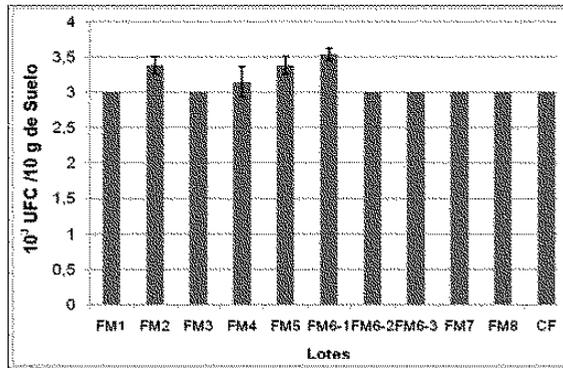
Figura 49. Recuento de microorganismos celulolíticos en el municipio de Paipa



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (allium cepa L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Firavitoba. El recuento de microorganismos celulolíticos fue mayor en los lotes FM2, FM4, FM5 y FM6-1, con valores promedio de 3.37 ± 0.05 UFC. $10g^{-1}$ de suelo. Al compararlos con el control (2.99 ± 0.05 UFC. $10g^{-1}$ de suelo), se observa que hay mayor presencia de estos grupos. Sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre el control y el recuento de celulolíticos en los lotes. La siguiente figura presenta el recuento de organismos para el municipio.

Figura 50. Recuento de microorganismos celulolíticos en el municipio de Firavitoba



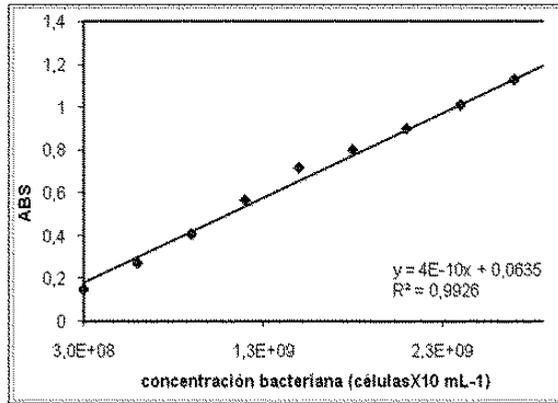
Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (Allium cepa L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Los recuentos de celulolíticos para hongos en todos los lotes fueron similares a los de las bacterias, lo cual refleja una posible relación de los diferentes grupos de microorganismos que están asociados, formando así un consorcio en la flora edáfica participante.

CUANTIFICACIÓN SEGÚN MICROORGANISMOS NITRIFICANTES POR MUNICIPIOS

Para el recuento de microorganismos nitrificantes se realizó una curva de lectura basada en la validación de la escala de McFarland, teniendo en cuenta los valores de las absorbancias obtenidas de la lectura a 640 nm. La ecuación de trabajo para la lectura fue $Y = 4E^{-10} + 0.063$, $r^2 = 0.992$, donde Y corresponde a la concentración de células en UFC.10 g⁻¹ y X a las absorbancias de las muestras contenidas en el medio. La siguiente figura muestra la curva de calibración empleada para las determinaciones realizadas.

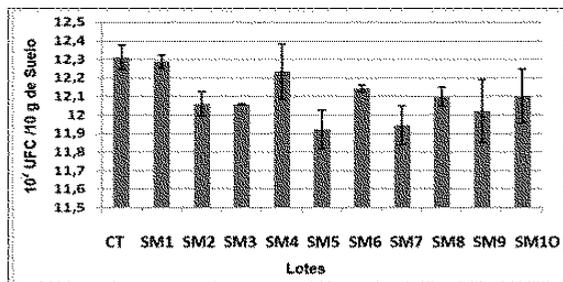
Figura 51. Curva de calibración de trabajo



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Sogamoso. En figura 52, se observa que la presencia de microorganismos nitrificantes es mayor en el control, $12,3 \pm 0,07$ UFC/10 g de suelo (suelo no intervenido), siendo el valor más bajo en SM5 $11,9 \pm 0,10$ UFC/10 g de suelo, esto debido probablemente al desgaste físico y químico del suelo por ser uno de los sectores donde más se presenta rotación de cultivos. Igualmente, por el uso indiscriminado de sustancias químicas para mantener el cultivo. Al realizar la prueba de ANOVA se evidencia que hay diferencia significativa entre los lotes ($p > 0,05$), de acuerdo con los resultados presentados en el cuadro 10.

Figura 52. Recuento de microorganismos nitrificantes en el municipio de Sogamoso.



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Cuadro 10. ANOVA Sogamoso según lotes: Nitrificantes

ANOVA

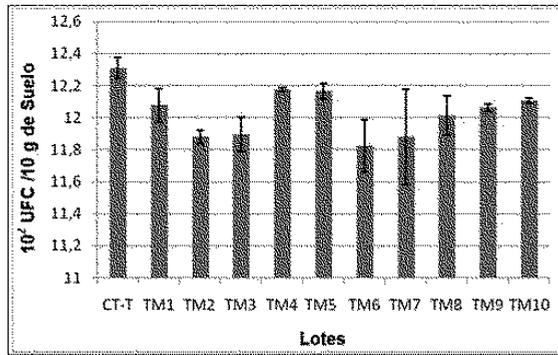
Lotes Sogamoso

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	82,500	9	9,167		
Intra-grupos	,000	0			
Total	82,500	9			

Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Tibasosa. En la siguiente figura se observa que la presencia de microorganismos nitrificantes fue menor en los lotes al compararla con el control, 12.31 ± 0.067 UFC/10 gramos de suelo (suelo no intervenido), esto debido probablemente al desgaste físico y químico del suelo por ser uno de los sectores donde más se presenta rotación de cultivos (según datos de la encuesta). El lote que presenta menor valor es TM6 (11.82 ± 0.16 UFC/10 gramos de suelo) Al realizar la prueba de ANOVA se evidencia que hay diferencia significativa entre los lotes ($p > 0.05$), (ver cuadro 11).

Figura 53. Recuento de microorganismos nitrificantes en el municipio de Tibasosa



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Cuadro 11. ANOVA Tibasosa según lotes: Nitrificantes

ANOVA

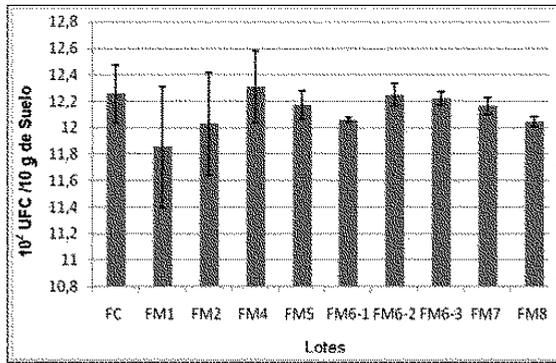
Lotes Tibasosa

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	82,500	9	9,167		
Intra-grupos	,000	0			
Total	82,500	9			

Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Firavitoba. En la figura 54, se observa que en el municipio de Firavitoba la presencia de microorganismos nitrificantes fue menor en los lotes FM1 y FM2 (11.85 ± 0.45 y 12.03 ± 0.38 UFC/10 gramos de suelo, respectivamente) al compararla con el control, 12.25 ± 0.21 UFC/10 gramos de suelo (suelo no intervenido), esto debido probablemente a las razones antes expuestas para los municipios ya analizados. Al realizar la prueba de ANOVA se evidencia que no hay diferencia significativa entre los lotes ($p > 0.05$), (ver cuadro 12).

Figura 54. Recuento de microorganismos nitrificantes en el municipio de Firavitoba



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

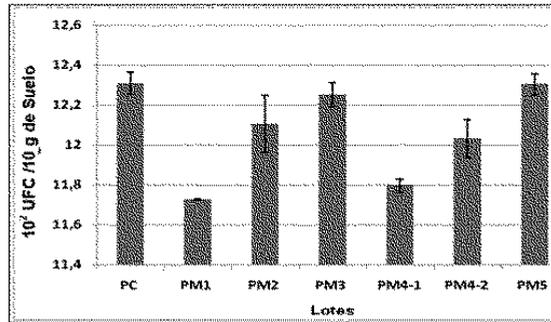
Cuadro 12. ANOVA Firavitoba según lotes: Nitrificantes

ANOVA					
lotes					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	53,214	5	10,643	21,286	,163
Intra-grupos	,500	1	,500		
Total	53,714	6			

Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Paipa. En la figura 55, se observa que en el municipio de Paipa la presencia de microorganismos nitrificantes fue menor en los lotes PM1, PM4-1, PM4-2 (11.73 ± 0.01 , 11.79 ± 0.03 y 12.03 ± 0.09 UFC/10 gramos de suelo, respectivamente) al compararla con el control, 12.31 ± 0.05 UFC/10 gramos de suelo (suelo no intervenido), esto debido a las razones antes expuestas para los otros municipios. Al realizar la prueba de ANOVA se evidencia que hay diferencia significativa entre los lotes ($p > 0.05$), (ver cuadro 13).

Figura 55. Recuento de microorganismos nitrificantes en el municipio de Paipa



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Cuadro 13. ANOVA Paipa según lotes: Nitrificantes

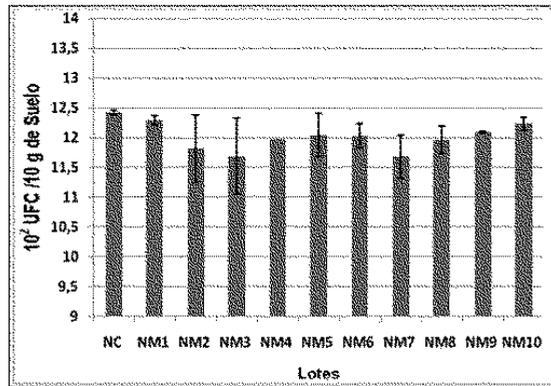
ANOVA

lotes					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	50,000	4	12,500		
Intra-grupos	,000	0			
Total	50,000	4			

Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Nobsa. En la figura 56, se observa que en el municipio de Nobsa la presencia de microorganismos nitrificantes fue menor en todos los lotes con un valor promedio de $11.96 \pm 0.22, 09$ UFC/10 gramos de suelo, al compararla con el control, 12.42 ± 0.03 UFC/10 gramos de suelo (suelo no intervenido), esto debido a las razones antes expuestas para los demás municipios. Al realizar la prueba de ANOVA se evidencia que hay diferencia significativa entre los lotes ($p > 0.05$), (ver cuadro 14).

Figura 56. Recuento de microorganismos nitrificantes en el municipio de Nobsa



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Cuadro 14. ANOVA Nobsa según lotes: Nitrificantes

ANOVA					
lotes					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	82,500	9	9,167		
Intra-grupos	,000	0	.		
Total	82,500	9			

Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Igualmente se realizó un análisis de varianza entre los municipios y los valores encontrados para los microorganismos nitrificantes encontrando que no hay diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$).

Cuadro 15. ANOVA municipios según microorganismos nitrificantes

ANOVA

municipios

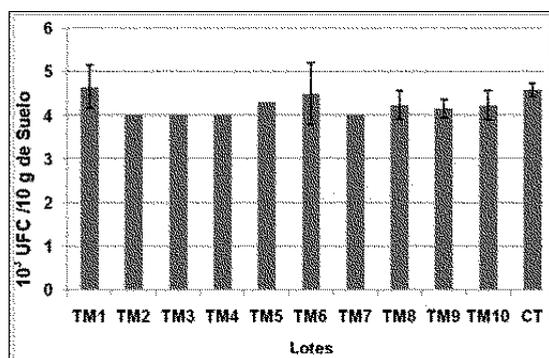
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	68,976	38	1,815	1,361	,462
Intra-grupos	4,000	3	1,333		
Total	72,976	41			

Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

CUANTIFICACIÓN SEGÚN MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO (BACTERIAS), POR MUNICIPIO

Municipio de Tibasosa. El recuento de bacterias solubilizadoras de Fosfato en el lote TM1 fue mayor con un promedio de 4.65 ± 0.49 UFC/10g⁻¹ de suelo al compararlo con el suelo control 4.58 ± 0.15 UFC/10g⁻¹ de suelo. Los demás lotes presentaron recuentos similares, por lo cual no hay diferencia significativa ($p > 0.05$), ver figura 57 y cuadro 16.

Figura 57. Recuento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato de Tibasosa



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Cuadro 16. ANOVA Tibasosa según lotes para solubilizadoras de fosfato

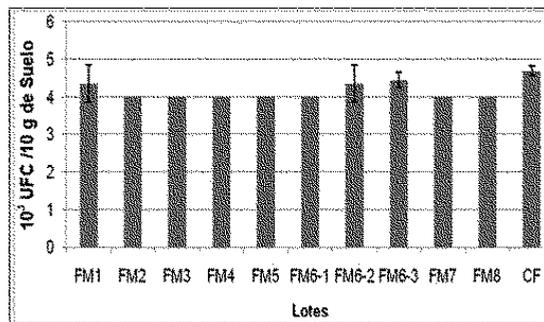
ANOVA

lotes					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	71,833	6	11,972	3,367	,173
Intra-grupos	10,667	3	3,556		
Total	82,500	9			

Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Firavitoba. El recuento de bacterias solubilizadoras de Fosfato en todos los lotes fue menor con un promedio 4.11 ± 0.20 UFC/10g⁻¹ de suelo al compararlo con el recuento del suelo control 4.69 ± 0.12 UFC/10g⁻¹ de suelo, tal como se precia en la siguiente figura.

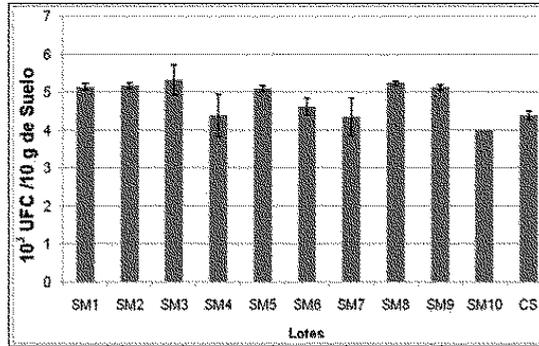
Figura 58. Recuento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato de Firavitoba



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Sogamoso. El recuento de bacterias solubilizadoras de Fosfato en los lotes SM1, SM2, SM3, SM5, SM6, SM8, SM9 fue mayor con un promedio de 5.10 ± 0.12 UFC/10g⁻¹ de suelo al compararlo con el recuento del suelo control 4.38 ± 0.12 UFC/10g⁻¹ de suelo. Este municipio fue el que presentó mayor recuento al compararlos con los demás. La siguiente figura presenta los resultados de los recuentos hechos.

