UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN ECOFISIOLÓGICA DE PLANTAS JUVENILES DE AGUACATE 'HASS' (*persea americana* VAR. 'HASS') BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE LUZ SOLAR

Fabián Giovanny Márquez Niño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Maestría en Ciencias – Biología
2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN ECOFISIOLÓGICA DE PLANTAS JUVENILES DE AGUACATE 'HASS' (*persea americana* VAR. 'HASS') BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE LUZ SOLAR

Fabián Giovanny Márquez Niño

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar el título de:

Magister en Ciencias-Biología

Directora:

Ph.D., Luz Marina Melgarejo

Asesores:

Ph.D., Fagua Alvarez

Linea de investigación:

Fisiología del estrés en plantas - Ecofisiología

Grupo de Investigación:

Fisiología del estrés y Biodiversidad en plantas y microorganismos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2017

Con amor a mi madre y a mi compañera; a todos los que me apoyaron en este viaje a través del conocimiento…

"El verdadero genio es quien sabe vivir su tiempo…"

Agradecimientos

Al proyecto 1 "*Ecofisiología, nutrición mineral y manejo integrado de plagas y enfermedades en aguacate, curuba, gulupa y tomate de árbol orientados hacia su manejo agronómico, como materia prima para el desarrollo de productos de interés comercial*", de la Red Nacional para la bioprospección de frutos tropicales, financiado por el Departamento Administrativo de Ciencias, Tecnología e Innovación - COLCIENCIAS, y ejecutado por la Universidad Nacional de Colombia. Código: 110154332012; contrato 459/2013.

A mi compañera sentimental por su apoyo amoroso e incondicional.

A mi directora de tesis Luz Marina Melgarejo y a la profesora Fagua Alvarez, por sus orientaciones, enseñanzas y apoyo. A don Pedro Rico y doña Carolina por el apoyo logístico y brindarme el espacio físico para desarrollar mi proyecto.

A Luis Fernando Jiménez por su apoyo en trámites burocrático.

A todos mis compañeros de la red RIFRUTBIO y del laboratorio de Fisiología vegetal por brindarme todo su apoyo, compañía, amistad y consejo.

Resumen

Se evaluó el efecto de distintos niveles de radiación solar en plantas juveniles de aguacate 'Hass' a partir de sombras artificiales en un ensayo controlado y sombras naturales en un cultivo mixto en Pasca (Cundinamarca, Colombia). Se analizaron variables fisiológicas como la tasa de asimilación de CO_2, tasa transpiratoria y resistencia estomática relacionadas con intercambio gaseoso; adicionalmente se hicieron curvas rápidas de respuesta a la luz (RLCs) y curvas de quenching no fotoquímico (NPQ), mediante mediciones de la fluorescencia de la clorofila. Se caracterizó la respuesta morfológica y anatómica de las plantas, a partir de la realización de cortes transversales de hojas y mediciones de crecimiento *in vivo*. Se encontraron diferencias fisiológicas, anatómicas y morfológicas en las plantas expuestas a distintos niveles de radiación solar.

Las plantas sometidas a 50% de radiación solar, presentaron menor tasa de transferencia de electrones máxima (ETR_{max}) y un consecuente incremento en la disipación de la energía por la vía no fotoquímica. A nivel estomático las plantas bajo los tratamientos de radiación solar de 65% y 50% presentaron menor resistencia estomática en comparación con las plantas expuestas a radiación solar total. En cuanto a la morfología de las plantas, el tratamiento con menor radiación solar promovió el crecimiento en altura y el desarrollo frondoso del dosel.

En cultivo mixto se encontró relación entre la apertura del dosel y la intensidad lumínica, evidenciándose condiciones diferenciales de radiación solar. Se encontró relación entre las variables fisiológicas evaluadas y los niveles de radiación solar diferencial de las plantas evaluadas, presentándose correlaciones positivas entre ETR y dichos niveles de radiación solar. Las variables fisiológicas evaluadas permiten proponer que las plantas juveniles de aguacate 'Hass' tienen características de plantas facultativas para crecer en bajas radiaciones solares.

Palabras clave: Fotosíntesis, radiación solar, plantas de luz, plantas de sombra, facultativa, anatomía.

Abstract

The effect of different levels of solar radiation on juvenile 'Hass' avocado plants was evaluated from artificial shadows in a controlled experiment and natural shadows in a mixed crop in Pasca (Cundinamarca, Colombia). Physiological variables such as the rate of CO_2 assimilation, transpiration and stomatal resistance related to gas exchange were evaluated; Rapid light response curves (RLCs) and non-photochemical quenching curves (NPQ) were also made by measurements of chlorophyll fluorescence. The morphological and anatomical response of the plants was characterized by cross - sectioning of leaves and in vivo growth measurements. Physiological, anatomical and morphological differences were found in plants exposed to different levels of solar radiation.

Plants submitted to 50% solar radiation presented lower values of maximal rate of electron transference (ETR_{max}) and a consequent increase in energy dissipation by the non-photochemical pathway. At stomatal level plants under 65% and 50% solar radiation treatments had less stomatal resistance compared to plants exposed to total solar radiation. As for the morphology of the plants, the treatment with less solar radiation promoted the growth in height and the leafy development of the canopy. A relationship was found between the opening of the canopy and the light intensity, showing differential conditions of solar radiation given the establishment of the plants as a mixed crop. It was found a relationship between the physiological variables evaluated and the levels of solar radiation of the evaluated plants with positive correlations between ETR and solar radiation levels. Assessed physiological variables suggest that 'Hass' avocado young plants has characteristics of facultative plant to growth under little sun light.

Keywords: Photosynthesis, solar radiation, sun plants, shade plants, anatomy.

Contenido

Pág.

Resumen ..... - 7 -

Abstract ..... - 8 -

Lista de figuras ..... - 11 -

Lista de Tablas ..... - 16 -

Lista de símbolos y abreviaturas ..... - 17 -

INTRODUCCIÓN ..... - 19 -

1. CAPÍTULO 1: EFECTO DE TRATAMIENTOS DE RADIACIÓN SOLAR SOBRE PLANTAS JUVENILES DE AGUACATE 'HASS' UTILIZANDO SOMBRAS ARTIFICIALES ..... - 22 -

1.1 Introducción ..... - 22 -

1.2 Materiales y métodos ..... - 24 -

1.2.1 Área de estudio y material vegetal ..... - 24 -

1.2.2 Caracterización ambiental ..... - 24 -

1.2.3 Intercambio Gaseoso ..... - 25 -

1.2.4 Curvas de respuesta a luz mediante metodología de la fluorescencia de la clorofila (curvas RLC) y curvas de quenching no fotoquímico (curvas NPQ). ..- 25 -

1.2.5 Características anatómicas ..... - 25 -

1.2.6 Contenido de pigmentos ..... - 26 -

1.2.7 Caracterización morfológica ..... - 27 -

1.2.8 Análisis estadístico ..... - 27 -

1.3 Resultados ..... - 28 -

1.3.1 Caracterización ambiental ..... - 28 -

1.3.2 Intercambio gaseoso ..... - 29 -

1.3.3 Curvas rápidas de luz (RLCs) y de quenching no fotoquímico (NPQ) ..... - 31 -

1.3.4 Características anatómicas ..... - 33 -

1.3.5 Contenido de pigmentos ..... - 38 -

1.3.6 Caracterización morfológica ..... - 42 -

1.4 Discusión ..... - 44 -

1.5 Conclusiones ..... - 50 -

2. CAPÍTULO 2: EFECTO DEL SOMBRÍO NATURAL EN PLANTAS DE AGUACATE EN UN SISTEMA DE CULTIVO MIXTO DE CAFÉ, AGUACATE Y BANANO ..... - 52 -
2.1 Introducción ..... - 52 -
2.2 Materiales y métodos ..... - 54 -
2.2.1 Área de estudio y material vegetal ..... - 54 -
2.2.2 Caracterización ambiental ..... - 55 -
2.2.3 Intercambio gaseoso ..... - 55 -
2.2.4 Fluorescencia de la Clorofila ..... - 55 -
2.2.5 Métodos estadísticos ..... - 55 -
2.3 Resultados ..... - 55 -
2.3.1 Cobertura del dosel ..... - 55 -
2.3.2 Intercambio gaseoso ..... - 57 -
2.3.3 Fluorescencia de la clorofila ..... - 59 -
2.3.4 Relaciones entre las condiciones de iluminación y las variables fisiológicas . - 62 -
2.4 Discusión ..... - 63 -
2.5 Conclusiones ..... - 65 -
3. Conclusiones y recomendaciones ..... - 66 -
4. Bibliografía ..... - 67 -

Lista de figuras

Figura 1-1: Promedios de temperatura (ºC), Humedad relativa (%), PAR (µmol/m^2.s), d) Precipitación (mm) y déficit de presión de vapor (DPV). Datos tomados en parcela experimental de *Persea americana* Var. Hass, en la vereda San Pablo del municipio de Pasca, Cundinamarca; año 2016.