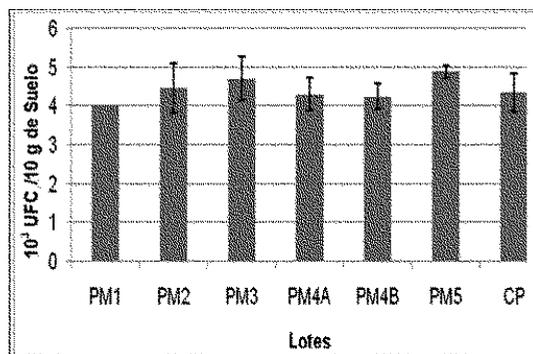
Figura 59. Recuento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato de Sogamoso



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Paipa. El recuento de bacterias solubilizadoras de Fosfato en los lotes PM2, PM3, PM5 fue mayor con un promedio de 4.68 ± 0.26 UFC/10g⁻¹ de suelo al compararlo con el recuento del suelo control 4.34 ± 0.49 UFC/10g⁻¹ de suelo. La siguiente figura presenta los resultados del recuento efectuado,

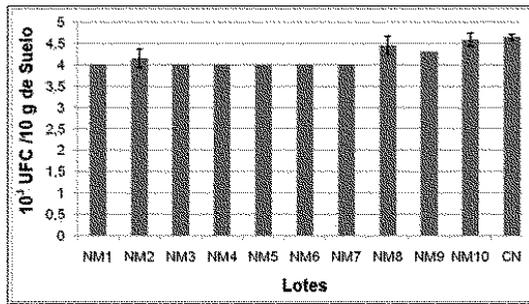
Figura 60. Recuento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato de Paipa



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Nobsa. El recuento de bacterias solubilizadoras de Fosfato en todos los lotes presentaron un recuento menor con un promedio 4.14 ± 0.22 UFC/10g⁻¹ de suelo al compararlo con el recuento del suelo control 4.65 ± 0.06 UFC/10g⁻¹ de suelo. Al realizar el análisis de varianza se observa que no hay diferencia significativa para un $p > 0.05$, tal como se presenta en el cuadro 17.

Figura 61. Recuento de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato de Nobsa



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Cuadro 17. ANOVA Nobsa según lotes para solubilizadoras de fosfato

ANOVA					
municipios					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	38,226	21	1,820	1,048	,460
Intra-grupos	34,750	20	1,738		
Total	72,976	41			

Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Se realizó una prueba de análisis de varianza para la interacción entre los municipios y los microorganismos solubilizadores de fosfato, encontrándose que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$), para los solubilizadores de fosfato y los municipios en conjunto, ver cuadro 18.

Cuadro 18. ANOVA municipios según lotes para solubilizadoras de fosfato

ANOVA

lotes					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	73,750	6	12,292	4,214	,133
Intra-grupos	8,750	3	2,917		
Total	82,500	9			

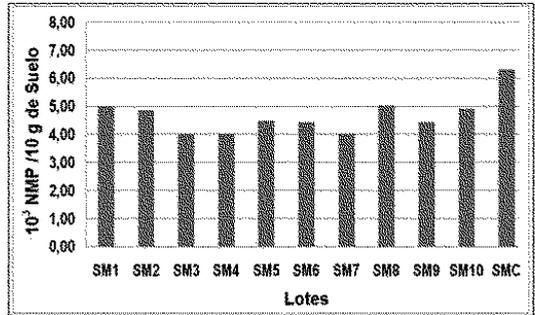
Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (Allium cepa L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

El recuento de hongos solubilizadores de Fosfato en los diferentes municipios con sus respectivos lotes fue similar, lo que evidencia que no hay diferencia significativa para este grupo funcional.

CUANTIFICACIÓN SEGÚN EL RECUENTO DE MICROORGANISMOS PROTEOLÍTICOS POR MUNICIPIOS

Municipio de Sogamoso. El recuento de microorganismo proteolíticos en todos los lotes fue menor con un promedio 4.51 ± 0.29 NMP/g⁻¹ de suelo al compararlo con el recuento del suelo control con un promedio 6.30 ± 1.04 NMP/g⁻¹ de suelo. La siguiente figura presenta los resultados del recuento.

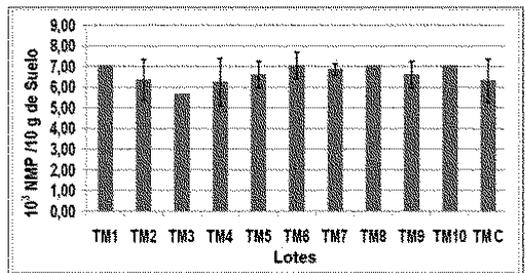
Figura 62. Recuento de Microorganismos Proteolíticos de Sogamoso



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Tibasosa. El recuento de microorganismos proteolíticos en los lotes TM1, TM5, TM6, TM7, TM8, TM9, TM10 presentó mayor recuento con un promedio 6.74 ± 0.46 NMP/g⁻¹ de suelo al compararlo con el recuento de suelo control con un promedio 6.30 ± 1.04 NMP/g⁻¹ de suelo. En este municipio se presentó el mayor recuento entre los otros municipios. Los resultados se presentan en la siguiente figura.

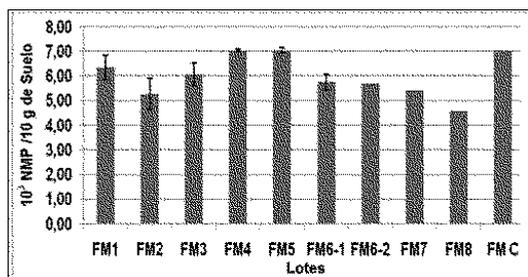
Figura 63. Recuento de Microorganismos Proteolíticos de Tibasosa



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Firavitoba. El recuento de microorganismos proteolíticos en los lotes presentaron menor recuento con un promedio 5.91 ± 0.36 NMP/ g^{-1} de suelo al compararlo con el recuento de suelo control con un promedio 7.04 ± 0.00 NMP/ g^{-1} de suelo. La siguiente figura presenta los resultados respectivos.

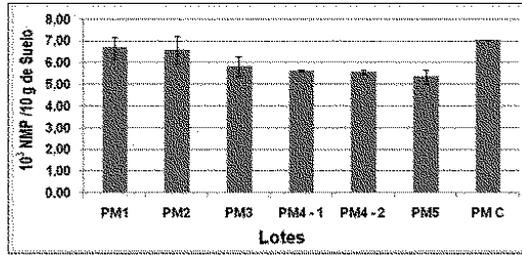
Figura 64. Recuento de Microorganismos Proteolíticos de Firavitoba



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Paipa. El recuento de microorganismos proteolíticos en todos los lotes presentaron menor recuento con un promedio 5.94 ± 0.23 NMP/ g^{-1} de suelo al compararlo con el recuento de suelo control, con un promedio 7.04 ± 0.00 NMP/ g^{-1} de suelo.

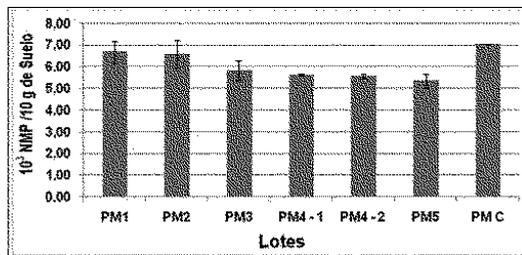
Figura 65. Recuento de Microorganismos Proteolíticos de Paipa



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Municipio de Nobsa. El recuento de microorganismos proteolíticos en los lotes presentaron menor recuento con un promedio 6.19 ± 0.21 NMP/ g⁻¹ de suelo al compararlo con el recuento de suelo control con un promedio 7.04 ± 0.00 NMP/ g⁻¹ de suelo. La siguiente figura presenta los resultados de los recuentos.

Figura 66. Recuento de Microorganismos Proteolíticos de Nobsa

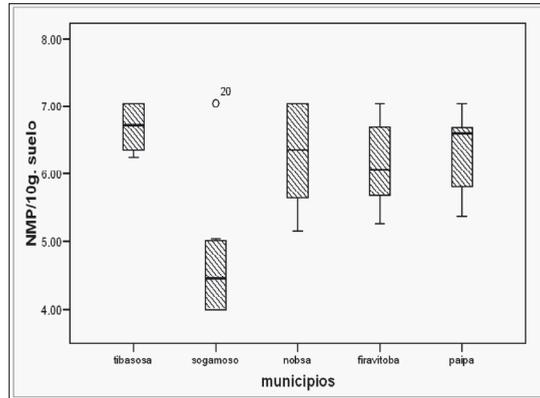


Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

En la figura 67, se evidencia que al realizar el ANOVA no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los datos encontrados para proteolítico en los diferentes municipios, debido a la independencia de los datos y a la distribución de la flora edáfica, la cual está en relación a la dinámica

de los cultivos y el tipo de suelo. Los resultados se pueden ver en el cuadro 19.

Figura 67. Recuento de microorganismos proteolíticos según municipios



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Cuadro 19. ANOVA Municipios según microorganismos proteolíticos

ANOVA					
municipios					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	38,226	21	1,820	1,048	,460
Intra-grupos	34,750	20	1,738		
Total	72,976	41			

Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

CUANTIFICACIÓN SEGÚN LA CORRELACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE MICROORGANISMOS NITRIFICANTES Y PROTEOLÍTICOS

Al realizar la contrastación entre los dos grupos de microorganismos según los diferentes municipios, se observa que hay una correlación entre los grupos de 0.89, $p > 0.05$ (coeficiente de Pearson), lo cual permite afirmar que se presenta una sinergia entre los dos grupos, aspecto importante para la biota del suelo. La correlación se presenta en la siguiente figura.

Figura 68. Distribución de los microorganismos proteolíticos y nitrificantes según municipios.

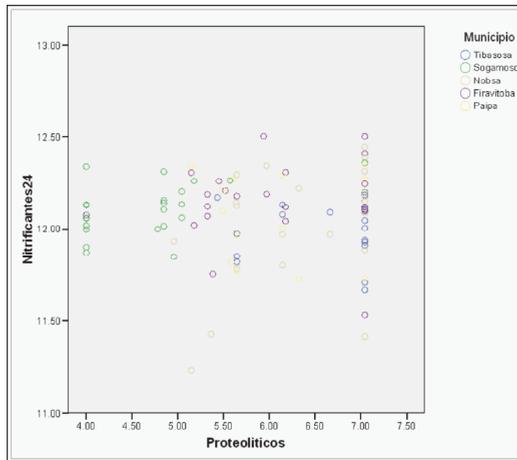
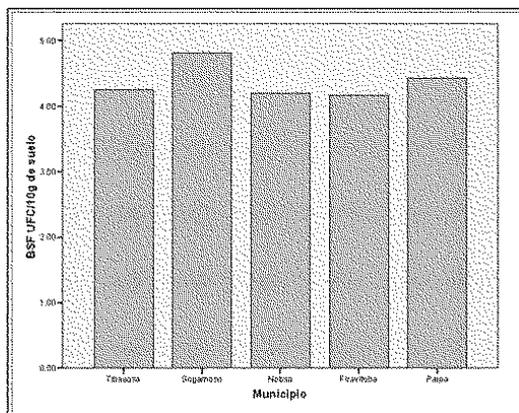


Figura 69. Recuento de los microorganismos solubilizadores de fosfato BSF según municipios



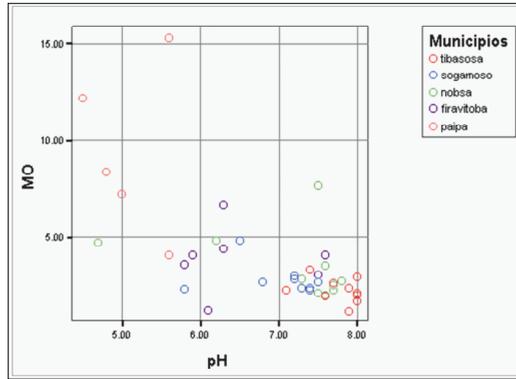
Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Cuantificación según la correlación entre los grupos de microorganismos con algunos parámetros fisicoquímicos de los suelos.

Se midieron algunos parámetros fisicoquímicos como pH y materia orgánica, con el fin de establecer correlaciones entre estas propiedades y la presencia de los grupos de microorganismos evaluados, encontrándose que para la materia orgánica, los restos vegetales son el mayor sustrato para su incorporación en el suelo. Cuando los microorganismos del suelo descomponen el material orgánico, la mayoría del carbono es liberado a la atmósfera o es incorporado como parte de la biomasa. No obstante, una pequeña porción del carbono es alterada bioquímicamente y permanece en el suelo como materia orgánica. La materia orgánica del suelo (MOS) favorece propiedades deseables en cuanto a características físicas, químicas y biológicas.

En la figura 70, se puede observar como la MO, se relaciona con respecto al pH del suelo en los distintos municipios, presentándose que hay menor presencia de MO en los suelos con pH relativamente alcalinos, estos valores contrastan con los valores de referencia para el suelo según el contenido de materia orgánica.

Figura 70. Relación entre el pH vs Materia Orgánica, según el municipio



Fuente: Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS SUELOS

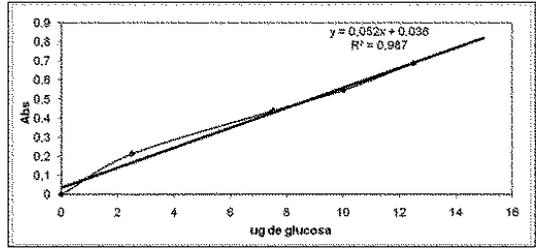
Actividad de la celulasa por municipios. La actividad de CM-Celulasa es expresada como μg equivalentes de glucosa (EG) por gramo (peso seco) y tiempo de incubación. Los equivalentes de glucosa fueron calculados empleando una curva de calibración, presentada en la figura 71 y construida con los datos presentados en el siguiente cuadro.

Cuadro 20. Curva de calibración actividad celulasa

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA	ABSORBANCIA
0	0
2,5	0,212
7,5	0,438
10	0,546
12,5	0,688

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 71. Curva de Calibración actividad Celulasa



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Actividad Celulasa en el Municipio de Tibasosa. En el cuadro 21 se observan los resultados de la actividad celulasa para el municipio de Tibasosa. Donde se evidencia variedad de la actividad celulasa en las muestras TM2, TM3 y TM9. Los valores son inferiores a los $200000 \mu\text{gGE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$ en comparación al control y para las muestras TM4, TM5, TM6, TM7 y TM10 los valores, pese a que la mayoría no alcanzan los del control, no son tan bajos, yendo desde los 400000 a los $600000 \mu\text{gGE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$, demostrando que la actividad no es imperceptible. Las muestras TM8 1, 2 y 3 pese a ser réplicas de una misma finca presentan actividad enzimática diferente siendo superior la réplica TM8-3. La muestra TM1 es la única que alcanza valores alrededor del $1000000 \mu\text{g GE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$ que son similares a los del control.