Figura 1-2: Transpiración, resistencia estomática y temperatura de la hoja, en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de luz solar. Datos obtenidos a los seis meses después de iniciado tratamiento Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey).

Figura 1-3: Curva rápida de respuesta a luz (RLC) en plantas juveniles de Aguacate ´Hass´ bajo tres condiciones de radiación solar. Los valores de ETR se calcularon como promedio de cinco réplicas. Se realizó en plantas de nueve meses después de iniciado tratamiento.

Figura 1-4: Quenching no fotoquímico (NPQ) en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres condiciones de radiación solar. Los valores de NPQ se calcularon como promedio de cinco réplicas. Se realizó en plantas de nueve meses después de iniciado tratamiento.

Figura 1-5: Estomas y células epidérmicas de hojas de *Persea americana* Var. Hass, bajo tres condiciones de luminosidad. a) 100 % de radiación solar, b) 65% de radiación solar, c) 50 % de radiación solar. Los datos fueron tomados 10 meses después de iniciado tratamiento. Aumento de 100 X.

Figura 1-6: Densidad estomática (DE) de plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de luz. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Se realizó determinación en plantas de 10 meses después de iniciado tratamiento.

Figura 1-7: Corte transversal de hojas de *Persea americana* Var. Hass. Ae= Aerénquima; Hv=Haz vascular. Se realizó toma de muestra en plantas 10 meses después de iniciado tratamiento. Aumento de 40 X.

Figura 1-8: Cortes transversales de hojas de *Persea americana* Var. Hass bajo tratamientos de radiación solar. A) 65 % de radiación solar, B) 100 % de radiación solar, C) 50 % de radiación solar. Las fotos fueron tomadas con un aumento de 40 X. Muestras tomadas a 10 meses después de iniciado tratamiento.

Figura 1-9: Regresión lineal entre unidades SPAD y contenido de clorofilas totales (Chlo total) de plantas juveniles de aguacate ´Hass´. Los datos se ajustaron a la recta chlo totales= -0.156188+0.0209406*SPAD, con un R^2 de 79.43%.

Figura 1-10: Contenido de clorofilas totales estimado a partir de unidades SPAD en plantas juveniles de Aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de radiación solar. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Datos obtenidos a partir de plantas de 10 meses después de iniciar tratamiento.

Figura 1-11: Contenido de carotenoides de plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de sombra. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Datos obtenidos a partir de plantas de 10 meses después de iniciar tratamiento.

Figura 1-12: Contenido de clorofila a, clorofila b, relación clorofila a/ clorofila b y clorofilas totales en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de radiación solar. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Datos obtenidos a partir de plantas de 10 meses después de iniciar tratamiento.

Figura 1-13: Altura de plantas juveniles de Aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de radiación solar. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Datos obtenidos a partir de plantas de 12 meses después de iniciar tratamiento.

Figura 1-14: Área foliar específica (AFE) de plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de radiación solar. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Los datos fueron tomados en plantas de 12 meses después de iniciado tratamiento.

Figura 1-15: Porcentaje de cobertura foliar (PCF) de plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de radiación solar. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Datos obtenidos a partir de plantas de 12 meses después de iniciar tratamiento.

Figura 2-1: Canopy openess (grado de apertura de dosel) sobre plantas juveniles de aguacate ´Hass´ 26 meses después de transplante, en cultivo mixto. Se muestran fotografías hemisféricas tomadas sobre tres plantas de aguacate y se evidencian distintas condiciones de luminosidad. Las fotografías fueron analizadas mediante el programa Gap Analyzer.

Figura 2-2: Relación entre radiación PAR y Canopy openess sobre plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos de iluminancia fueron tomados el 20 de Enero de 2016 y su correspondientes valores de radiación PAR. Coeficiente de correlación de SPEARMAN de 0.94.

Figura 2-3: Tasa de asimilación de CO_2 en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados en plantas de 15 meses después del transplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

Figura 2-4: Conductancia estomática (gs) en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados en plantas de 15 meses después del transplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

Figura 2-5: Tasa de transpiración en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados en plantas de 15 meses después del transplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

Figura 2-6: Rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (Fv/Fm) en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados en plantas de

26 meses después del transplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

Figura 2-7: Tasa de transporte de electrones (ETR) en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados en plantas de 15 meses después del transplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

Figura 2-8: Rendimiento cuántico operacional del fotosistema II (ϕPSII) en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados en plantas de 15 meses después del transplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

Lista de Tablas

Tabla 1: Parámetros obtenidos mediante regresión no lineal para curvas RLCs, en plantas juveniles de Aguacate ´Hass´ bajo tres condiciones de radiación solar. Los datos se ajustaron al modelo $ETR=PAR/((a*PAR^2)+(b*PAR)+c)$ y se calcularon los parámetros mediante las ecuaciones $\alpha=1/c$, $ETR_{max}=1/(b+(2*(a.c)^{1/2}))$, $Ik=c/(b+(2*(a.c)^{1/2}))$.

Tabla 2: Grosor de las distintas capas de tejidos en **c**ortes transversales de hojas de *Persea americana* Var. Hass. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Epidermis superior (ES), Primera capa de parénquima en empalizada (PZI), Segunda capa de parénquima en empalizada (PZII), parénquima esponjoso (PES), epidermis inferior (EI), grosor de la lámina foliar (GL).

Tabla 2-1: Coeficientes de correlación de Spearman para las distintas variables ecofisiológicas en relación con la apertura del dosel en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Las negrillas indican los valores de Rho más altos.

Tabla 2-2: Coeficientes de correlación de Spearman para las distintas variables ecofisiológicas en relación con la radiación PAR en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Las negrillas indican los valores de Rho más altos.

Lista de símbolos y abreviaturas

HR	Humedad relativa de la atmósfera
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
DPV	Déficit de presión de vapor de la atmósfera
E	Tasa de transpiración de las hojas
gs	Conductancia estomática de las hojas
RLC	Curva de respuesta rápida a luz
ETR	Tasa de trasferencia de electrones
NPQ	Quenching no fotoquímico
FV/Fm	Rendimiento cuántico potencial del fotosistema II
ϕPSII	Rendimiento cuántico operacional del fotosistema II
SPAD	Unidades SPAD
DE	Densidad estomática
AFE	Área foliar específica
AB	Cara abaxial de la hoja
AD	Cara adaxial de la hoja
EI	Epidermis inferir
ES	Epidermis superior
PQ	Parénquima
HV	Haz vascular
PZI	Primera capa de parénquima en empalizada
PZII	Segunda capa de parénquima en empalizada
CL	Esclerénquima
FL	Floema
XL	Xilema
PCF	Porcentaje de cobertura foliar

INTRODUCCIÓN

Uno de los puntos clave para cumplir con los propósitos de una agricultura productiva es el conocimiento del comportamiento fisiológico y la identificación de condiciones ambientales óptimas que permitan obtener rendimientos competitivos. El intento de cultivar una especie frutícola de alta calidad en un sitio no apto ecofisiológicamente aumenta los costos de producción y reduce las posibilidades de tener éxito económico (Fischer y Orduz-Rodríguez, 2012). Las condiciones ambientales, como la disponibilidad de agua, temperatura y radiación solar incidente, afectan el establecimiento y el rendimiento de un cultivo. Particularmente, las características de la radiación solar que llega a un determinado lugar influyen en numerosos procesos fisiológicos, morfogenéticos y reproductivos de las plantas (Valladares, 2006), entre ellos la actividad fotosintética, la que depende directamente de las características de la luz incidente. En las plantas leñosas que crecen de forma natural, la radiación y el estrés hídrico son, comúnmente, los factores ambientales que tienen mayor impacto en el crecimiento y el desarrollo (Van Schaik et al., 1993; Whiley, 1994); sin embargo, en los árboles frutales domesticados, la temperatura es también un factor decisivo (Sedgley y Grant, 1983; Whiley y Winston, 1987; Issarakraisila y Considine, 1994; Whiley, 1994). Así mismo, son varios los factores ambientales que influyen en los procesos fisiológicos de las plantas, por lo tanto es importante caracterizar la fisiología de la planta en función de las variables ambientales. Los estudios ecofisiológicos pueden determinar las condiciones más adecuadas para el desarrollo de un cultivo (Solarte et al., 2010), a su vez, se puede decir que, la ecofisiología es un indicador de la adaptación de la planta a las condiciones climáticas (Reigosa y Pedrol, 2003).