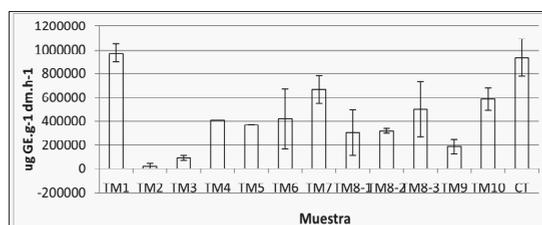
Cuadro 21. Datos de la actividad celulasa municipio de Tibasosa.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
TM1	976112,977	73297,2855
TM2	21490,0763	25028,3414
TM3	90147,7099	19796,291
TM4	407890,076	1191,82578
TM5	368550	3978,69014
TM6	422288,931	250871,23
TM7	667703,817	116708,244

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
TM8-1	306671,565	195589,784
TM8-2	317391,985	18115,428
TM8-3	503754,389	231559,928
TM9	190313,931	61611,4014
TM10	587815,649	90943,1083
CT	933674,427	156461,14

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 72. Actividad Celulasa Municipio de Tibasosa



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

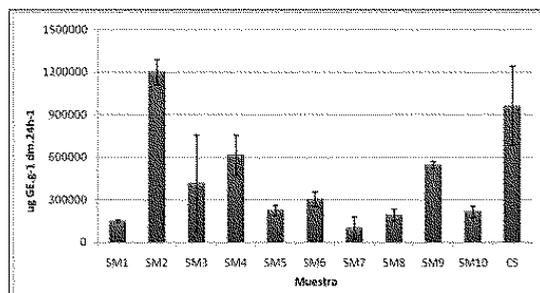
Actividad Celulasa Municipio de Sogamoso. En el cuadro 22 y la figura 73 se observan los resultados de la actividad celulasa para el municipio de Sogamoso. Se encuentra una actividad enzimática baja en las muestras SM1, SM5, SM7 y SM8 con valores inferiores a los 300000 $\mu\text{gGE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$; la muestra SM2 alcanza valores alrededor de los 1200000 $\mu\text{gGE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$; dichos valores son relativamente altos ya que superan a los del control.

Cuadro 22. Datos actividad celulasa municipio de Sogamoso.

MUESTRA	PROMEDIO	DEVIACIÓN ESTÁNDAR
SM1	146833,969	87565,189
SM2	1198282,44	338925,456
SM3	415190,84	142824,774
SM4	613208,015	36213,0434
SM5	225089,313	52728,5748
SM6	302608,969	78313,1556
SM7	101573,473	42989,1235
SM8	189269,656	23408,2032
SM9	544852,672	40726,1119
SM10	214961,679	277505,622
CS	960512,977	7928,23237

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 73. Actividad Celulasa Municipio de Sogamoso.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Actividad Celulasa Municipio de Nobsa. Los resultados de la actividad celulasa para el municipio de Nobsa se presentan en el cuadro 23 y la figura 74. Los valores de las muestras se encuentran muy por debajo

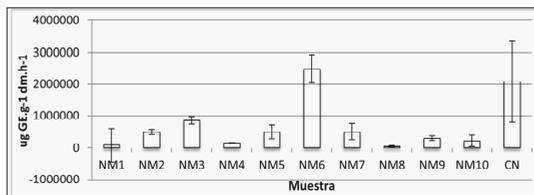
de los del control, no alcanzan $1000000 \mu\text{gGE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$. Las muestras NM1, NM4, NM8 y NM10 tienen valores inferiores a los $500000 \mu\text{gGE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$, es decir, que la actividad enzimática en dicho suelo es mínima.

Cuadro 23. Datos actividad celulasa municipio de Nobsa.

MUESTRA	PROMEDIO	DEVIACIÓN ESTÁNDAR
NM1	86400	522693,333
NM2	503829,389	82668,3396
NM3	854473,282	114000,727
NM4	150018,321	9340,28683
NM5	499698,092	212522,293
NM6	2484975,57	446954,1
NM7	508320,916	252518,735
NM8	41734,9237	26371,5744
NM9	305718,321	73642,2025
NM10	224400	179266,143
CN	2078780,38	1282404,86

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 74. Actividad Celulasa Municipio de Nobsa.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

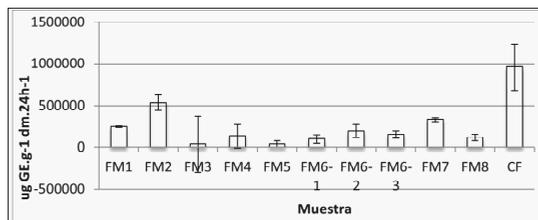
Actividad Celulasa Municipio de Firavitoba. La actividad celulasa para el municipio de Firavitoba, cuyos resultados se presentan en el cuadro 24 y la figura 75, no supera $600000 \mu\text{g GE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$; lo anterior revela una actividad inferior al resto de las muestras de los municipios, el valor del control es cercano al $1000000 \mu\text{gGE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24 \text{ h}^{-1}$, valor esperado para el control. Pese a la baja actividad, se observa cierta uniformidad en las muestras. En las muestras FM6 -1, 2 y 3 los valores son bajos pero similares y en estos no se observan diferencias significativas.

Cuadro 24. Datos actividad celulasa municipio de Firavitoba.

MUESTRA	PROMEDIO	DEVIACIÓN ESTÁNDAR
FM1	246727,099	6193,93154
FM2	536564,885	432846,51
FM3	34368,3206	7262,68835
FM4	130790,84	29044,2761
FM5	37023,6641	30799,6282
FM6-1	95080,5344	1510,8335
FM6-2	191248,855	44460,2835
FM6-3	149015,267	88978,8628
FM7	334267,557	7329,08082
FM8	113580,344	7974,38323
CF	960512,977	7928,23237

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 75. Actividad Celulasa Municipio de Firavitoba



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

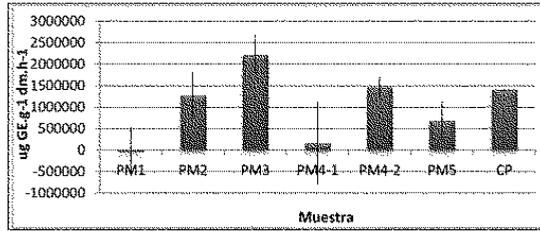
Actividad Celulasa Municipio de Paipa. El cuadro 25 y la figura 76 muestran la actividad celulasa para el municipio de Paipa, allí los valores no superan los 2500000 $\mu\text{gGE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$; en las muestras PM1 y PM4 no se alcanzaron valores significativos ya que dicha actividad es casi nula. El control tiene un valor cercano a 1500000 $\mu\text{gGE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$, valor relativamente esperado. No existe una uniformidad entre los datos de actividad obtenidos.

Cuadro 25. Datos actividad celulasa municipio de Paipa.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
PM1	135578,626	572341,945
PM2	1272936,64	546304,762
PM3	2218283,59	467103,404
PM4-1	160186,26	971247,329
PM4-2	1463939,89	229007,866
PM5	688815,458	448135,4
CP	1408679,77	33147,6545

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 76. Actividad Celulasa Municipio de Paipa.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Para la actividad de la celulasa se encontró que el valor promedio para la zona de estudio fue de $536810,982 \pm 179401,507 \mu\text{g GE}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot 24\text{h}^{-1}$, siendo mayor en los lotes evaluados en el municipio de Paipa ($961430,534 \pm 539023,451$) y el menor en la zona de Firavitoba ($186866,737 \pm 65640,047$). Al contrastar estos valores con los contenidos de MO, se evidencia diferencia significativa (0.012 ; $p < 0.05$).

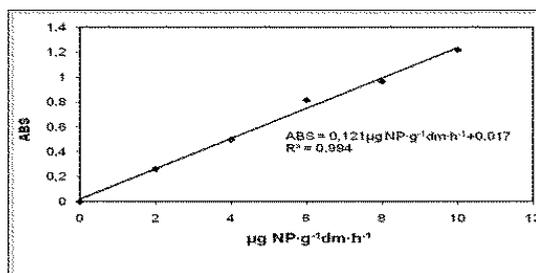
Actividad fosfatasa ácida. La actividad enzimática de fosfatasa ácida es expresada en microgramos de p-nitrofenol por gramo de peso seco y tiempo de incubación ($\mu\text{gNP}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{h}^{-1}$). Los equivalentes de fosfatasa ácida fueron calculados utilizando la curva de calibración elaborada con los datos del cuadro 26 y presentada en la figura 77.

Cuadro 26. Curva de calibración actividad fosfatasa ácida.

CONCENTRACIÓN DE P-NITROFENOL	ABSORBANCIA
0	0
2	0,261
4	0,497
6	0,815
8	0,966
10	1,22

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 77. Curva de calibración actividad fosfatasa ácida



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Actividad fosfatasa ácida en el Municipio de Firavitoba. Se observa en el cuadro 27 y la figura 78, la actividad de la fosfatasa ácida en el municipio de Firavitoba. Allí se presenta mayor actividad de la enzima en la muestra tres (FM-3), con $902.08 \mu\text{gpNP}\cdot 0.25\text{g suelo}\cdot\text{hora}$, seguida por la muestra cinco (FM-5), con $614.89 \mu\text{gpNP}\cdot 0.25\text{g suelo}\cdot\text{hora}$, estando el valor más bajo en la muestra siete (FM-7) con $32,81 \mu\text{gpNP}\cdot 0.25\text{g suelo}\cdot\text{hora}$. El control del municipio (CF) no presenta alta actividad de la enzima con $217.28 \mu\text{gpNP}\cdot 0.25\text{g suelo}\cdot\text{hora}^{-1}$

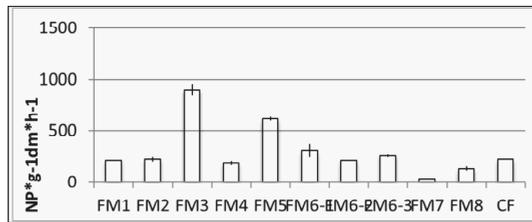
Cuadro 27. Datos actividad fosfatasa ácida municipio de Firavitoba.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
FM1	208,624877	0,1516526
FM2	222,860268	26,2496862
FM3	902,081773	58,7076881
FM4	185,135137	18,5880863
FM5	614,898987	17,2821771
FM6-1	308,874815	60,1520768
FM6-2	209,806942	0,59156444
FM6-3	263,094594	12,034672

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
FM7	32,8065317	1,62341326
FM8	132,302665	20,2701968
CF	217,275692	0,88858945

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 78. Actividad Fosfatasa ácida en Firavitoba.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

5.11.2.2 Actividad Fosfatasa ácida en el Municipio de Nobsa. Se observa en los datos del cuadro 28 y la figura 79 que se presenta mayor actividad de la enzima fosfatasa ácida en las muestras cinco, seis y siete de Nobsa (NM-5, NM-6, NM-7), con valores de 195.31 $\mu\text{gpNP}\cdot 0.25\text{g suelo}\cdot\text{hora}$, 242.90 $\mu\text{gpNP}\cdot 0.25\text{g suelo}\cdot\text{hora}$ y 272.12 $\mu\text{gpNP}\cdot 0.25\text{g suelo}\cdot\text{hora}$ respectivamente. La actividad en las demás muestras del municipio presenta uniformidad relativamente baja. El control del municipio (CN), presenta 283.06 $\mu\text{gpNP}\cdot 0.25\text{g suelo}\cdot\text{hora}^{-1}$

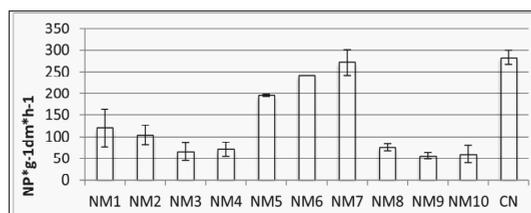
Cuadro 28. Datos actividad fosfatasa ácida municipio de Nobsa.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
NM1	119,715118	42,458296
NM2	103,541362	22,4297375

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
NM3	66,1092053	20,8737739
NM4	71,5561458	15,8979867
NM5	195,315553	2,67293035
NM6	242,90505	0,32154722
NM7	272,123731	28,3840101
NM8	76,1635167	8,10329409
NM9	56,2460728	7,57875334
NM10	60,3194518	20,033653
CN	283,063318	16,7632594

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 79. Actividad Fosfatasa ácida en Nobsa.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

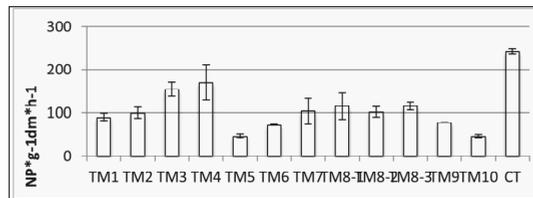
Actividad Fosfatasa ácida en el Municipio de Tibasosa. En el municipio de Tibasosa se presenta mayor actividad de la enzima fosfatasa ácida en la muestra cuatro (TM-4), con $171,22\mu\text{gNP}\cdot 0.25\text{g suelo}\cdot \text{hora}$ y en la muestra tres (TM-3) con $155,74\mu\text{gNP}\cdot 0.25\text{g suelo}\cdot \text{hora}$. El control del municipio (CT), presenta $243.66\mu\text{gNP}\cdot 0.25\text{g suelo}\cdot \text{hora}$, siendo en ésta muestra en donde se presenta la mayor actividad enzimática del municipio, de acuerdo con los resultados incluidos en el cuadro 29 y lo presentado en la figura 80.

Cuadro 29. Datos actividad fosfatasa ácida municipio de Tibasosa.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
TM1	90,6902638	8,09926194
TM2	100,437715	12,6102433
TM3	155,736848	16,0142353
TM4	171,220916	40,3790498
TM5	46,7015438	4,66276191
TM6	72,7001183	1,41033598
TM7	104,624605	29,9021741
TM8-1	116,338494	30,3207735
TM8-2	102,680562	12,0556496
TM8-3	116,108749	9,61224514
TM9	78,8083804	0,65176538
TM10	46,7990488	3,60558367
CT	243,658077	6,04909972

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 80. Actividad Fosfatasa ácida en Tibasosa.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

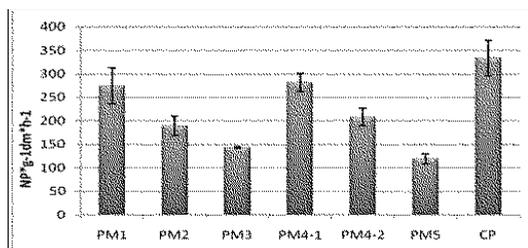
Actividad Fosfatasa ácida en el Municipio de Paipa. En el municipio de Paipa se presenta mayor actividad de la enzima fosfatasa ácida en la muestra uno (PM-1), con 274,29 μ gpNP-0.25g suelo·hora y en la muestra cuatro-uno (PM-4-1), con 281,41 μ gpNP-0.25g suelo·hora. El control (CP), presenta la mayor actividad enzimática con 333,56 μ gpNP-0.25g suelo·hora, de acuerdo con lo presentado en el siguiente cuadro y figura.

Cuadro 30. Datos actividad fosfatasa ácida municipio de Paipa.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
PM1	274,293027	38,4822374
PM2	189,213716	21,3938488
PM3	142,748473	1,81824213
PM4-1	281,406748	19,2635582
PM4-2	207,837846	18,6115479
PM5	118,585916	10,6314717
CP	333,561363	37,5945829

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 81. Actividad Fosfatasa ácida en Paipa.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

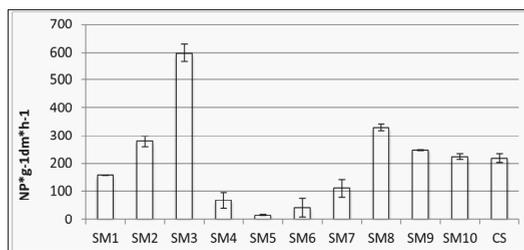
Actividad fosfatasa ácida en el Municipio de Sogamoso. El cuadro 31 y la figura 82, muestran los resultados de la actividad fosfatasa ácida determinados en las muestras tomadas en el municipio de Sogamoso.