El aguacate *(Persea americana* Mill.) es nativo de América Central y hoy en día es un cultivo de importancia económica en más de 70 países; entre ellos México, Israel, Estados Unidos, Chile y Sudáfrica (Romero, 2012). *P. americana*, es una planta perenne de la cual se distinguen distintas variedades, estas variedades provienen de tres razas ecológicas, las cuales se conocen como: drymifolia (mexicana), guatemalensis (guatemalteca) y americana (antillana) (Saavedra et al., 2012). Dentro de la raza Guatemalteca se destaca la variedad Hass, la cual es la más consumida en el ámbito

mundial (Cossio et al., 2011), debido a su alto rendimiento. Aunque la variedad 'Hass' en su mayoría es raza Guatemalteca, presenta 10 a 15 % de raza mexicana, esta raza se obtuvo mediante mutación espontánea seleccionada por Rudolph G. Hass en Habra Heights (California) en 1935 y patentado en 1937; se adapta desde 1.200 hasta 2.300 msnm (Saavedra et al., 2012). El aguacate cv. Hass en Colombia parece presentar buenas características organolépticas y en el país se han registrado rendimientos muy elevados, lo que representa una ventaja competitiva para el mercado internacional (Bernal, 2016).

Las tres principales razas de *P. americana*, se originaron en distintos puntos geográficos, y así mismo, en condiciones ecológicas diferentes. Los aguacates de la raza Antillana, se cree tienen como origen principal las costas occidentales de El Salvador y Costa Rica (Storey et al., 1987), son árboles grandes, de hasta 30 m de alto, de bosques de tierras bajas, calientes, húmedas y con un corto período de sequía (Wolstenholme y Whiley, 1999.) Por otro lado, los aguacates Guatemaltecos, se originaron en tierras altas de América central, principalmente Guatemala, hacia la región sur (más tropical), en lugares con alturas relativamente altas, frías y húmedas, lo que se conoce como climas de "alta montaña tropicales" (Wolstenholme y Whiley, 1999). Los aguacates de raza guatemalteca están adaptados a las montañas tropicales o climas subtropicales húmedos (Woltenholme, 1977; Bower et al., 1977) y tienen la reputación de ser particularmente sensibles al estrés por calor (Bower et al., 1977). Así mismo, debido a la alta densidad y vigor de los flujos de crecimiento vegetativo, el manejo inadecuado de la copa, puede causar en árboles de gran porte, un alto sombreamiento interno (Bernal, 2017). En cuanto a las condiciones óptimas para el desarrollo del cultivo, se requieren suelos con buen drenaje, ya que tal como ocurre con otras Lauraceae, las plantas de aguacate son susceptibles a la pudrición radical. Son ideales los suelos franco arenosos, con bajos contenidos de arcillas. Para el caso del 'Hass', se adapta bien a temperaturas promedio de 16 a 18 ºC (Saavedra et al., 2012), dando buenas producciones hasta los 2.200 msnm, donde otras variedades como Lorena ya no son productivas. En zonas con precipitación entre 1.400 y 1.800 mm al año, bien repartidas con periodos de sequía que no excedan los 20 días, el cultivo presenta una muy buena expresión biológica (Saavedra et al., 2012).

La disponibilidad de luz incidente es el factor que, probablemente, ejerce la mayor influencia sobre la fotosíntesis en un huerto frutal (Gandolfo, 2008); según esta disponibilidad, se pueden calificar las plantas en especies demandantes de luz y especies tolerantes a la sombra. Las plántulas de especies pioneras o demandantes de luz pueden sobrevivir y crecer sólo baja alta iluminación; mientras que las semillas de las especies tolerantes a la sombra pueden sobrevivir bajo sombra profunda (Augspurger, 1984; Kitajima, 1994; Hanba et al., 2002). Así mismo, la morfología, anatomía de las hojas y la bioquímica de la fotosíntesis son aspectos fundamentales de la aclimatación de las plantas a altos niveles de luz (Hanba et al., 2002).

Es común encontrar en los manuales prácticos para el manejo del aguacate, la afirmación de que el aguacate es una especie heliófila y que la sombra puede tener un efecto de disminución de la producción. Si hay poca luminosidad se presenta bajo rendimiento, reportándose reducción de la producción de hasta un 35% (Cerdas et al., 2006), aunque la fruta puede ser de mayor tamaño. Cuando la iluminación está por debajo su óptimo, el crecimiento vegetativo se reduce, tanto en número como en longitud de los brotes, así como en el tamaño de las hojas, resultando en un menor desarrollo del árbol y una menor actividad fotosintética (Gandolfo, 2008). En Colombia son de uso común los arreglos de siembra de grandes distancias como 10 x10 m, para asegurar una alta radiación solar en el cultivo. Sin embargo, no se sabe si esta condición heliófila aplique para todos los estados fenológicos, o si lo es sólo en estados de producción, presentándose etapas en las que la sombra pueda resultar benéfica. Posiblemente el aguacate presenta características de planta facultativa y no de heliófila estrictamente hablando. En estudios realizados en plantas de caucho establecidas dentro de sistemas tradicionales de cultivo mixto, en los que las plantas están sometidas a sombra durante la primera etapa del establecimiento, se ha propuesto que las plantas jóvenes se benefician de la sombra, posiblemente como resultado de la reducción de estrés por alta temperatura o de la disminución de la inhibición de la fotosíntesis inducida por luz (Rodrigo et al. 1997; 2001).

El presente estudio tuvo como objetivo analizar la respuesta fisiológica de plantas juveniles de aguacate ‘Hass’ bajo diferentes condiciones de radiación solar en el

municipio de Pasca Cundinamarca, se realizó un ensayo controlado y uno en condiciones de cultivo mixto para evaluar el efecto de las condiciones diferenciales de luz en los dos casos.

1. CAPÍTULO 1: EFECTO DE TRATAMIENTOS DE RADIACIÓN SOLAR SOBRE PLANTAS JUVENILES DE AGUACATE 'HASS' UTILIZANDO SOMBRAS ARTIFICIALES

1.1 Introducción

El aguacate presenta un ciclo de vida de hojas que se considera rápido; es un árbol no caducifolio, con una longevidad foliar de 10 a 12 meses en Australia y Suráfrica (Wolstenholme y Whiley, 1999), éste es un ciclo de vida de hojas relativamente corto comparado con otros árboles frutales no caducifolios como cítricos y mango (Whiley y Schaffer, 1994; Mandemaker, 2007). Durante el desarrollo foliar, las hojas pueden encontrarse bajo condiciones diferenciales de iluminación dada su posición en el dosel, lo que le proporciona características de hojas de sombra. Hojas de plantas de aguacate en posición de sombra y muchas de otros árboles tropicales poseen dos ciclos de xantofilas (ciclo de zeaxantina-violaxantina y ciclo de luteína epóxido) con propiedades cinéticas distintivas que potencian la protección y promueven la eficiencia del cosechamiento de luz bajo sombra (Matsubara et al. 2007, Matsubara et al. 2008, Matsubara et al. 2009; Husein et al 2013). Hojas viejas en alto grado de sombreamiento en el interior del dosel de árboles de aguacate contienen altas concentraciones de luteína epóxido (Lx) sobre una base de clorofila ([Lx]), comparable o más grande que la concentración de violaxantina ([V]) y hojas de sol que contienen cerca del doble de la concentración de luteína ([L]) de las hojas de sombra excediendo sustancialmente la suma de violaxantina, anteraxantina, zeaxantina [V + A + Z] al medio día (Matsubara et al., 2005). La deepoxidación en los ciclos de Lx y V del aguacate generan $NPQ_{\Delta LAZ}$ y no solo el $NPQ_{\Delta AZ}$ de especies con solo ciclo de V (Husen et al., 2013).

Se ha reportado fotoinhibición en plantas de aguacate en la región oriental de Australia, durante los meses de invierno (Whiley y Schaffer, 1994; Bertling y Cowan, 1998), lo que indica un efecto adverso por la alta radiación. Schaffer y Whiley (2003), además indicaron que la fotoinhibición en hojas de aguacate debido a las bajas temperaturas y alta radiación, puede ser rápidamente determinada usando técnicas de fluorescencia de la clorofila. Adicionalmente, Bertling y Cowan (1998) propusieron que potencialmente se puede presentar fotoinhibición bajo altas temperaturas durante los meses de verano en Suráfrica, en donde comúnmente se encuentran grandes fluctuaciones de temperatura y alta radiación solar.

Las hojas de aguacate han sido consideradas como hojas de sombra debido a su bajo punto de saturación por luz, de cerca del 20 al 33% de la luz solar total (Whiley y Schaffer, 1994); sin embargo, esos estudios fueron realizados sobre plantas en contenedores. Estudios con árboles en cultivo sugieren que el punto de saturación por luz puede ser mucho mayor, aproximadamente 1100 µmol m^{-2} s^{-1} o cerca del 50% de la luz solar total (Wolstenholme y Whiley, 1999). Wolstenhome y Whiley (1999) han caracterizado las hojas de aguacate como poco “sun-low stress” de acuerdo con la clasificación de Smith et al. (1989) y Mandemaker (2007), por lo que se podrían considerar como tolerantes a la sombra. A nivel anatómico y morfológico, las hojas son grandes, de lámina ancha, relativamente delgadas (menos de 400 µm) en su grosor, con una sola línea de parénquima en empalizada dispuesta horizontalmente y con un potencial fotosintético máximo de medio a bajo (Mandemaker, 2007).

Si bien, en un dosel bien conformado en plantas adultas las hojas internas poseen alto sombramiento en comparación con las hojas más externas, en plantas juveniles, donde el dosel no se ha conformado, la incidencia de la luz sobre las hojas no difiere en la misma intensidad como en plantas adultas, siendo más difícil la distinción entre hojas internas de sombra y externas de sol.

En este ensayo se evaluaron las características fisiológicas, anatómicas y morfológicas de plantas juveniles de aguacate ‘Hass’ expuestas a tres tratamientos de luz solar mediante polisombras artificial.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Área de estudio y material vegetal

Se realizó el montaje de una parcela experimental en la finca Buena Vista en la vereda San Pablo del municipio de Pasca, a una altitud de 1.860 msnm y coordenadas 4°18´95´´N 74°20´31.9´´W. Se seleccionaron 30 plantas juveniles de aguacate 'Hass' de aproximadamente un mes de edad, e injertadas sobre un patrón criollo en un vivero certificado de la región, éstas se trasplantaron en bolsas plásticas para palma de 385 cm^3 de volumen, con una mezcla de suelo de la región y cascarilla de arroz, en proporción 3:1, así se aseguró la homogeneidad de las condiciones del suelo entre las distintas unidades experimentales. Las bolsas se distribuyeron con un arreglo de 1.5 x 1.5 m de distancia, en la parcela experimental, con un área de 429 m^2. Se realizó análisis del suelo y se estableció un plan de fertilización para las plantas, se aseguró la sanidad de las plantas siguiendo las recomendaciones de Buenas Prácticas Agrícolas para el cultivo de aguacate 'Hass'.

El experimento consistió en un diseño aleatorizado con un solo factor, que fue el porcentaje de luz solar incidente; los distintos niveles de radiación se alcanzaron mediante la instalación de polisombras comerciales de color negro, que se instalaron sobre las plantas, de esta forma los tres niveles del factor fueron, 100% de radiación solar (sin sombra), 65% y 50% de radiación solar, con un total de 10 plantas por tratamiento. Se tomaron datos de variables fisiológicas y de crecimiento, así como toma de muestras de hojas en cinco plantas por cada tratamiento; las hojas usadas en todos los muestreos fueron hojas del tercio medio, aproximadamente del entrenudo 15 de la rama principal, en estado de desarrollo completo (BBCH 19), completamente extendidas y sanas.

1.2.2 Caracterización ambiental

Se instaló una estación meteorológica marca Coltein en la zona y se registró a intervalos de 15 minutos durante todos los días de estudio la radiación fotosintéticamente activa (PAR), precipitación, humedad relativa y temperatura.

1.2.3 Intercambio Gaseoso

Se hicieron mediciones, en tres hojas por planta y cinco plantas por tratamiento, de temperatura de la hoja, humedad relativa, transpiración, radiación PAR y resistencia estomática usando un Porómetro Li-cor Li-1600. Se usaron hojas del tercio medio con un estado de desarrollo completo (estado BBCH 19), completamente extendidas y sanas, generadas en el último flujo de desarrollo vegetativo.

1.2.4 Curvas de respuesta a luz mediante metodología de la fluorescencia de la clorofila (curvas RLC) y curvas de quenching no fotoquímico (curvas NPQ).

Para las curvas RLC y NPQ se adaptaron hojas a oscuridad durante una hora a las 14:00 horas por condiciones meteorológicas y se usó un fluorómetro modulado (FMS2, Hansatech, King's Lynn, UK) siguiendo el protocolo del manual de operaciones del fluorómetro PAM-2500, edición 2008. Se midió el valor de Fo aplicando una luz tenue de 0.4 µmol $m^{-2}s^{-1}$ y se aplicó un pulso de luz saturante de (9.000 µmol $m^{-2}s^{-1}$) durante 0.8 segundos para registrar el valor de Fm (notación de Baker, 2008). Para construir la curva, se siguieron ciclos de aplicación de luz tenue, luz actínica y pulso de luz saturante para obtener los valores de Fs y Fm'. La luz actínica inicial fue de 300 µmol $m^{-2}s^{-1}$ durante 10 s y se fue incrementando en unidades de 300 µmol $m^{-2}s^{-1}$ hasta 1800, a partir de ese punto, se incrementó en unidades de 180 hasta 2160 y desde ese punto en unidades de 60 hasta 2340 µmol $m^{-2}s^{-1}$. El tiempo de duración de la curva fue de 396 s. Posterior a este punto, se estableció un tiempo de recuperación en oscuridad de 10 minutos, aplicando pulsos de luz saturante de 9.000 µmol $m^{-2}s^{-1}$ a los 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 600 segundos, para obtener valores de Fm' y así calcular NPQ.

1.2.5 Características anatómicas

Cuando las plantas completaron 11 meses de edad se tomaron muestras de hojas sanas y completamente expandidas (BBCH 19) del tercio medio de la planta y se almacenaron en una solución de FAA (10:5:85, Formol: ácido acético glacial: Etanol 70 %) por 48 horas, luego de las cuales se mantuvieron en EtOH al 70% durante tres días. Posteriormente, se trataron siguiendo los protocolos convencionales de Johansen (1940) modificados así: deshidratación en series de EtOH, 90 %, 96 %, 100 % y 100 % por 4 horas c/u, luego series de EtOH 100 %: agente aclarante Histochoice (90:10,

70:30, 50:50, 30:70, 10:90) por 4 horas c/u, y finalmente imbibición en parafina (paraplast plus, 60 ^{o}C) tres veces por 12 horas c/u. Se realizaron cortes transversales incluyendo el nervio central y parte de la lámina, en micrótomo de rotación (820 Spencer, American Optical Company, NY) y se fijaron en láminas de vidrio con aplicación del Adhesivo de Mayer (Ruzin, 1999). Las láminas se colocaron en horno a 60 ^{o}C por 24 horas, luego se desparafinaron mediante dos pasos por Xilol 100 %, EtOH 50: Xilol 50 por 3 minutos (dos veces), seguido por series de hidratación en EtOH 100%, 95 %, 70 %, 50 % y H_2O destilada por 2 minutos, y tinción con astra-blue acidificado (1g/100 mL de 2 % de ácido tartárico) por 10 minutos, seguido por un lavado en H_2O destilada por 2 minutos, y contratinción con fucsina básica etanólica (0.1 g/100 mL de etanol al 50%) por 20 minutos, y lavado en agua destilada por 15 segundos. Después de la tinción se realizaron series de deshidratación en EtOH (50%, 70 %, 95 %, 100 %, 100 %; 1 minuto c/u), y de etanol: Xilol (70:30, 50:50; 2 minutos c/u), xilol 100 % 2 veces por 3 minutos c/u. Al final se colocó citoresina sobre los portaobjetos, se montaron cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente por ocho días.