Cuadro 31. Datos actividad fosfatasa ácida municipio de Sogamoso.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
SM1	157,520312	19,8988823
SM2	280,569854	31,2346026
SM3	597,819111	27,4251345
SM4	67,2875358	3,40880125
SM5	16,0701823	34,7513628
SM6	41,1431757	30,8737993
SM7	111,226895	11,2729408
SM8	329,519199	1,92280294
SM9	248,169175	9,12968242
CS	217,275692	0,88858945

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 82. Actividad Fosfatasa ácida en Sogamoso.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

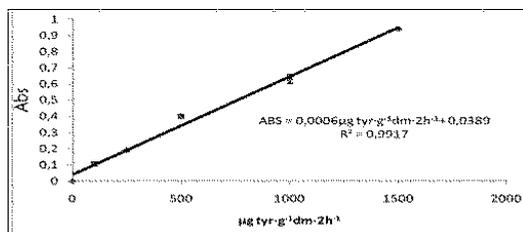
Actividad proteasa. La actividad enzimática de proteasa es expresada en microgramos de tirosina por gramo de peso seco y tiempo de incubación ($\mu\text{gTyr}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{h}^{-1}$). Los equivalentes de proteasa fueron calculados gracias al uso de la curva de calibración respectiva (figura 83), calculada a partir de los datos presentados en el siguiente cuadro.

Cuadro 32. Curva de calibración actividad Proteasa.

CONCENTRACIÓN DE TIROSINA	ABSORBANCIA
0	0
100	0,1045
250	0,191
500	0,4
1000	0,6305
1500	0,9385

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 83. Curva de Calibración actividad Proteasa.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Actividad Proteasa en el Municipio de Firavitoba. En la actividad de la Proteasa del municipio de Firavitoba, se presenta mayor prevalencia de la enzima en la muestra control (FMC), con $8803.10 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{h}^{-1}$.

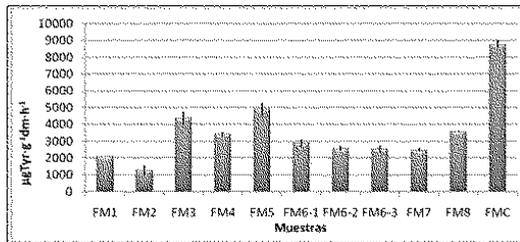
Las demás muestras presentan homogeneidad, siendo mayor la muestra cinco (FM-5) con 4902.73 $\mu\text{gTyr}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{h}^{-1}$. Los resultados se presentan en el cuadro 33 y la figura 84.

Cuadro 33. Datos actividad proteasa municipio de Firavitoba.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
FM1	2075,1634	18,4864518
FM2	1251,26263	301,770318
FM3	4384,05797	375,757227
FM4	3422,93432	134,205471
FM5	4902,73396	402,750971
FM6-1	2916,22008	227,365524
FM6-2	2565,92366	126,195485
FM6-3	2513,39903	229,222893
FM7	2461,70275	80,7199522
FM8	3565,5058	16,7521152
FMC	8803,10458	231,080647

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 84. Actividad Proteasa en Firavitoba.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

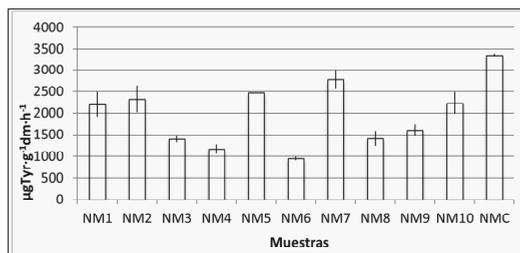
Actividad Proteasa en el Municipio de Nobsa. A partir de los datos consignados en el cuadro 34 y la figura 85 es posible notar heterogeneidad en los valores; se presenta mayor actividad de la enzima fosfatasa ácida en la muestra siete de Nobsa (NM-7), con $2775.71 \mu\text{g-Tyr}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{h}^{-1}$. El control del municipio (NMC) tiene la mayor actividad con $3357.74 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{h}^{-1}$.

Cuadro 34. Datos actividad proteasa municipio de Nobsa.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
NM1	2199,62627	282,539088
NM2	2327,57439	305,414282
NM3	1401,51515	73,6569564
NM4	1170,61084	103,691832
NM5	2471,88379	5,52254593
NM6	957,363267	40,8297984
NM7	2775,7079	219,543834
NM8	1415,75328	170,963922
NM9	1604,74892	132,552396
NM10	2236,51961	256,026854
NMC	3357,73576	42,1188037

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 85. Actividad Proteasa en Nobsa.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

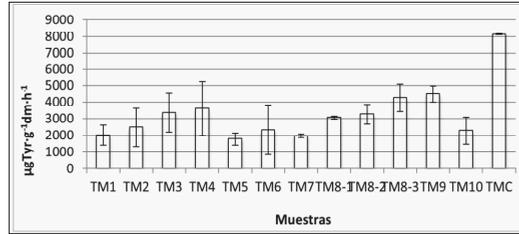
Actividad Proteasa en el Municipio de Tibasosa. En el municipio de Tibasosa se presenta mayor actividad de la enzima proteasa en la muestra ocho, tres y nueve (TM-8-3, TM-9), con $4262.53 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{h}^{-1}$ y $4485.02 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{h}^{-1}$ respectivamente. El control del municipio (TMC), presenta $8144.15 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{h}^{-1}$ siendo en ésta muestra en donde se presenta la mayor actividad enzimática. En el siguiente cuadro y figura se presentan los resultados de la actividad medida.

Cuadro 35. Datos actividad proteasa municipio de Tibasosa.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
TM1	2017,0555	609,251601
TM2	2483,39372	1142,21657
TM3	3365,71234	1168,87113
TM4	3611,86594	1601,23818
TM5	1785,71429	359,740935
TM6	2331,02358	1482,80963
TM7	1972,04416	107,022928
TM8-1	3074,12168	85,838441
TM8-2	3268,30249	583,092881
TM8-3	4262,53081	827,959871
TM9	4485,01873	498,770701
TM10	2288,76949	808,271026
TMC	8144,14913	32,6276662

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 86. Actividad Proteasa en Tibasosa.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

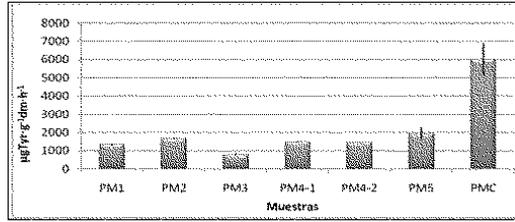
Actividad Proteasa en el Municipio de Paipa. En el municipio de Paipa se presenta mayor actividad de la enzima fosfatasa ácida en el control (PMC), con $6002.69 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{h}^{-1}$. Las demás muestras del municipio evaluadas presentan valores bajos con respecto al control, siendo mayor la muestra cinco (PM-5), con $1937.73 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}^{-1}\text{dm}\cdot\text{h}^{-1}$.

Cuadro 36. Datos actividad proteasa municipio de Paipa.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
PM1	1347,40817	51,5826265
PM2	1669,00093	27,5096009
PM3	802,65986	39,579235
PM4-1	1498,75622	8,79486046
PM4-2	1446,739	12,3749874
PM5	1937,73327	331,371124
PMC	6002,68686	895,254067

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 87. Actividad Proteasa en Paipa.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

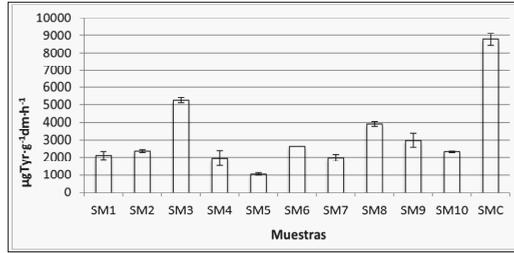
Actividad Proteasa en el Municipio de Sogamoso. El cuadro 37 y la figura 88, muestran los resultados de la actividad fosfatasa ácida determinados en las muestras tomadas en el municipio de Sogamoso.

Cuadro 37. Datos actividad proteasa municipio de Sogamoso.

MUESTRA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
SM1	2098,16613	76,2790487
SM2	2335,16484	152,817949
SM3	5255,10204	420,896894
SM4	1959,43076	57,5738317
SM5	1074,48867	0
SM6	2610,03071	180,938276
SM7	1988,41699	127,406627
SM8	3911,42933	403,150246
SM9	2957,25646	41,0018843
SM10	2307,78085	341,833389
SMC	8803,10458	231,080647

Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 88. Actividad Proteasa en Sogamoso.



Fuente: Ducón, J., & Urbano, E. (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

CUANTIFICACIÓN DE LA EVALUACIÓN DE
LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA
DE EXTRACTOS VEGETALES, SOBRE
Sclerotium cepivorum IN VITRO.

El cuadro 38, presenta los resultados arrojados en la prueba de inhibición realizada con los cuatro extractos obtenidos mediante el método Soxhlet modificado, así como la comparación entre las diferentes técnicas utilizadas para depositar el extracto vegetal en el medio PDA.

Cuadro 38. Prueba de inhibición por el método de extracción Soxhlet modificado.

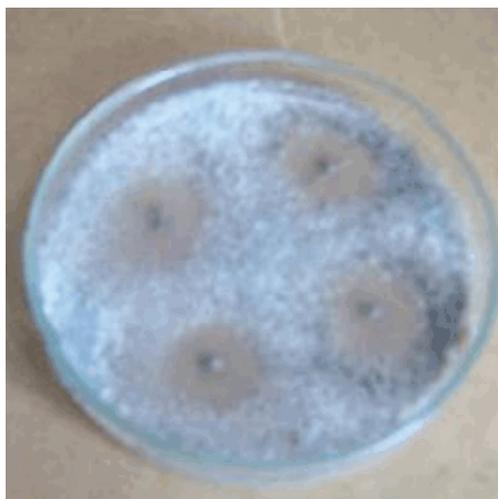
EXTRACTO EN N-HEXANO	CONCENTRACIÓN EXTRACTO (μ l)	PROMEDIO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)	
		DIFUSIÓN	POZO
Control negativo	400	0	0
(N- Hexano)	500	0	0
	800	0	0
	400	0	0
Ruda - hoja	500	0	0
	800	16	9
	400	0	0
Ruda - flor	500	0	0
	800	0	0
	400	0	0
Sauco - hoja	500	0	0
	800	0	0
	400	0	0

EXTRACTO EN N-HEXANO	CONCENTRACIÓN EXTRACTO (μ l)	PROMEDIO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)	
		DIFUSIÓN	POZO
Sauco - flor	500	0	0
	800	0	0

Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

De los datos anteriores se infiere que el extracto obtenido a partir de la hoja de ruda fue el único que presentó inhibición sobre el crecimiento de *Sclerotium cepivorum*. El resultado presentado en los halos de inhibición, corresponde al promedio obtenido de los datos arrojados en las tres siembras.

Figura 89. Prueba de inhibición por difusión, con el extracto obtenido a partir de hoja de ruda mediante el método Soxhlet modificado. (Día 12).



Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 90. Prueba de inhibición por pozo, con el extracto obtenido a partir de hoja de ruda mediante el método Soxhlet modificado. (Día 11).



Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

La concentración que presentó acción fungicida contra el hongo fue la de 800 μ l de extracto llevado a 1ml de volumen final, lo que quiere decir que a una mayor concentración de extracto de hoja de ruda, menor es el crecimiento de *Sclerotium cepivorum* *In Vitro*.

En su trabajo, Gamba et al (2007) concluyen que la hoja de la ruda y la flor del saúco muestran una mayor eficacia al permitir la inhibición del patógeno *Sclerotium cepivorum*, pero en este estudio la flor de saúco no presentó un efecto inhibitorio, para ninguna de las concentraciones evaluadas. Por otro lado, las concentraciones en las cuales se observó halo de inhibición fueron la de 100 y 150 μ l, pero es de resaltar que en esta investigación se utilizaron concentraciones más elevadas del extracto, puesto que ensayos previos con 100 y 150 μ l no arrojaron ningún resultado positivo.

En cuanto a las técnicas utilizadas en la adición del extracto, la perforación del agar para formar pozos facilita la contaminación del ensayo, además de permitir la evaporación del extracto. Debido a lo anterior, se deduce que la técnica de difusión en agar es la más apropiada para

estos fines, puesto que los halos son más evidentes y no se presentaron signos de contaminación en ninguna de las pruebas.

El cuadro 37, muestra la actividad antifúngica obtenida siguiendo el método de extracción vegetal por infusión, en las proporciones 1:6 y 1: 12 p/v.

Cuadro 39. Prueba de inhibición por el método de extracción de infusión

EXTRACTO EN AGUA	PROPORCIÓN EXTRACTO (p/v)	HALO DE INHIBICIÓN (mm)	
		DIFUSIÓN	POZO
Control negativo	01:06	0	0
Agua destilada estéril	01:12	0	0
Ruda - hoja	01:06	12	9
	01:12	5	7
Ruda - flor	01:06	0	0
	01:12	0	0
Sauco - hoja	01:06	0	0
	01:12	0	0
Sauco - flor	01:06	0	0
	01:12	0	0

Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Al utilizar extractos vegetales con fines biocontroladores en proporciones 1:6 y 1:12, se logra un efecto bactericida. En este caso, la concentración óptima de inhibición de la infusión obtenida en agua fue de 1:6 p/v (hoja fresca: agua). La proporción 1:6 logró mayor inhibición del hongo que la proporción 1:12. El resultado fue similar al de la inhibición obtenida por el extracto elaborado con N-hexano, lo que sugiere que el método de infusión en agua pudiera ser una alternativa para el manejo de la pudrición blanca en el cultivo involucrado, sin llegar a presentar las consecuencias de deterioro ambiental ocasionado por agroquímicos o por solventes orgánicos, que también

requieren de un manejo muy cuidadoso para no ser nocivo a la salud.

Figura 91. Prueba de inhibición por el método de difusión, con extracto de hoja de ruda en proporción 1:6. (Día 15).



Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 92. Prueba de inhibición por el método de pozo, con extracto de hoja de ruda en proporción 1:6. (Día 13).



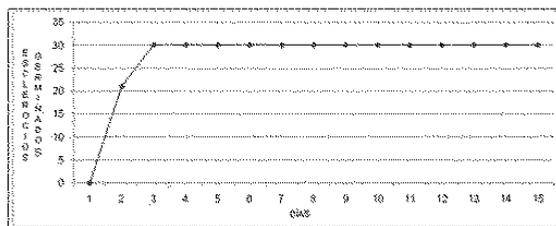
Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Evaluación del porcentaje de germinación de *Sclerotium cepivorum* *In vitro*, impregnados con extractos vegetales. Después de analizar los resultados de las prueba de inhibición se determinó que los extractos de hoja de ruda, obtenidos tanto con N-hexano como con agua, fueron los que lograron controlar el fitopatógeno *in Vitro*. Por tal razón, a las soluciones obtenidas a partir de esta planta se les evaluó su capacidad de inhibir la germinación de *Sclerotium cepivorum*, después de haber inmerso los esclerocios en cada uno de los extractos.