Los cortes se observaron en un microscopio Leica m205 con cámara acoplada, en el laboratorio de equipos ópticos del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, se identificaron los tejidos y se realizaron mediciones de grosor de epidermis superior, parénquima en empalizada, parénquima esponjoso y epidermis inferior mediante software acoplado al sistema de la cámara integrada del microscopio. Se estimó la densidad estomática tomando improntas con esmalte sobre cinco hojas por tratamiento, siguiendo la metodología reportada en Melgarejo *et al.* (2010). Se verificó si había presencia de estomas en ambas caras de las hojas. Se realizó estimación en la parte media marginal de las hojas, en cinco campos ópticos, ya que, según Morales *et al.* (1992) los estomas de plantas de aguacate están distribuidos uniformemente en la superficie abaxial.

1.2.6 Contenido de pigmentos

Se hizo una curva de calibración para unidades SPAD, para lo que se eligieron hojas de distintas edades para obtener un gradiente de color. En el laboratorio se obtuvieron 19 discos de muestra y se tomaron mediciones de unidades SPAD usando un SPAD meter

Konica Minolta. Los discos fueron pesados y se determinó el contenido de clorofilas totales usando la técnica de extracción con dimetil sulfóxido DMSO y siguiendo la metodología de Wellburn, 1994. Los resultados obtenidos se ajustaron a un modelo de regresión lineal para estimar la relación entre las unidades SPAD y el contenido de clorofilas totales.

Posteriormente, se hicieron mediciones de unidades SPAD en tres hojas del tercio medio de cinco plantas por cada tratamiento.

Se tomaron las respectivas muestras de hojas de cinco plantas, de cada uno de los tratamientos y se almacenaron a -80°C. Las muestras fueron procesadas rápidamente para análisis de contenido de pigmentos usando el método de extracción con DMSO, siguiendo la metodología de Wellburn (1994).

1.2.7 Caracterización morfológica

A cinco plantas por tratamiento se le realizaron mediciones de altura desde el suelo hasta la parte apical de la rama más alta, medidas de diámetro de la base del tallo sobre la cicatriz del injerto, se tomó una hoja del tercio medio por planta para determinar su área mediante fotografía usando el programa Image J, así como el peso seco para determinar el área foliar específica (AFE). Se estimó el porcentaje de cobertura foliar tomando fotografías hemisféricas desde la parte superior y con un fondo de contraste en el suelo, las fotografías se analizaron usando el programa Gap Analyzer.

1.2.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron transformados hasta cumplir supuestos de normalidad y homocedasticidad, para ser analizados mediante ANOVA simple con un n=5 y la prueba post –hoc, de Tukey HSD utilizando el software PAST v 2.17c. Se realizó una regresión simple para analizar la relación entre las unidades SPAD y el contenido de clorofilas totales. Se hicieron regresiones no lineales para ajustar los valores en las curvas RICs y calcular los parámetros según las ecuaciones presentadas en el manual de operaciones del fluorómetro PAM-2500, edición 2008 utilizando la herramienta SOLVER de Microsoft Excel 2010.

1.3 Resultados

1.3.1 Caracterización ambiental

Las variables ambientales registradas a lo largo del año 2016 se resumen en la Figura 1-1. La temperatura mostró una tendencia de disminución a lo largo del año desde un promedio de 18.7 ºC en el mes de Enero, hasta 16.0°C en el mes de Diciembre, con un pico de temperatura máxima en el mes de Agosto (19.1 ºC).

La humedad relativa tuvo un aumento a lo largo del año, con una pequeña disminución en Agosto. Los valores para los meses de Enero y de Diciembre fueron 77.3 % y 97.9 %, respectivamente. En cuanto a la precipitación, los meses de más lluvia fueron Febrero y Mayo. Cabe resaltar que el estudio se realizó durante todo el año, pero los muestreos de intercambio gaseoso se hicieron en Junio, siendo este uno de los meses con menor déficit de presión de vapor (DPV).

En cuanto a la radiación fotosintéticamente activa (PAR), se registró un promedio máximo de 416 µmol $m^{-2}s^{-1}$ en el mes de Septiembre y un mínimo en el mes de Abril con un valor de 307 µmol $m^{-2}s^{-1}$. El valor mínimo de radiación PAR coincide con la época de mayor precipitación (98.6 mm), por lo que se evidencia un posible efecto de la nubosidad sobre la radiación PAR. La menor precipitación ocurrió en el mes de Marzo, con 27.8 mm.

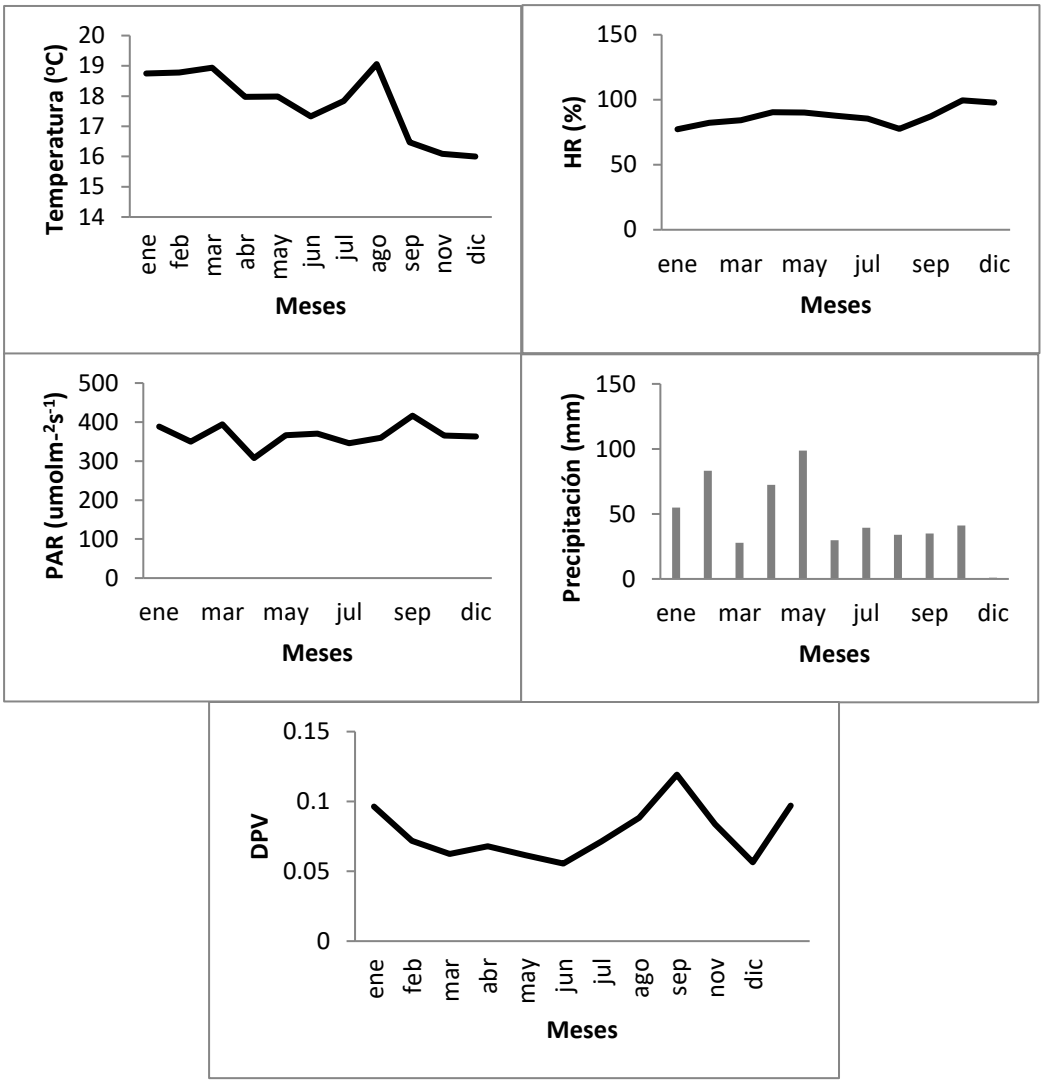

Figura 1-1: Promedios de temperatura (ºC), Humedad relativa (%), PAR (µmol/m^2.s), déficit de presión de vapor (DPV) precipitación acumulada (mm). Datos tomados en parcela experimental de *Persea americana* var. Hass, en la vereda San Pablo del municipio de Pasca, Cundinamarca; año 2016.