Para cada tratamiento se utilizaron 6 cajas de Petri que contenían cada una 5 esclerocios previamente sumergidos en el extracto correspondiente. Se realizó seguimiento periódico de las cajas de Petri durante 15 días, tomando las medidas en milímetros de la germinación del hongo.

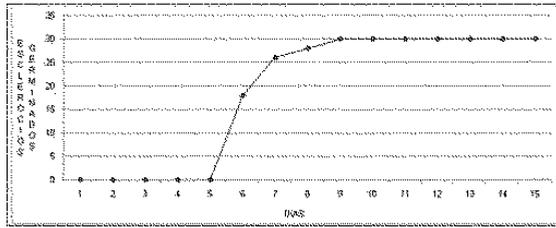
Porcentaje de germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, impregnados con extracto de hoja de ruda en N-hexano. Teniendo en cuenta que para cada ensayo se sembraron un total de 30 esclerocios, se calculó el porcentaje de inhibición como se presenta a continuación.

Figura 93. Esclerocios germinados, impregnados con N-Hexano (control negativo).



Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 94. Esclerocios germinados, impregnados con el extracto óptimo de inhibición (800 μ l de extracto, llevados a 1ml).



Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

El extracto con N-hexano, inhibió el desarrollo de *Sclerotium cepivorum* hasta el día 6, momento en el cual se observó una germinación del 60% de los esclerocios; al cabo del día 9, la totalidad de los esclerocios de este tratamiento, germinaron.

Figura 95. Germinación de los esclerocios impregnados con N-hexano. (Día 2).



Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Con respecto al control realizado con esclerocios sumergidos únicamente en N-hexano, se encontró que la germinación inició el segundo día, llegando a su totalidad en el día 3, lo que permite sugerir que el extracto de hoja de ruda retarda la germinación del fitopatógeno aproximadamente 4 días.

Figura 96. Germinación de los esclerocios impregnados con extracto óptimo de inhibición. (Día 9).

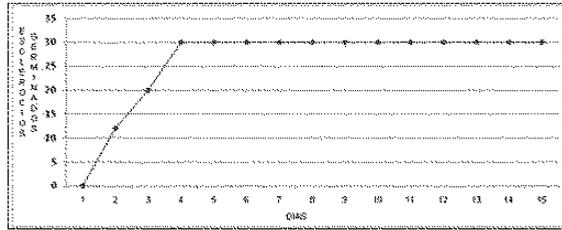


Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Los anteriores resultados permiten sugerir que este comportamiento posiblemente se presente también a nivel *in Vivo*, logrando una inhibición similar del patógeno.

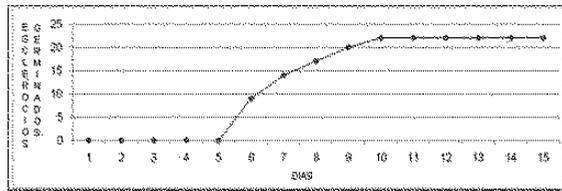
Porcentaje de germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, impregnados con infusiones de hoja de ruda en agua, en proporciones 1/12 y 1/6 p/v. Los resultados de estas pruebas de experimentación se presentan en las siguientes figuras:

Figura 97. Esclerocios germinados, impregnados con agua destilada estéril (control negativo).



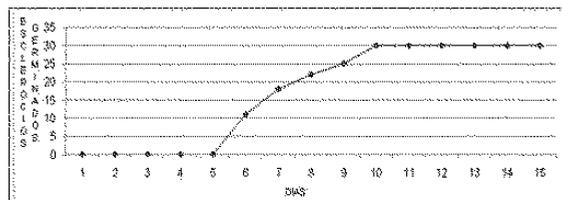
Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 98. Esclerocios germinados, impregnados con infusión de hoja de ruda en agua, 1:6 p/v.



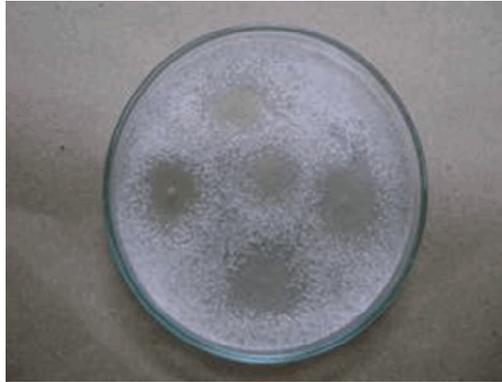
Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 99. Esclerocios germinados, impregnados con infusión de hoja de ruda en agua, 1:12 p/v.



Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 100. Germinación de los esclerocios impregnados con agua destilada estéril. (Día 13).



Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

El control realizado con agua destilada mostró que a partir del segundo día los esclerocios iniciaron su germinación, completando el 100% al cabo de los primeros 4 días.

Figura 101. Germinación de los esclerocios impregnados con extracto de ruda en agua, en proporción 1:6. (Día 7).



Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

La infusión de hoja de ruda 1:6 p/v, también inhibió la germinación del hongo hasta el día 6, tiempo en el cual se observó que el 30% de los esclerocios habían iniciado su crecimiento. Al cabo de los 10 días, el porcentaje de germinación llegó al 73.3%, dato que permaneció igual en mediciones posteriores.

Figura 102. Germinación de los esclerocios impregnados con extracto de ruda en agua, en proporción 1:12. (Día 9).



Fuente: Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

La infusión de hoja de ruda en proporción 1:12 p/v, inhibió totalmente la germinación de *Sclerotium cepivorum* hasta el día 6, momento en el que se observa la germinación del 36.6% de los esclerocios; en el día 10 todos los esclerocios habían germinado. Estos datos permiten inferir que el uso de infusiones de hoja de ruda, en medios donde se encuentren presentes esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, retarda la germinación de los mismos, en aproximadamente 4 días con respecto al control.

El extracto con mayor concentración de material vegetal, fue el que controló de mejor forma la germinación del hongo, evitando la germinación del 26.7% de los esclerocios, hasta el día 15. Si posteriormente se puede establecer que los extractos evaluados *in Vitro*, tuvieran un comportamiento similar *in Vivo*, permitiría sugerir que al realizar una aspersión periódica y constante con infusión de hoja de ruda, podría inhibirse el desarrollo del hongo en los cultivos.

De los ensayos realizados a los extractos evaluados, la infusión de hoja de ruda en agua en proporción 1:6 p/v, es la solución que genera mayor inhibición en la germinación del hongo, puesto que a pesar de que los esclerocios germinaron en el día 6, como el resto de los extractos, las otras muestras llegaron a una germinación del 100% de los esclerocios, entre el día 9 y 10, mientras que esta infusión obtuvo una germinación final del 73.3%, hasta el último día de evaluación.

ANÁLISIS DEL ESTUDIO

La pudrición blanca es una de las enfermedades más limitantes del cultivo de cebolla de bulbo, debido a la presencia de estructuras de resistencia que permanecen por años en el suelo y solamente germinan ante el estímulo de exudados de este cultivo.

La densidad de inóculo desempeña una función muy importante en el establecimiento y desarrollo de *Sclerotium cepivorum* en cultivos de *Allium cepa* L. Ponce (2008, p. 81), afirma que la cantidad de inóculo presente en el suelo tiene un efecto directo en el porcentaje de incidencia de la enfermedad por lo cual, es importante conocer la densidad de inóculo inicial para entender y quizá predecir el desarrollo de la enfermedad dentro de una población de plantas de campo y poder establecer estrategias del manejo del patógeno y manejo de la enfermedad. Castillo (2000, p. 52) indica que en varios cultivos se ha observado que la población de esclerocios / Kg de suelo sólo es representativa para la época y lugar en donde fueron recolectadas las muestras ya que a través del tiempo estas pueden modificarse por diversos factores ambientales.

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el estudio. La densidad de inóculo varió entre 0 y 42 esclerocios/ 20g de suelo en cada lote evaluado; en dónde la mayor densidad se encontró en la muestra TM7, una densidad media en la muestra TM8 correspondientes al municipio de Tibasosa, una tercera parte de la densidad se encontró en la muestra SM4 del municipio de Sogamoso, y una baja densidad en la muestra FM5 del municipio de Firavitoba. En los municipios de Nobsa y Paipa no se aislaron esclerocios, encontrándose suelos libres de la enfermedad, los cuales deben ser manejados adecuadamente para evitar la aparición de la pudrición blanca en estos cultivos.

De los 5 municipios evaluados, Tibasosa es el municipio que presenta una mayor densidad de inóculo, lo que puede representar una alta

infestación de los lotes y por ende causar pérdidas económicas importantes, detrimento en la calidad del cultivo y propagación de la enfermedad a lotes cercanos.

Con respecto a la viabilidad Granados (2005, p. 154) indica que el porcentaje de sobrevivencia se mantiene por encima del 92% hasta un 98% entre los 5 a 10 años de entierro de los esclerocios, si el período de entierro aumenta a 15 o 20 años los porcentajes de viabilidad oscilan entre 72 y 96% dependiendo de la profundidad de estos.

La viabilidad de los esclerocios aislados varió entre un 58.3% al 100%, en donde la menor viabilidad se encontró en SM4, seguida de TM7 y con un 100% de viabilidad FM5 y TM8. Comparando estos resultados con lo anteriormente expuesto, los esclerocios presentes en SM4 pueden tener más de 20 años de entierro debido a la viabilidad presentada; los esclerocios de la muestra TM7 están entre 15 y 20 años de entierro ya que el porcentaje de germinación es del 83.3% y los esclerocios pertenecientes a TM8 y FM5 pueden tener entre 5 y 10 años de entierro.

Los esclerocios no viables encontrados pueden indicar diferencias entre las cepas de los municipios, debido a condiciones ambientales que afectan la germinación del esclerocio, y/o por baja densidad de inóculo y/o por la presencia de microorganismos biocontroladores. Es importante tener en cuenta que las variaciones en la densidad de inóculo pueden deberse en gran parte a la capacidad de sobrevivencia de los esclerocios, la que depende entre otras cosas, de la degradación microbiológica y las condiciones físicas del suelo. (Coley Smith, 1990, p. 60)

La mayoría de los reportes encontrados acerca de la densidad de inóculo con respecto a la incidencia de la enfermedad, afirman que a medida que se aumenta la densidad de inóculo se incrementa la incidencia de la enfermedad. Ponce (2008, p. 81) observó una relación directa entre la densidad de inóculo inicial y la incidencia final acumulada, ya que con densidad de inóculo iniciales de 0.021, 0.052 y 0.44 esclerocios/g de suelo, las incidencias finales fueron 51.93%, 62.75% y 82.9% respectivamente. Según estos resultados en los análisis obtenidos en el estudio de la densidad de inóculo la mayor incidencia de la enfermedad se presenta en la muestra TM7, seguida de TM8 y SM4, y la menor incidencia en la muestra FM5.

En literatura revisada, se encuentra que densidades de inóculo bajas tienen similar capacidad de provocar la misma incidencia y severidad de la enfermedad que una alta densidad de inóculo. Por ejemplo, Castillo (2000, p. 55), indica que bajo las mismas condiciones ambientales, a partir de 100 esclerocios/Kg de suelo la incidencia de la enfermedad es del 93%, densidad de inóculo de 300 esclerocios/Kg de suelo tienen incidencia del 93% y 500 esclerocios/ kg de suelo el 100% de la incidencia. Estudios realizados en la provincia de Córdoba (Argentina) indican que la incidencia final de la enfermedad varió entre 2-100%, valores de incidencia del 100% fueron encontrados tanto en los sitios de muestreo que tenían desde 1 hasta 69 esclerocios / 100g de suelo. (Orecchia, 2003, p. 3)

Crowe (1980, p. 76). Cita que el inóculo de *S. cepivorum* es muy eficiente, debido a que muchos esclerocios germinan y cada esclerocio puede iniciar una infección. Así, reportan una incidencia de 10 a 100% debida a densidades de inóculo de 0.001 a 0.1 esclerocios/g de suelo. Esto indica que la incidencia probable de las cepas aisladas en el estudio puede ser igual en los cuatro aislamientos, independiente de la densidad de inóculo presentada. (Granados, 2005, p. 149)

Estos resultados dificultan establecer una relación directa entre densidad de inóculo e incidencia de la enfermedad, e indica que aún a bajas densidades de inóculo en los lotes, la pérdida en plantas y la disminución del rendimiento puede ser limitante para el cultivo. Otra característica del patógeno es, que a bajas densidades de inóculo y cuando el patógeno tiene movilidad limitada, las raíces del hospedero son las que incrementan la probabilidad de contacto y el inicio de la enfermedad.

Una vez establecida la enfermedad en el lote, durante los años posteriores al cultivo la densidad de inóculo en el suelo va aumentando y en consecuencia la incidencia de la enfermedad.

En suelos nuevos en donde no se conoce su historial y en lotes con pocos años de cultivo de cebolla, es importante determinar la presencia, densidad y distribución de los esclerocios del patógeno. Esto permitirá tomar medidas preventivas para manejar la enfermedad e impedir su dispersión en el lote.

Granados (2005, p. 149), afirma que la sobrevivencia de esclerocios de muchos hongos es afectada por el estado nutricional del suelo, principalmente por su contenido de materia orgánica, mientras el pH no tiene un efecto pronunciado. Lo anterior es compatible con lo encontrado en el estudio, en donde se obtuvo un 100% de germinación en todas las concentraciones de pH utilizadas para el día 22 de incubación.

Las cuatro cepas evaluadas presentan algunas diferencias bajo el efecto de diversas concentraciones de iones hidrógeno. A pH de 3.9 y 4.8 la muestra TM7 tiene un porcentaje de germinación rápido con respecto a las otras cepas, bajo estas concentraciones de pH SM4, FM5 y TM8 tienen un comportamiento similar en el porcentaje de germinación. Bajo el efecto de pH 5.9 no se presenta variaciones significativas en las cuatro cepas evaluadas; un comportamiento diferente presenta a pH 6.9 en donde TM7 y TM8 tienen un porcentaje de germinación más rápido que SM4 y FM5 los cuales son similares.

La concentración de pH 7.5 permitió una germinación más rápida de TM8, en pH de 7.9 la cepa que primero obtuvo el 100% de germinación fue FM5 y a pH de 8.9 el primero en iniciar su germinación al 100% fue TM7. Concentraciones de pH de 5.9 tiene un efecto negativo sobre TM7 debido a que el inicio de su germinación fue tardío comparándolo con las otras concentraciones de pH evaluadas. Según los valores obtenidos se puede clasificar a TM7 como una cepa ácido tolerante, debido a que crece más rápido que las otras cepas a pH ácidos.

Aquí se puede afirmar que las concentraciones de pH pueden retardar o acelerar la germinación de los esclerocios, sin embargo en el transcurso del tiempo, siempre se logra la germinación, pero se debe tener en cuenta que el rango de pH para el cultivo de cebolla es de 6.0 a 7.0. El pH óptimo de *S. cepivorum* reportado por Granados 20005, p. 159) es de 4.8, aunque se pueden desarrollar en pH cercanos a 8.0, en el cual la cepa que obtuvo mejor porcentaje de germinación fue TM7; el pH óptimo para desarrollar la enfermedad es de 6.1, presentándose una similitud de las cuatro cepas evaluadas en el porcentaje de germinación bajo el efecto de pH 5.9. En cuanto al pH óptimo para el desarrollo del cultivo (6.9) las cepas TM7 y TM8 presentan un porcentaje de germinación más rápido que las muestras FM5 y SM4.

Estos resultados permiten saber que las cuatro cepas evaluadas no presentan ningún efecto negativo bajo concentraciones diferentes de

iones hidrógeno y que pueden llegar a causar enfermedad debido a que tienen una fisiología similar en los rangos de pH óptimos para el desarrollo de la enfermedad y el pH de suelo necesario para el cultivo de cebolla. También puede indicar que las cepas evaluadas tienen la capacidad de mantener su citoplasma próximo a valores neutros, soportando valores extremos de pH, conservando así la integridad de la pared y la membrana celular. (Atlas, 2002, p. 320)

Bajo el efecto de concentraciones osmóticas de azúcar, no se presenta ninguna inhibición en el porcentaje de germinación, todas las cepas tienen la habilidad de germinar en ausencia o en diferentes concentraciones de glucosa. Se observa una diferencia significativa en la cepa FM5 con respecto a las otras, la cual conforme aumenta la concentración de glucosa, el porcentaje de germinación es directamente proporcional. En cuanto a la cepa TM8 en concentraciones de 0.145M, 0.25M y 0.5M su porcentaje de germinación es más lento comparándolo con las otras cepas; diferente a lo observado en concentraciones de 0.05M en donde el 100% de germinación lo obtiene en el día 16 de incubación.

La cepa TM7 tiene un comportamiento variable en las diferentes concentraciones de glucosa, en ausencia de esta y a 0.05M su porcentaje de germinación es más rápido con respecto a las otras cepas, a 0.145M y 0.25M tiene un inicio de porcentaje de germinación lento y luego bruscamente pasa al 100% de ésta en el día 16 de incubación, y a concentraciones de 0.5M el 100% de germinación lo obtiene lentamente hasta el día 22 de incubación.

En la cepa SM4, se observa una reacción inversa con respecto a la cepa TM8, es decir a concentraciones bajas de glucosa (0.0M y 0.05M) tiene un porcentaje de germinación lento, y a concentración de 0.145M, 0.25M y 0.5M el porcentaje de germinación es más rápido, inicia el día 12 y llega al 100% el día 18 de incubación.

Concentraciones altas de sal (2.0M y 2.5M) ejercen un efecto inhibitorio sobre la germinación de *S. cepivorum* según lo encontrado en el estudio, en donde no se observó crecimiento de esclerocios a estas concentraciones, es decir; las condiciones de crecimiento no son las adecuadas, debido a que los esclerocios presentan un estado de dormancia, en el cual el hongo protege sus estructuras internas y cuando existen condiciones adecuadas para su crecimiento, estos pueden

germinar. También, puede ser que estas concentraciones de NaCl posiblemente desnaturalicen las proteínas, alterando la estructura terciaria que es esencial para la actividad enzimática.

La cepa FM5 en ausencia de sal y a concentraciones de 0.145M y 1M muestra un porcentaje de germinación más rápido que las otras cepas evaluadas. La muestra TM7 a concentraciones nulas y bajas de sal tiene un porcentaje de germinación más lento que FM5 pero más rápido que TM8 y SM4. Las muestras TM8 y SM4 tienen un comportamiento similar en concentraciones bajas de sal, con un porcentaje de germinación más lento que TM7 y FM5.

La mayoría de los hongos son aerobios estrictos, comprobado en la evaluación de esta característica en donde las cuatro cepas evaluadas presentan inhibición de germinación en ausencia de oxígeno, requieren de este componente para poder crecer, por lo cual los esclerocios en el cultivo de cebolla permanecen cerca de la superficie. No se observan diferencias significativas en el porcentaje de germinación en las cuatro cepas evaluadas bajo la presencia de oxígeno. Este método podría usarse como control del fitopatógeno si se entierran más profundos los esclerocios y de hecho se maneje que plantas enfermas se entierren para evitar su propagación.

La temperatura óptima de crecimiento de cada microorganismo permite una tasa más elevada de crecimiento y reproducción, también posee una temperatura mínima de crecimiento por debajo de la cual son metabólicamente inactivos, así como un límite superior de temperatura, más allá del cual no pueden crecer.

La temperatura del suelo es el elemento climático que más influye en la germinación y desarrollo de *S. cepivorum*, así como la enfermedad que causa. Los esclerocios infectan en cualquier etapa de crecimiento del hospedante, si se presentan temperaturas de 15 a 25°C con un óptimo de 20°C. Estudios realizados por Sánchez & Zavaleta (2000, p. 110) reportan que la tasa de germinación de esclerocios aislados en México es más alta a 19 y 24°C.

En el presente estudio, las temperaturas adecuadas para la germinación de esclerocios fueron de 15°C, 20°C y 25°C, coincidiendo con lo reportado por los autores mencionados. El porcentaje de germinación bajo estas temperaturas no muestra diferencias significativas, presentando

el mismo porcentaje de germinación y llegando al 100% el mismo día, exceptuando la cepa TM8 que a temperatura de 20°C el 100% de la germinación lo obtiene antes que las otras cepas.

El efecto de la temperatura del suelo, la humedad y la profundidad de entierro sobre la sobrevivencia de esclerocios, señala que los esclerocios de *S. cepivorum* son más sensibles al calor reduciendo la supervivencia y actividad de los esclerocios, así, a una temperatura de 35°C, es posible dañar completamente el 50% de los propágulos (DL_{50}) en 129.6 h.

Estudios realizados en la provincia de Córdoba indica que temperaturas entre 5 y 27°C favorecen el crecimiento del micelio que puede infectar las raíces de las plantas vecinas y propagarse debido al contacto de raíces planta a planta (Orecchia, 2003, p. 4); esto es compatible con lo observado en la cepa TM8 en donde se presentó el 10% de germinación el día 22 de incubación a temperatura de 4°C, la germinación tardía se puede explicar porque a bajas temperaturas la velocidad de crecimiento y la actividad metabólica disminuye.

En los estudios de fertilidad de suelos se utilizaron las propiedades físicas y químicas para determinar la productividad de los mismos, ya que los cambios de materia orgánica son muy lentos y se pueden requerir años para poder medir los resultantes de las perturbaciones que produce el hombre. Las características biológicas y las actividades enzimáticas son sensibles al estrés ambiental, estas razones se consideran apropiadas para estimar la calidad de un suelo.

El suelo tiene niveles basales de actividad enzimática que son muy difíciles de cambiar permanentemente; en el muestreo los niveles de actividad en cada uno de los cultivos en su mayoría son mínimos indicando posiblemente que este sea el nivel basal de dicha actividad. Dicho estado basal puede estar relacionado con la producción de enzima por los microorganismos. La composición de la comunidad microbiana puede estar muy relacionada con la degradación de grandes macromoléculas de sustrato como la celulosa.

Alvear (2006) establece que la celulosa natural rara vez se encuentra en un estado puro, generalmente se encuentra embebida en una matriz de lignina y hemicelulosa restringiendo fuertemente el acceso de las enzimas celulolíticas al sustrato; la descomposición se hace

principalmente por hongos y actinomicetes. Pero al aplicar los fungicidas se afectan estas poblaciones y la producción de las enzimas se ve afectada. Esta sería una de las razones por las cuales la actividad microbiana es deficiente en las muestras de suelo analizadas, ya que el manejo y control de plagas se realiza mediante el uso de fungicidas tales como: Forum, Cymozeb, Dithane, Fitoraz entre otros. Dichos fungicidas son de origen químico haciendo que éstos sean aún más perjudiciales.

Los valores de materia orgánica son bajos incluyendo los controles empleados para cada uno de los municipios analizados. Cuando se rota un cultivo el suelo es mezclado y los restos vegetales son incorporados como fragmentos de diversos tamaños aumentando así la superficie de oxidación de la materia orgánica por los microorganismos; además los suelos quedan desnudos y expuestos a la radiación solar que aumenta la temperatura haciendo que la velocidad de descomposición aumente y sea más fácil. Cabe notar, que en la mayoría de los cultivos, no se realiza la rotación de estos; puesto que son suelos que se han destinado específicamente a la producción de la cebolla perdiendo la productividad. En los suelos que si se realiza rotación es muy escasa y lo hacen con el fin de recoger del suelo gran cantidad de plaguicidas y fungicidas y no con el fin de mejorar las condiciones de dicho suelo.

Los suelos vírgenes suelen contener cantidades adecuadas de todos los elementos necesarios para la correcta nutrición de las plantas. Pero cuando una especie determinada se cultiva año tras año en un mismo lugar, el suelo puede agotarse y ser deficitario en uno o varios nutrientes. En tal caso, es preciso reponerlos en forma de fertilizantes. La aplicación de fertilizantes adecuados estimula el crecimiento de las plantas. Los fertilizantes convencionales tienden a cambiar el pH del suelo; pero que las plantas más específicamente sus raíces juegan un papel clave en el pH de la rizósfera así como también que el estado de desarrollo de la planta afecta la calidad y desarrollo de los mismos; las plantas prefieren suelos ácidos o por lo menos consiguen desenvolverse allí, excretan sustancias alcalinas que tienden progresivamente a llevar el pH a un nivel óptimo.

El pH de los suelos varía de 5.5 hasta 8.0, encontrando que tiende a ser un suelo con un pH básico, aunque hay municipios como Paipa en los que el pH es de 4,5 y 4,8; que corresponde a suelos en los que

se utiliza gran cantidad de fertilizantes, razón por la cual el suelo alcanza dichos valores. Sin embargo, pese a su valor bajo en el pH, el porcentaje de materia orgánica si es mayor en comparación a otros municipios, esto afirmaría que la rotación es la mejor técnica que se puede emplear para el mantenimiento de un suelo.

Siguiendo lo anterior, se puede establecer cuales serían los suelos que presentan las mejores condiciones, es decir, que presenten un pH óptimo y un alto porcentaje de materia orgánica, dichos parámetros podrán establecer de la misma forma la actividad enzimática que, como ya se explicó, depende de varios factores

El municipio de Tibasosa, presenta valores de pH básicos que van desde 7 hasta 8, pH óptimo de desarrollo de las plantas, pero presenta un porcentaje de materia orgánica bajo que no explicaría que en el municipio la actividad enzimática no se encuentre disminuida, con excepción de algunas muestras como la M2 y la M8-1 que si tienen actividad celulasa mínima.

En el caso de Nobsa y la actividad celulasa, los valores de pH varían un poco más ya que hay muestras que alcanzan valores de 4 en la muestra NM6, hay otra como la NM5 que tiene un valor de 6, pero son pHs que tienden a ser ácidos pero que no están tan disminuidos; el porcentaje de materia orgánica si es mínimo a excepción de la muestra NM1 y del control. Con todo esto se esperaría una actividad enzimática elevada, pero no es así, en la muestra que se pretende encontrar niveles altos que es la NM1, presenta niveles mínimos de actividad y la muestra que no presenta un pH óptimo es la que tiene la actividad celulasa más alta. Con esto la actividad enzimática no depende del manejo que se le está dando al cultivo.

En el municipio de Firavitoba los valores de pH van desde 5.8 hasta 7.6, valores que se pueden establecer como adecuados, los porcentajes de materia orgánica que cabe destacar son el de la muestra FM1 con 6.71% y el del control con 5.57%. Valores que entre las muestras son mayores pero que a nivel general son altos, puesto que el resto tienen valores del 4%. La actividad celulasa para este municipio es baja, la muestra control es la única que resalta valores significativos con respecto al resto; estos valores estarían relacionados con el tiempo que llevan cultivando (que es de año y medio), durante este tiempo no se realiza rotación del cultivo. Además, utilizan gran cantidad de

productos químicos como fertilizantes y plaguicidas que, como se demuestra, están ocasionando deterioro de los suelos. En este caso la actividad enzimática si se ve influenciada por el manejo de los suelos.

En el municipio de Paipa, el pH tiene valores entre 4.5 y 6.9, este último correspondiente al control, demostrando que el resto de muestras tienen valores un poco ácidos; el porcentaje de materia orgánica es significativo para las muestras PM3 con un 15.3% y para la PM1 con un 12.2% valores que se encuentran por encima del control que tiene un porcentaje del 8.86. Para la actividad enzimática los valores son mínimos para la muestra PM1 y PM4 que no alcanzan valores basales de actividad, la muestra PM3 es la que alcanza valores superiores a los del control, valores que irían acorde con el porcentaje de materia orgánica; las muestras provienen de suelos que llevan de 1 a 5 años cultivando, pero en todos se realiza la rotación de los cultivos y se utilizan productos que no son tan nocivos para el cuidado y mantenimiento del cultivo, razón por la cual no concuerda la actividad celulasa para este municipio ya que los valores que se esperan tendrían que ser más altos. El valor del control de la misma forma no corresponde ya que al ser un suelo en donde no se realizan cultivos debería alcanzar niveles más representativos de actividad enzimática.

La actividad celulasa en el municipio de Sogamoso reporta valores bajos tanto para pH como para el porcentaje de materia orgánica. Los valores de pH van desde 5.8 hasta 7.4, pero estos estarían entre un rango apropiado para el desarrollo de las plantas. Los porcentajes de materia orgánica se leen bajos, ya que el valor más alto es para la muestra SM9 con 4.84% y le siguen las muestras SM1 y SM8 con un 3.07%; aunque de manera lógica el valor representativo es para el control con un 5.57%; pero para la actividad enzimática los valores altos no concuerdan con los porcentajes de materia orgánica ni para los de pH, pues las muestras representativas son las muestras SM2, SM4, SM9 y el control. Ahora bien, de la misma forma no concuerda el tiempo que llevan cultivando los suelos pues están entre 2 años como mínimo hasta 15 años, mostrando que el tiempo del cultivo no interfiere con el de actividad celulasa posiblemente por el manejo que se les da a estos ya que realizan la rotación del cultivo y los plaguicidas que usan son menos tóxicos. Así mismo, con estos resultados, se estaría demostrando que el uso de fertilizantes, de plaguicidas, la rotación del cultivo, no interfieren de manera directa con la actividad enzimática de la celulasa en los suelos analizados.

La fosfatasa (llamada también fosfomonoesterasa), es una enzima que participa en la mineralización del fósforo orgánico y su mecanismo de acción es básicamente extracelular, es decir, una vez generada por los microorganismos o raíces de las plantas, puede ser estabilizada en la materia orgánica del suelo, o en las partículas coloidales inorgánicas y generalmente liberada gradualmente cuando exista poca disponibilidad de iones fosfatos en el suelo. (Knight, 2004, p. 21)

Se presenta mayor actividad de la enzima fosfatasa ácida en la muestra tres de Firavitoba (FM-3), con $902.08 \mu\text{gpNP} \cdot 0.25\text{g suelo} \cdot \text{hora}$, seguida por la muestra cinco de Firavitoba (FM-5), con $614.89 \mu\text{gpNP} \cdot 0.25\text{g suelo} \cdot \text{hora}$, y por la muestra tres de Sogamoso (SM-3) con $597.82 \mu\text{gpNP} \cdot 0.25\text{g suelo} \cdot \text{hora}$, atribuible ya sea por ser suelos que presentaban gran área radicular, había un aumento de poblaciones microbianas en la rizósfera, que se le habían adicionado al suelo productos orgánicos residuales, o que indican que esta actividad enzimática disminuye si en el suelo hay una mayor disponibilidad de fósforo (retro-inhibición negativa). (Alvear, 2006, p. 1-2).