1.3.2 Intercambio gaseoso

La medición de intercambio gaseoso se realizó a los seis meses después de iniciado el tratamiento durante una época de baja precipitación, entre las 9:00 y las 11:00 h, con

una humedad relativa de 52.8 %. La Figura 1-2 muestra los valores y las diferencias entre los tres tratamientos evaluados en cuanto al intercambio gaseoso. Se observa que el tratamiento de 65% de radiación solar presentó el valor más alto de transpiración con 11.78 $\mu gcm^{-2}s^{-1}$, presentando diferencia significativa con respecto a los otros tratamientos, los cuales no difirieron entre sí. Así mismo, la mayor resistencia estomática se presentó en el tratamiento de 100% de radiación solar con un valor de 2.394 ms^{-1}. La temperatura de la hoja presentó diferencias encontrándose mayor temperatura en las hojas de las plantas del tratamiento de 100%.

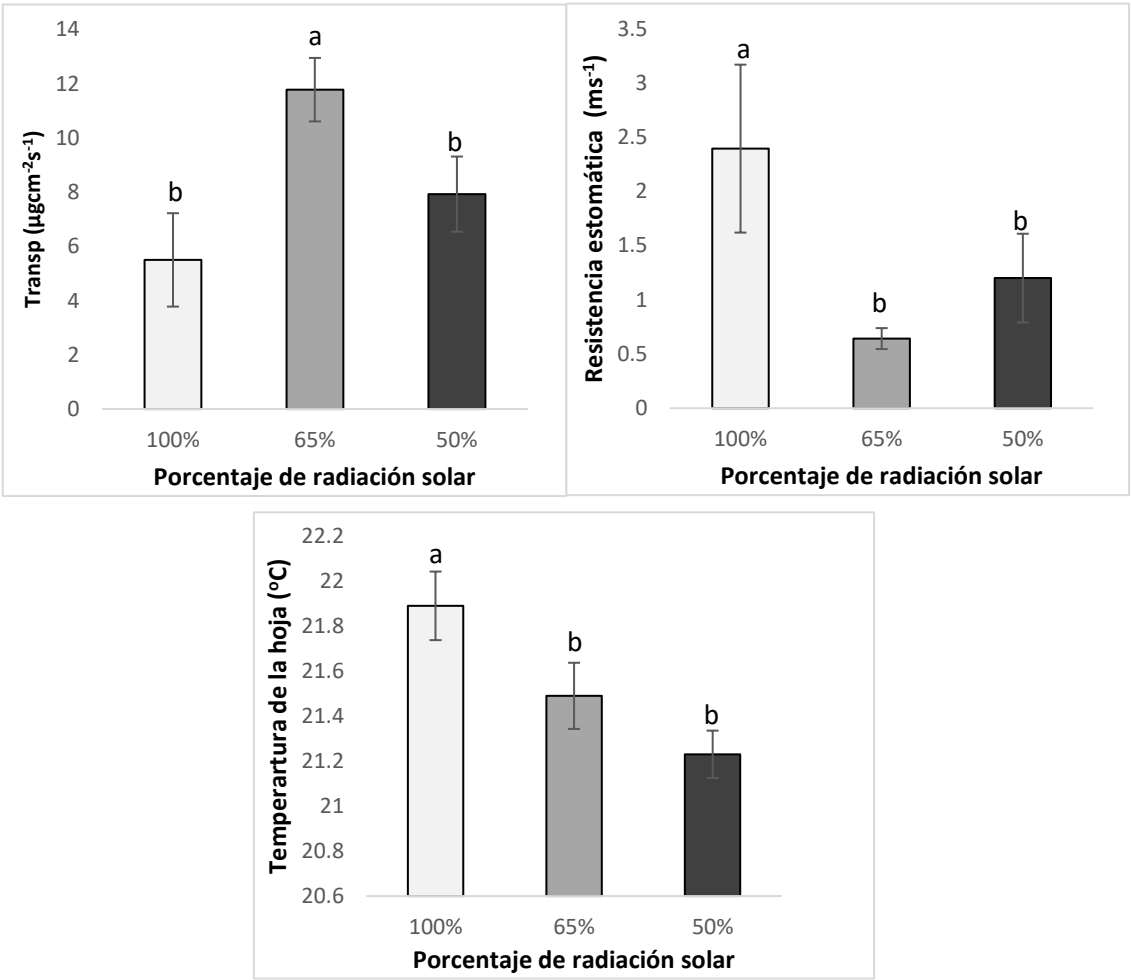

Figura 1-2: Transpiración, resistencia estomática y temperatura de la hoja, en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de luz solar. Datos obtenidos a los

seis meses después de iniciado tratamiento Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey).

1.3.3 Curvas rápidas de luz (RLCs) y de quenching no fotoquímico (NPQ)

Las curvas de tasa de transferencia de electrones ETR se obtienen mediante la exposición de la hoja adaptada a oscuridad a crecientes niveles de luz actínica, esto permitió encontrar diferencias en las respuestas de las hojas de las plantas en los tratamientos evaluados (figura 1-3). Si bien se observa una pendiente similar en las curvas correspondientes a los tratamientos de 100 y 65 %, ésta fue menor para el tratamiento de 50 %. A partir de los 1000 µmol de fotones $m^{-2}s^{-1}$ la ETR muestra un aumento más lento en los valores para la curva del tratamiento de 50 % de radiación solar lo que lleva a mostrar diferencia en el punto de estabilización de las tres curvas (aprox. 2200 µmol).

El quenching no fotoquímico representa la cantidad de energía que es disipada en procesos no fotoquímicos; es decir, por disipación térmica. Este proceso está relacionado con el ciclo de la Z y el de L. En la Figura 1-4 se observa la recuperación de las hojas bajo condición de oscuridad después de la exposición a luz de la curva RLC, las plantas sometidas al tratamiento de 100% de radiación solar, mostraron la recuperación más rápida en los primeros 120 s, en comparación con los otros dos tratamientos, mientras que las plantas sometidas al tratamiento de 50 % de radiación solar presentaron la recuperación más lenta. Así mismo, para el tratamiento de 50% de radiación solar, las plantas tuvieron un valor de NPQ de 3 al inicio de la recuperación, siendo este el valor máximo de los tratamientos, y se presentaron valores de 2.4 y 1.9 para los tratamientos de 65 % y 100 % de radiación solar, respectivamente.

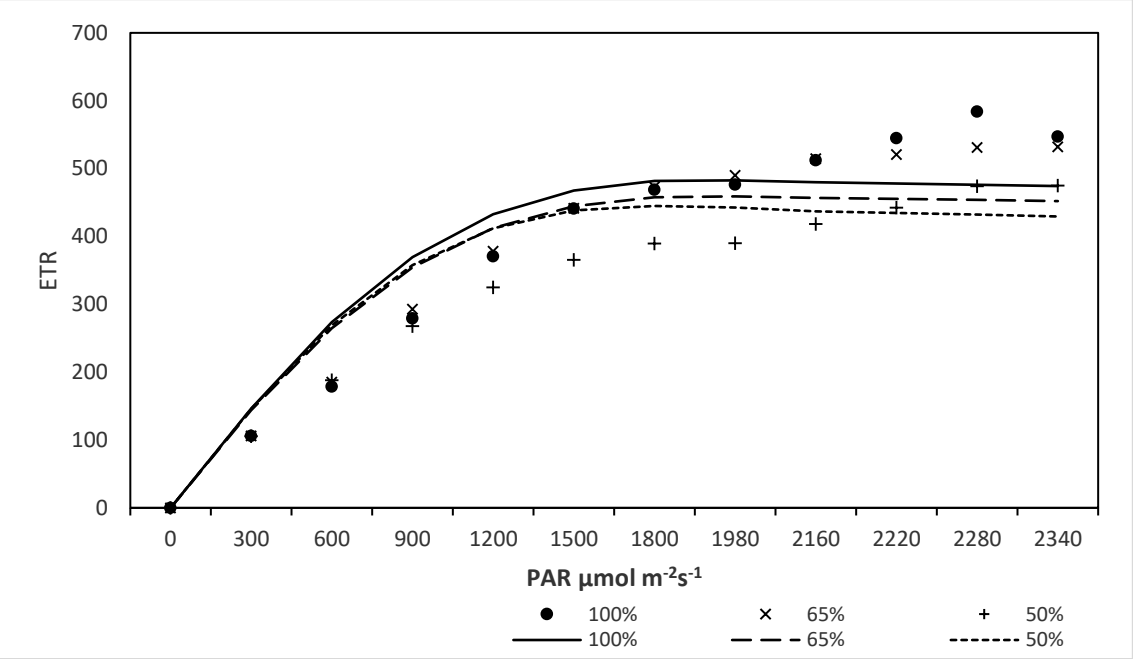

Figura 1-3: Curva rápida de respuesta a luz (RLC) en plantas juveniles de Aguacate ´Hass´ bajo tres condiciones de radiación solar. Los valores de ETR se calcularon como promedio de cinco réplicas y se ajustaron mediante regresión no lineal al modelo ETR=PAR/((a*PAR^2)+(b*PAR)+c). Los datos se tomaron en hojas de plantas nueve meses después de iniciado tratamiento.