La menor actividad de la enzima se presenta en la muestra cinco de Sogamoso (SM-5), con $16.07 \mu\text{gpNP} \cdot 0.25\text{g suelo} \cdot \text{hora}$, precedida por la muestra siete de Firavitoba (FM-7), con $32.81 \mu\text{gpNP} \cdot 0.25\text{g suelo} \cdot \text{hora}$ y por la muestra seis de Sogamoso (SM-6), con $41.14 \mu\text{gpNP} \cdot 0.25\text{g suelo} \cdot \text{hora}$, valores que podrían estar relacionados a una alta disponibilidad del fósforo en los suelos de estas fincas, los cuales oscilan entre 56 y 94 ppm, considerando que los mecanismos enzimáticos, especialmente los de la fosfatasa se ven inhibidos cuando existe una mayor disponibilidad de nutrientes en forma lábil en el suelo o posiblemente debido al contenido de arcillas de esos suelos, lo que permite asumir que la enzima podría estar inmovilizada sobre esos minerales que usualmente están cargados negativamente. Esto explicaría el por qué la muestra cinco de Nobsa (NM-5), que presenta el mayor porcentaje de arcilla tiene un valor bajo de la enzima. (Rossel, 2006, pp. 17-33).

La actividad enzimática de las muestras control de cada municipio, está comprendida entre $217.288 \mu\text{gpNP} \cdot 0.25\text{g suelo} \cdot \text{hora}$ y $333.56 \mu\text{gpNP} \cdot 0.25\text{g suelo} \cdot \text{hora}$, unidades muy similares a las de la mayoría de las muestras que si han sido cultivadas con cebolla de bulbo, tal vez asociado a que la producción de fosfatasa ácida es generada principalmente por las raíces de todas las plantas en general.

La mayoría de las muestras tienden a presentar valores bajos de actividad enzimática de fosfatasa ácida, que puede asociarse a las prácticas de fertilización, la intensidad de labores agrícolas como la aradura, y sobre todo de fertilizantes fosfatados que podrían a largo plazo suprimir la segregación de enzimas solubilizantes del fósforo orgánico, o herbicidas como las triazinas, grupo al cual pertenece la simazina (Alvear, 2006, pp. 1-2). o quizá asociado aparentemente con la menor concentración y cantidad de raíces a una profundidad de 5 y 20cm pues éstas estimularían la creación de microhábitats que favorecen la actividad microbiana en dicha zona, como se ha demostrado en diferentes investigaciones (Tabatabai, 1994, pp. 775-833), que demuestran que la actividad de las fosfatasas decrece a medida que avanza dentro del perfil del suelo, factor que se asocia con la disminución de la microbiota, y factores nutricionales como el descenso en algunos macro-microelementos, contenidos de materia orgánica y actividad rizosférica pero que contradice Rossel (2006, p. 1-2), afirmando que la actividad permanece constante a 20 cm de profundidad, sin embargo aclara que su estudio fue hecho en zona subtropical donde las tierras permanecen calrosas y que facilitan proporciones altas de descomposición reduciendo el potencial para construir materia orgánica en la superficie, además no obtuvieron correlación entre la actividad enzimática y el pH ni con el fósforo extraíble, asumido a la supresión de la actividad fosfatasa de la tierra por la aplicación a largo plazo de fertilizantes de fosfato.

La síntesis, actividad y estabilidad de la fosfatasa ácida está ligada al pH del suelo en este caso, un 65% de muestras de suelo corroboran que se trata de suelos que tienden a una ligera alcalinidad pues al tratarse de una zona semiárida, es muy probable que exista un lavado limitado de las bases cambiables del suelo, lo cual se refleja en valores de pH relativamente altos.

Sin embargo, en Firavitoba y Sogamoso, especialmente, no se trata de suelos con problemas severos de salinidad, ya que los valores de la conductividad eléctrica (CE) que presentan, indican que tienen pocas sales solubles acumuladas lo que explicaría el por qué son éstos los municipios en donde hay mayor actividad de fosfatasa ácida, pero, aunque la variable con la que mejor se correlaciona parece ser el porcentaje de materia orgánica (%MO), el comportamiento de la enzima parece estar asociado además al efecto del pH y la disponibilidad de fósforo, a una distribución heterogénea de la enzima misma,

microbiota, u otros factores. Aunque el pH más ácido lo presenten las muestras de Paipa junto a un alto porcentaje de MO, son muestras que tienen muy baja actividad de fosfatasa ácida.

La materia orgánica constituye el reservorio temporal como secuestrador de carbono, es fuente primaria de nutrientes en el suelo para la nutrición vegetal, y presenta una fuerte influencia en la persistencia y degradación de plaguicidas y de residuos orgánicos. Además su importancia radica no solo en ser constituyente sino también contribuyente de los complejos humus-enzimas, que son cruciales para las reacciones minerales y orgánicas.

Se puede deducir que la zona del presente estudio corresponde a suelo de labranza con resultados que varían desde $16.07 \mu\text{gpNP} \cdot 0.25\text{g suelo} \cdot \text{hora}$ hasta $902.08 \mu\text{gpNP} \cdot 0.25\text{g suelo} \cdot \text{hora}$.

Tabatabai (1994, p. 783), indica que las fosfatasas son enzimas inducibles y que la intensidad de su excreción por las raíces de las plantas y los microorganismos, está determinada por los requerimientos de fosfatos de éstos. Al respecto Schinner (1996, pp. 7-10) encontró que el sistema radicular de plantas en suelos deficientes en fósforo incrementaba la secreción de enzimas fosfatasa. Aunque existen correlaciones negativas entre la actividad fosfatasa ácida y el fósforo disponible en el suelo objeto de estudio, lo anterior podría explicar la variabilidad de valores en el distrito de riego alto de Chicamocha.

La actividad proteasa cataliza las reacciones que degradan proteínas y péptidos por lo que está involucrada al igual que la ureasa en la descomposición progresiva o ciclo, del nitrógeno. Procede de diferentes tipos de microorganismos, de residuos de las plantas y de la mesofauna del suelo. Su seguimiento permite evaluar los cambios producidos en las transformaciones de este elemento esencial en los suelos (Cerón, 2006, p. 2-3). Hay que remarcar que la actividad proteasa determinada en este estudio no corresponde a la enzima que hidroliza la N- α -benzoil-L-argininamida (BAA), la cual usa como sustratos derivados de proteínas, polipéptidos simples y dipéptidos que, a su vez, han sido hidrolizados desde moléculas más complejas por otras proteasas, que son éstas últimas las que se evaluaron, que actúan sobre sustratos más simples como la caseína.

Se observa la mayor actividad de la enzima en las muestras control de cada municipio, en primer lugar el control de Sogamoso y Firavitoba (C-S, C-F) con $8803,10 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}\cdot\text{1dm}\cdot\text{h}\cdot\text{1}$ y la muestra control de Tibasosa (C-T) con $8144,15 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}\cdot\text{1dm}\cdot\text{h}\cdot\text{1}$; el control de Paipa(C-P), con $6002,69 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}\cdot\text{1dm}\cdot\text{h}\cdot\text{1}$ seguido por el control de Nobsa (C-N), que aunque es la mayor actividad del municipio, no pasa de los $3357.73 \mu\text{gtirosina}/0.5\text{g suelo}$, valor encontrado en muestras con cultivo de cebolla de bulbo de otros municipios.

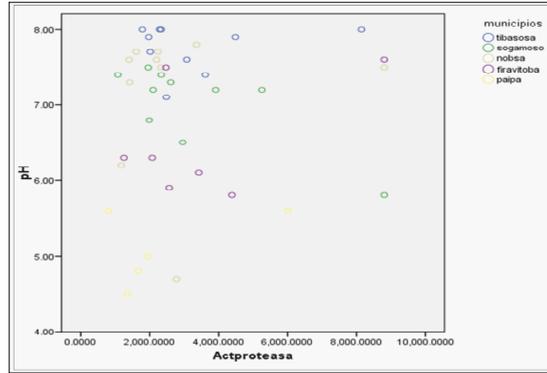
La adición de insecticidas o fungicidas puede inhibir o estimular la actividad enzimática, las muestras de suelo evaluadas han sido expuestas a una variedad de estos componentes que podrían explicar el por qué hay presencia de actividad proteasa. Sin embargo, se podría afirmar que el cultivo de cebolla de bulbo si afecta dicha actividad, pues los valores de las muestras control son mayores con respecto a las demás muestras. Quizá el metabolismo de la cebolla o los microorganismos por los que haya estado afectada perturben el ciclo del Nitrógeno, como elemento esencial del suelo y, así mismo, la actividad de la proteasa.

La menor actividad se ve reflejada en la muestra tres de Paipa (PM-3), con $802.65 \mu\text{gtirosina}/0.5\text{g suelo}$, la muestra seis de Nobsa (NM-6), con $957.36 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}\cdot\text{1dm}\cdot\text{h}\cdot\text{1}$ y la muestra cinco de Sogamoso (SM-5), con $1074,49 \mu\text{gTyr}\cdot\text{g}\cdot\text{1dm}\cdot\text{h}\cdot\text{1}$.

En general, las muestras tienden a presentar actividad proteasa baja asociados -tal vez- porque son terrenos sometidos a diferentes cultivos y manejo agrícola, pues se encontró que la actividad proteasa caseína es mayor cuando el suelo es sometido a cero-labranza, indicando que la actividad proteasa caseína se incrementa cuando los suelos agrícolas se transforman en praderas.

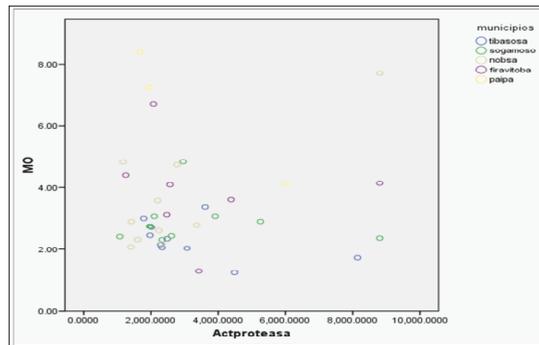
No se encontró diferencia significativa al correlacionar la actividad proteasa con la materia orgánica y el pH ($0,367$ y $0,577$; $p < 0.05$) respectivamente, como se presenta en las siguientes figuras.

Figura 103. Correlación entre el pH y la Actividad Proteasa.



Fuente: Ducón, J. Urbano, E., (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 104. Correlación entre la materia orgánica y la Actividad Proteasa.

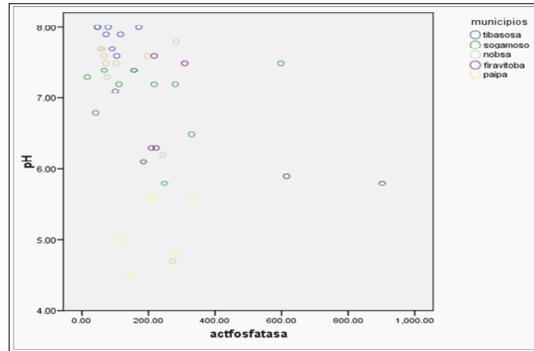


Fuente: Ducón, J. Urbano, E., (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

No se encontró diferencia significativa para materia orgánica (0,504, $p < 0.05$), pero si hay diferencia significativa con el pH (0,013, $p < 0.05$) con respecto a la actividad de la fosfatasa ácida (ver figura 105), y de la misma forma existe correlación con el fósforo pues se aumenta cuando hay poca disponibilidad de éste y viceversa. (ver figura 107). La actividad

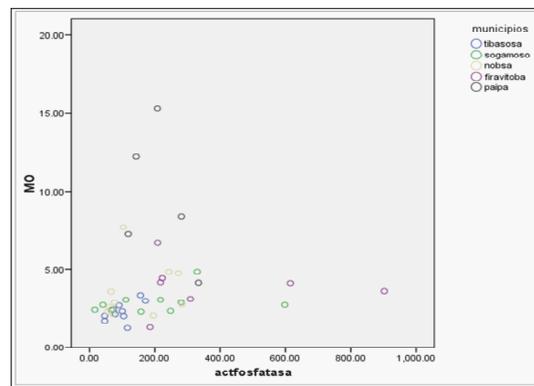
celulasa no se correlaciona adecuadamente con el pH y la Materia Orgánica, es decir, no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 105. Correlación entre el pH y la Actividad Fosfatasa ácida.



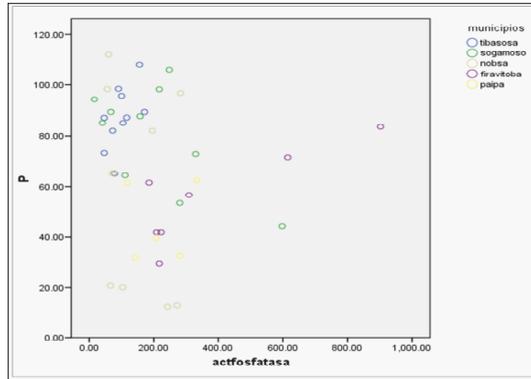
Fuente: Ducón, J. Urbano, E., (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 106. Correlación entre la Materia Orgánica y la Actividad Fosfatasa ácida.



Fuente: Ducón, J. Urbano, E., (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (Allium Cepa L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Figura 107. Correlación entre el Fósforo y la Actividad Fosfatasa ácida.



Fuente: Ducón, J. Urbano, E., (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa L.*) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

La mayor densidad de inóculo se encontró en el municipio de Tibasosa (66), seguido de Sogamoso (22) y Firavitoba (14). El porcentaje de viabilidad de esclerocios fue menor en Sogamoso (del 58.3%) mientras que en Firavitoba y Tibasosa se obtuvo el 100%. Los municipios de Nobsa y Paipa se encontraron libres de esclerocios, indicando suelos adecuados para el cultivo de cebolla pero con excelente manejo agronómico, para evitar la aparición de la enfermedad y la diseminación a otros lotes.

La caracterización fisiológica permite determinar que las cuatro cepas evaluadas de *Sclerotium cepivorum*, no presentan inhibición en el crecimiento bajo diferentes concentraciones de pH y de glucosa. Concentraciones altas de sal (2.0 M, 2.5 M) ejercen un efecto negativo sobre la germinación de esclerocios, observando el mismo comportamiento en ausencia de oxígeno, siendo factores limitantes para el crecimiento del hongo. En cuanto a la temperatura las cepas germinan en un rango de 15°C a 25°C en donde se observa una germinación del 100%.

Conocer la densidad de inóculo, viabilidad y algunas características de crecimiento del hongo *Sclerotium cepivorum*, permitirá para futuras investigaciones, una base, para llevar a cabo un control eficiente de

la enfermedad y recuperar la productividad del cultivo en la región. El mayor número de aislamientos de *Trichoderma sp* y *Clonostachys rosea* se encontró en el municipio de Paipa donde 4 pertenecían al género *Clonostachys rosea* y 3 a *Trichoderma sp*, seguida de Firavitoba con 2 aislamientos de *Trichoderma sp* y Nobsa con un aislamiento *Trichoderma sp*.