Tabla 1: Parámetros obtenidos mediante regresión no lineal para curvas RLCs, en plantas juveniles de Aguacate ´Hass´ bajo tres condiciones de radiación solar. Los datos se ajustaron al modelo ETR=PAR/((a*PAR^2)+(b*PAR)+c) y se calcularon los parámetros mediante las ecuaciones **α**=1/c, **ETR$_{max}$**=1/(b+(2*(a.c)$^{1/2}$)), **Ik**=c/(b+(2*(a.c)$^{1/2}$)).

TRATAMIENTO	α	ETRmax	Ik
100%	0.500	482.971	965.943
65%	0.500	487.511	975.022
50%	0.500	446.897	893.795

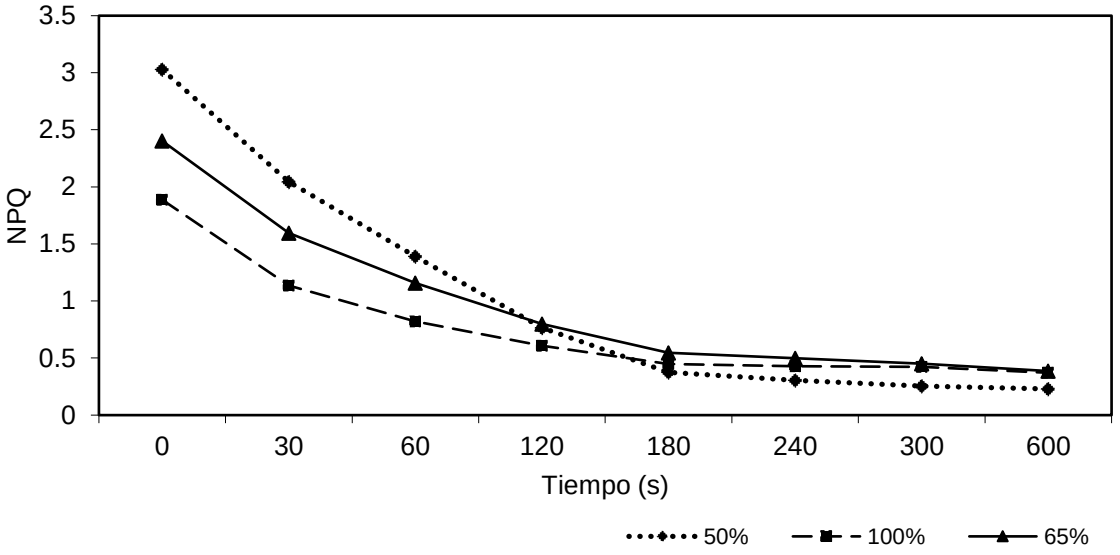

Figura 1-4: Quenching no fotoquímico (NPQ) en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres condiciones de radiación solar. Los valores de NPQ se calcularon como promedio de cinco réplicas. Se realizó en plantas de nueve meses después de iniciado tratamiento.

1.3.4 Características anatómicas

1.3.4.1 Densidad Estomática

La Figura 1-5 muestra la disposición de los estomas y de las células acompañantes para hojas de los tres tratamientos. Se observa que los estomas son de tipo anomocítico. Se muestran improntas de la zona abaxial de la parte media de hojas, por ser hojas de tipo hipostomático y no encontrarse diferencia entre las secciones basal, media y apical en densidades estomáticas calculadas en un ensayo previo.

En cuanto a la densidad estomática, la Figura 1-6 resume los resultados, en los que se evidencia que no hay diferencia significativa entre las densidades estomáticas de los tres tratamientos de radiación solar, los valores de densidades estomáticas se encontraron en el rango de 650 y 700 estomas/cm^2.

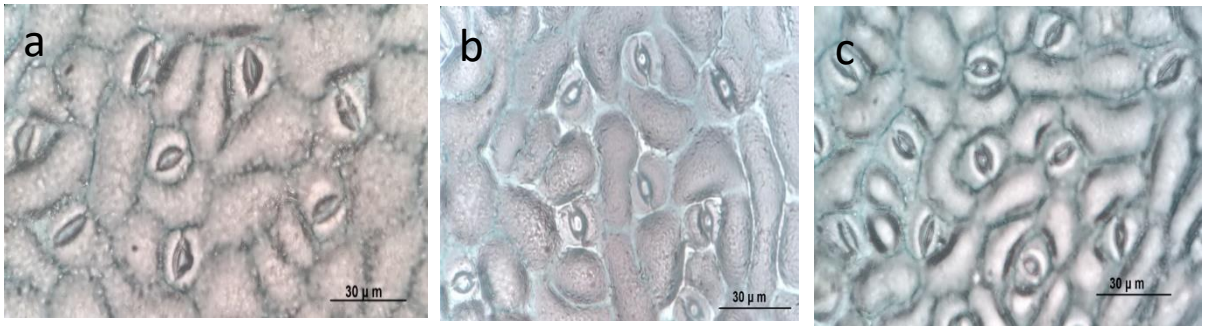

Figura 1-5: Estomas y células epidérmicas de hojas de *Persea americana* Var. Hass, bajo tres condiciones de luminosidad. a) 100 % de radiación solar, b) 65% de radiación solar, c) 50 % de radiación solar. Los datos fueron tomados 10 meses después de iniciado tratamiento. Aumento de 100 X.

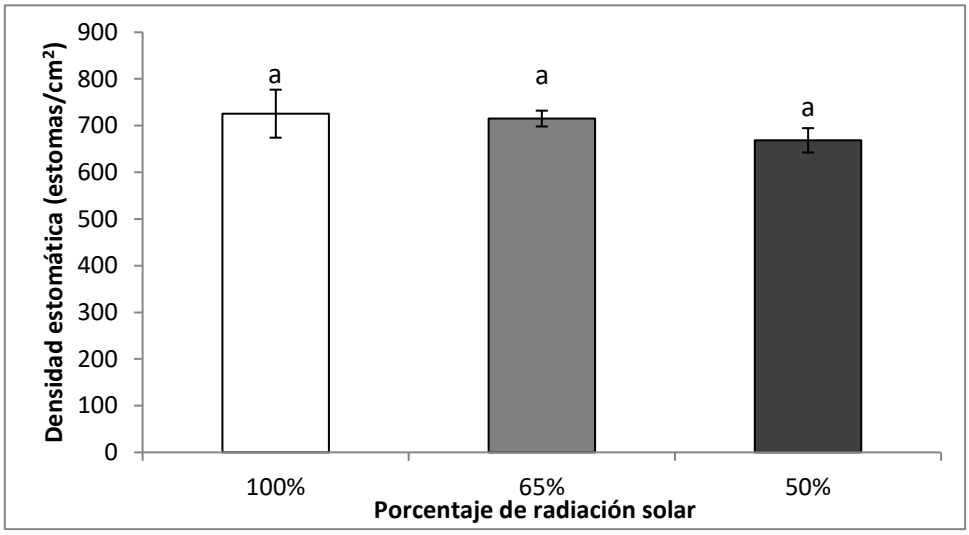

Figura 1-6: Densidad estomática (DE) de plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de luz. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos

múltiples de Tukey). Se realizó determinación en plantas de 10 meses después de iniciado tratamiento.