La capacidad de degradación de los esclerocios por parte de los microorganismos biocontroladores frente a las 2 muestras aisladas del patógeno mostraron un comportamiento de degradación del 68% para TM7 y un 63% para TM8 por parte de *Clonostachys rosea*. Con respecto a *Trichoderma sp* el 71% de degradación correspondió a TM7 y el 59% a TM8, notándose un similar porcentaje de degradación por parte de *Trichoderma sp* y *Clonostachys rosea* frente a TM7.

Teniendo en cuenta los porcentajes de degradación de los esclerocios por parte de los biocontroladores se podría implementar el control biológico como una alternativa en el tratamiento de la enfermedad, evitando el uso de agroquímicos en cultivos con alta densidad de inóculo del fitopatógeno.

En el recuento de proteolíticos se encontró que ninguno de los suelos estudiados con cultivo de cebolla presentó un recuento superior en relación con el control, lo que sugiere que la disminución está relacionada con las prácticas de cultivo de los suelos analizados y el manejo cultural que se realiza en la zona (uso de agroquímicos, rotación de cultivos, desgaste físico del terreno), los suelos control de Tibasosa y Sogamoso presentaron el recuento más bajo ($6,3 \times 10$ NMP de proteolíticos. g^{-1} de suelo) en comparación con los otros controles ($7,04 \times 10$ NMP de proteolíticos. g^{-1} de suelo), indicando que la variabilidad también depende del lugar geográfico en donde se toma la muestra .

Se observó que para el recuento de organismos nitrificantes, la cuantificación de este parámetro no presentó resultados significativos, ni diferencias entre muestras, estos resultados podrían relacionarse con la metodología utilizada para su cuantificación, en cuanto la especificidad o inespecificidad del medio empleado para la determinación de este grupo de microorganismos. Por tal razón se plantea más adelante, realizar un revisión más extensa de los medios más utilizados para tal fin, lo cual conlleve a una reproducibilidad de esta técnica y que a futuro se pueda tener estandarizado tanto el medio como la técnica de lectura.

En el recuento de bacterias celulolíticas en los suelos del municipio de Tibasosa, no se presentaron diferencias significativas para este parámetro en los suelos analizados, este mismo comportamiento fue evidenciado en las muestras de los otros municipios. En cuanto a los hongos se presentaron diferencias significativas en los suelos del municipio de Nobsa, presentando los recuentos más altos trabajando a una dilución 10^{-2} en NM4 y NM9 (4,25 y 4,05 log 10 UFC de hongos celulolíticos por g de suelo). Lo cual sugiere la presencia de hongos con esta actividad en estos suelos, siendo favorable porque algunos, caso de *Trichoderma* spp, se han estudiado como controladores biológicos de hongos fitopatógenos.

El proceso experimental realizado, permite establecer protocolos de repetitividad de cada una de las actividades determinadas. Esto propició determinar el coeficiente de determinación (r^2 0.98) para cada una de las actividades enzimáticas.

La mayor actividad enzimática de Proteasa y Fosfatasa ácida se presentó en el municipio de Firavitoba, debido a que son suelos sometidos a prácticas agrícolas menos nocivas. De forma no esperada, la mayor actividad enzimática de Celulasa se dio en el municipio de Paipa, atribuible tal vez a la disponibilidad de la materia orgánica.

Se logró evidenciar que la enzima que presenta mayor actividad en los diferentes suelos analizados es la Proteasa; así mismo, se ve influenciada directamente por el cultivo de cebolla. La Celulasa fue la enzima que presentó la menor actividad esto sin tener en cuenta si el suelo era o no cultivado con cebolla de bulbo, así que se deberán ampliar los estudios con respecto a esta enzima.

Existe correlación entre la actividad de la fosfatasa ácida con el fósforo pues se aumenta cuando hay poca disponibilidad de éste y viceversa.

La encuesta aplicada permitió evidenciar el manejo de los cultivos en la zona, demostrando que hay un alto manejo histórico y en especial del cultivo de la cebolla, que ha generado problemas fitosanitarios en especial con *Sclerotium cepivorum*. Igualmente por este manejo se presenta el uso excesivo de plaguicidas y fertilizantes, generando desgaste de la flora edáfica.

El extracto que inhibió el crecimiento de *Sclerotium cepivorum In Vitro*, fue el elaborado a partir de la hoja de ruda (*Ruta graveolens*), evaluado en las soluciones obtenidas tanto con el método Soxhlet modificado como con el método de infusión.

Los extractos vegetales obtenidos a partir de hoja de saúco, flor de saúco y flor de ruda, no inhibieron el crecimiento del hongo *Sclerotium cepivorum In Vitro*.

La concentración óptima de inhibición del extracto obtenido en N-hexano por medio del método Soxhlet modificado, fue de 1:12 p/v (hoja seca: solvente), diluida en proporción 16:1:3 (extracto:tween 20%:agua). Al evaluar el extracto de la hoja de ruda, se encontró una concentración óptima de inhibición, en proporción 1:6 p/v (hoja fresca: agua).

El método Soxhlet modificado, desarrollado en ésta investigación, excluye del proceso estándar el paso del secado, permitiendo obtener un extracto líquido de utilidad en las pruebas de inhibición y de porcentaje de germinación, en la evaluación de extractos vegetales como alternativa de biocontrol.

El hecho de que la infusión en agua de hoja de ruda 1:6 p/v haya sido la única muestra que presentó un resultado en la germinación de esclerocios menor al 100% resulta importante, debido a que supera la inhibición producida al realizar el ensayo con el extracto de ruda en N-hexano, permitiendo concluir que es posible inhibir el crecimiento de *Sclerotium cepivorum* por medio de la aplicación de extractos vegetales obtenidos de forma “artesanal”, que funcionan como biocontroladores a nivel de campo sin producir un efecto nocivo sobre cultivos de cebolla de bulbo afectados por la pudrición blanca.

Como alternativa de control, se podrían emplear los extractos vegetales de ruda en cultivos de cebolla de bulbo, con el fin de disminuir la germinación de *Sclerotium cepivorum In Vivo* si se realizara una periódica y continua aspersión, teniendo en cuenta los días de retraso observados en la germinación de esclerocios, que generó este extracto.

BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G.N. (1996). Fitopatología. 2ª ed. México: Uthea. p. 513-515.

Aguirre, E, Menjivar F, J C., Piraneque G., N. V. (2006), Relación entre la nutrición mineral y la severidad del daño ocasionado por pudrición blanca en cebolla de bulbo. Acta Agronómica. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

Alvear, Z. et al. (2006). Efecto de la cero labranza sobre algunas actividades biológicas en un alfisol del sur de Chile. Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal, 2.

Atlas, R. y Bartha, R. (2002). Ecología microbiana y micorbiología ambiental. 4 ed. Madrid: Addison Wesley. 279-323

Ayala, H. (1983). Influencia de la materia orgánica sobre *Sclerotium cepivorum* Berk y *Ditylenchus dipsaci* en ajo y su posible interacción entre los dos patógenos. (Tesis de grado de Agronomía). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Caro, J. (2008). Caracterización fisiológica de aislamientos del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* de suelos con cultivo de cebolla de bulbo (*Allium Cepa* L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Castillo Morales, N. H. (2000). Aislamiento, identificación y selección de potenciales hongos antagonistas al hongo *Sclerotium cepivorum* BERK causante de la pudrición blanca de la cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.). (Trabajo de grado Ingeniero agrónomo). Tunja: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Agronomía.

Centro Urpa, Ministerio de Agricultura, Gobernación de Boyacá. (2003). Evaluación y diagnóstico agrícola de cultivos. Tunja: Secretaria de Agricultura.

Cerón, L. y Melgarejo L. (2005). Elementos de la actividad enzimática. Acta Biológica Colombiana, 2, 18-25

Cerón, L. y Melgarejo L. (2006). Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. *Acta Biológica Colombiana*, 10 (1), 5-16

Clarkson, J. P. (2002). Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Horticulture research international*, Wellesbourne Warwick,

Clarkson, J., Mead, A., Payne, T. y Whipps, M. (2004). Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathology*. 53, 353-362.

Coley Smith, J. R. (1990). White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. *Plant Pathology*, 39: 214-222

Corpoica. (2002). *Hortalizas Productividad y mercado*. Centro de Investigación Tibaitatá. Mosquera.

Crowe, F. J. (1995). White rot. En: H.F. Schwartz y S.K. Mohan (eds.). *Compendium of onion and garlic diseases*. (p. 14-16). Minnesota: APS Press.

Crowe, F. J., Hall, D. H. (1980). Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology*. 70, 74-78.

Dhingra, O y Sinclair, J. (1987). *Basic Plant Pathology Methods*. CRC. Florida. p. 76-77.

Ducón, J. Urbano, E., (2008). Evaluación de la actividad enzimática de suelo bajo condiciones de cultivos de cebolla de bulbo (*Allium Cepa* L.) En la zona de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá.). Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Ethur, L.Z., et al. (2005). Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 127-133

Galli, F., Torres de Carvalho, P., Tokeshi, H., Balmer, E., Kimati, H., Nogueira, C., et al. (1980). Manual de fitopatología: doenças das plantas cultivadas. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. v. 2. p. 57-58.

Gamba, Z. y Ramos, J. (2007). Evaluación de extractos vegetales en el modelos *Sclerotium cepivorum*- *Allium cepa* a nivel In Vitro. Tunja: Universidad de Boyacá. Facultad Ciencias de la Salud.

Gilchrist - Saavedra, L. (2005) Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada.. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 2 ed. Mexico. p. 78.

Granados, M. (2005). Aislamiento e identificación de hongos asociados a Esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, causante de la pudrición Blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 29 (1), 57-66.

Granados, M. (b) (2005). Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. *Agronomía Costarricense*, 29 (2), 143-156

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).1992. Fertilización en diversos cultivos. Quinta aproximación. Manual de Asistencia Técnica, 25. Centro de investigaciones Tibaitatá. Colombia. 56.

Jaramillo, J., Palacios, Y. y Osorio, J. (1996). Aspectos generales de la producción de ajo y cebollas. En López Ávila. Cultivo de ajo y las cebollas en Colombia. Santafé de Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario ICA.

Knight, T., et al. (2004). Department of Crop and Soil Science: Soil Enzyme Stability as an Ecosystem Indicator. Oregon State University. 25

Koneman, E. y Glenn, R. (1994). Micología, práctica de laboratorio. 4 ed. Bogotá: Panamericana.

López, A. y Ávila, M. (1996). Manejo fitosanitario del ajo y las cebollas. Santafé de Bogotá: ICA.

Melo, L. et al. (2000). Competitividad del sistema agroalimentario de la cebolla de bulbo con enfoque de cadena productiva en el distrito de riego del Alto Chicamocha (Boyacá). *Economía y desarrollo rural*. 10

Melo, L. I., Melo, M. M. y Rodríguez L. F. (1998). Memorias sociedad colombiana de la ciencia del suelo. Papel de los microorganismos fijadores de nitrógeno en el manejo sostenible de la productividad de los suelos. Tunja: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

Mesen, R. (1997). Efecto de tres sistemas de labranza y una enmienda sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y el manejo de la pudrición blanca cebolla en Costa Rica. (Tesis Mag. Sc.) San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.

Microsoft Corporation. (2008). Biblioteca de Consulta Microsoft ® Encarta. [CD ROM]. El Autor.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2005). *La cadena de cultivos ecológicos en Colombia*. Recuperado de. http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/20051121601_caracterizacion_ecologicos.pdf

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2007). Noticias: Más de \$6.500 millones invertidos en distrito de “Usochicamocha” en Boyacá.

Ministerio de Agricultura. Programa nacional de transferencia de tecnología agropecuaria. (2002). El cultivo de la cebolla cabeza blanca. Bogotá: el Ministerio.

Montañez, Y. & Aragón D. (2009). Evaluación de *Thichoderma sp* y *Clonostachys rosea* como posibles biocontroladores del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla de bulbo *Allium cepa* L. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia

Moore-Landecker, E. (1996). *Fundamentals of the Fungi*. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall.

Morandi, M. A. (2001). *Phytoparasitica. Development of Clonostachys rosea and Interacciones with Btrytis cinerea in Rose Leaves and Residues*.

Orecchia, E., Yossen, V., Cragnolini, C., Conles, M., Ruosi, G. y Daghero. (2003). “Estudio de epidemias producidas por la podredumbre blanca del ajo y la cebolla (*Sclerotium cepivorum* Berk.) en la provincia de Córdoba” Proyecto frutihortícola: Tecnologías para el desarrollo sustentable nacional. Boletín. 5.

Pacheco, M. C., Rodríguez, L. F., Bermúdez, L. T. (2006). Plan estratégico de mercadeo para la cadena hortícola en el Distrito de riego del Alto Chicamocha. *Agro. Colombiana*. 24 (1).

Pascual y Villalobos, M.J. (1996). Plaguicidas naturales de origen vegetal: Estado actual de la investigación. Madrid, España: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria Alimentaria. Ministerio de Agricultura y Alimentación.

Ponce, V. et al. (2008). Análisis temporal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*) de la cebolla *Allium cepa* L) bajo tres niveles de inóculo del patógeno. *Agrociencia* 42 (1), 71-83.

Punja, Z. y Rahe, J. (1992). *Sclerotium*. En *Methods for research on soil borne phythopathogenic fungi*, p. 171-175. Minnesota: APS Press.

Quevedo, L. (2008). Evaluación de grupos fisiológicos de microorganismos celulolíticos, nitrificantes, proteolíticos y solubilizadores de fosfato presentes en suelos cultivados con cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) En el área de influencia del distrito de riego del Alto Chicamocha – Boyacá. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Ramírez, L., (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales de ruda (*Ruta graveolens*) y saúco (*Sambucus nigra*) sobre *Sclerotium cepivorum*, fitopatógeno de cultivos de cebolla de bulbo del Distrito de Riego del Alto Chicamocha. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.

Rossel, D. y Tarradellas, J. (2006). Dehydrogenase activity of soil microflora: Significance in ecotoxicological tests. *Environmental Toxicology & Water Quality*. 6, 17-33

Sánchez, C., Bernal, D., Russi, A., y Gamboa, R. (2007). Evaluación de microorganismos para el tratamiento y producción de semillas y plántulas de cebolla de bulbo *Allium cepa* L. Informe final de investigación presentado ante el comité de investigaciones y currículo de la facultad de ciencias e ingeniería. Tunja: Centro de Investigaciones para el Desarrollo – CIPADE. Universidad de Boyacá

Sánchez, J., Zavaleta, M. (2000). Pathogenicity of four Mexican isolates of *Sclerotium cepivorum* Berk to three cultivars of garlic (*Allium sativum* L.). Instituto de Ciencias Agrarias.

Schinner, F. (1996). *Methods in Soil Biology*. Springer, 7-10.

Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P., y Zuberer, D. (2005). *Principles and Applications of Soil Microbiology*. New Jersey: Pearson-Prentice Hall. 640 p. ISBN 0-13-094117-4.

Tabatabai, M. (1994). Microbiological and Biochemical Properties: Soil Enzymes. *Methods of Soil Analysis*. 5, 775-833

Este libro se terminó de imprimir
en el mes de abril de 2015 en
PANAMERICANA Formas e Impresos S.A.