1.3.4. Corte transversal de hoja

En el corte transversal se observa la disposición de los tejidos en la lámina foliar (Figura 1-7). Para la lámina foliar, desde la parte adaxial se distingue la epidermis superior, conformada por células ligeramente isodiamétricas de aproximadamente 14 µm de diámetro; dos capas de parénquima de empalizada con células alargadas, la primera con células más apiñadas; parénquima esponjoso, con células (isodiamétricas) en el que se distinguen espacios de aerénquima y algunos haces vasculares secundarios; finalmente se encuentra una capa de células que conforman la epidermis inferior, de menor tamaño que la superior. En la parte de la nervadura central se encuentra células parenquimáticas y unas capas de esclerénquima que rodean el haz vascular; los tejidos vasculares se encuentran distribuidos a manera de una media luna, con el floema hacia la parte abaxial y con tinción de color azul, el xilema hacia la parte adaxial con una tinción en color rojizo.

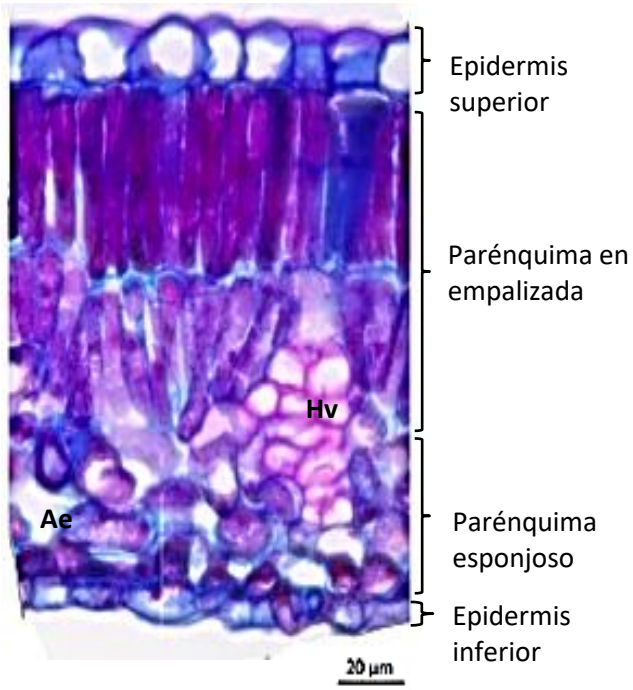

Figura 1-7: Corte transversal de hojas de *Persea americana* Var. Hass. Ae= Aerénquima; Hv=Haz vascular. Se realizó toma de muestra en plantas 10 meses después de iniciado tratamiento. Aumento de 40 X.

1.3.4.3 Grosor de las capas de tejidos en corte transversal de hoja

Se realizaron mediciones de grosor de la epidermis superior, parénquima en empalizada, parénquima esponjoso, y epidermis inferior, en los cortes transversales de la parte de la lámina foliar, sin incluir tejidos vasculares. En la Figura 1-8 se evidencia que el grosor total en cortes transversales de las hojas correspondientes al tratamiento de 100 % de radiación solar fue mayor al de los otros dos tratamientos (190 µm de grosor total de la lámina); a su vez, para los tratamientos de 65 % y 50 % de radiación solar se encontraron valores promedio de 161.4 µm y 155.2 µm, respectivamente. En la misma figura se distingue la disposición de los tejidos de la lámina, se resalta la distinción de dos capas de parénquima en empalizada.

Al observar los valores en la Tabla 1 y analizar cada tejido no se evidencian diferencias en el grosor, salvo en la primera capa del parénquima en empalizada (PZI), en donde se encontró un valor promedio de 72.76 µm para el tratamiento de 100 % de radiación solar, por lo que las diferencias en grosor total de la hoja sólo pueden ser atribuidas a diferencias en esta capa de tejidos, siendo mayor en las hojas expuestas a luz total.

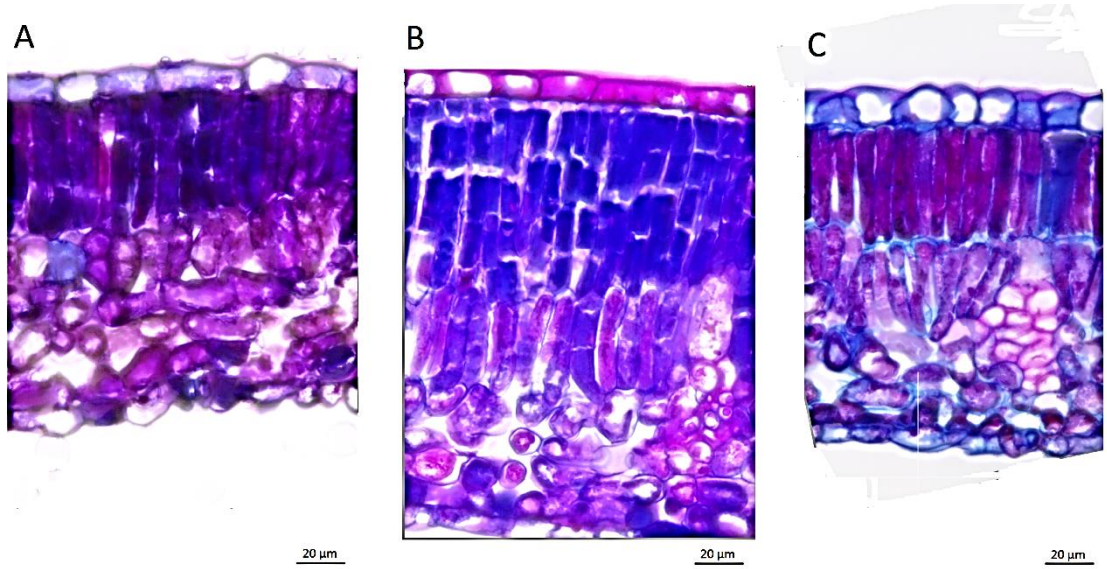

Figura 1-8: Cortes transversales de hojas de *Persea americana* Var. Hass bajo tratamientos de radiación solar. A) 65 % de radiación solar, B) 100 % de radiación solar, C) 50 % de radiación solar. Las fotos fueron tomadas con un aumento de 40 X. Muestras tomadas a 10meses después de iniciado tratamiento.

Tabla 2: Grosor de las distintas capas de tejidos en **c**ortes transversales de hojas de *Persea americana* Var. Hass. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Epidermis superior (ES), Primera capa de parénquima en empalizada (PZI), Segunda capa de parénquima en empalizada (PZII), parénquima esponjoso (PES), epidermis inferior (EI), grosor de la lámina (GL). Los datos fueron obtenidos en plantas de 10 meses después de iniciado tratamiento.

Radiación solar	ES (µm)	PZ I (µm)	PZ II (µm)	PES (µm)	EI (µm)	GL (µm)
100%	15.56 ± 1.68 a	72.76 ± 7.54 b	37.56 ± 3.51 a	55.74 ± 4.55 a	10.38 ± 0.95 a	190.0 ± 11.8 b
65%	14.46 ± 1.51 a	57.82 ± 4.04 ab	29.52 ± 1.59 a	50.36 ± 4.84 a	09.22 ± 0.96 a	161.4 ± 5.68 a
50%	14.50 ± 1.18 a	51.34 ± 4.01 a	33.72 ± 0.86 a	45.04 ± 3.82 a	10.62 ± 0.44 a	155.2 ± 7.11 a

1.3.5 Contenido de pigmentos

Para encontrar la relación entre las unidades SPAD medidas y el contenido de pigmentos, se hizo una regresión lineal. La Figura 1-9 muestra la recta de ajuste, la ecuación de la recta y el R^2 obtenidos. Si bien el R^2 no es muy alto (79.43 %), se considera un ajuste suficiente para interpolar valores.

Analizando los resultados presentados en la Figura 1-10 no se encuentra diferencia estadística entre los contenidos de clorofila estimados a partir de unidades SPAD en los tres tratamientos de radiación solar; sin embargo, al comparar con la figura 1-12-D, en la que se resume el resultado de análisis de clorofilas totales por extracción con solvente, en muestras tomadas en los tres tratamientos, sí se observa diferencia significativa, con mayor contenido de clorofilas totales en el tratamiento de 50% de radiación solar (2.28 mg/g peso fresco). Se presume que esta discrepancia puede ser debida al error intrínseco a la medición de unidades SPAD, lo que se corrobora con las grandes barras de error presentadas en la Figura 1-10.

En cuanto a los contenidos de carotenoides, clorofilas a y b presentados en las Figuras 1-11 y 1-12, se observa una mayor cantidad de estos pigmentos en el tratamiento de 50% de radiación con valores de 1.21, 1.48 y 0.80 mg/g de peso fresco, respectivamente. En los tratamientos de 65% y 100% de radiación solar no se encontró diferencia en ninguno de los pigmentos evaluados.

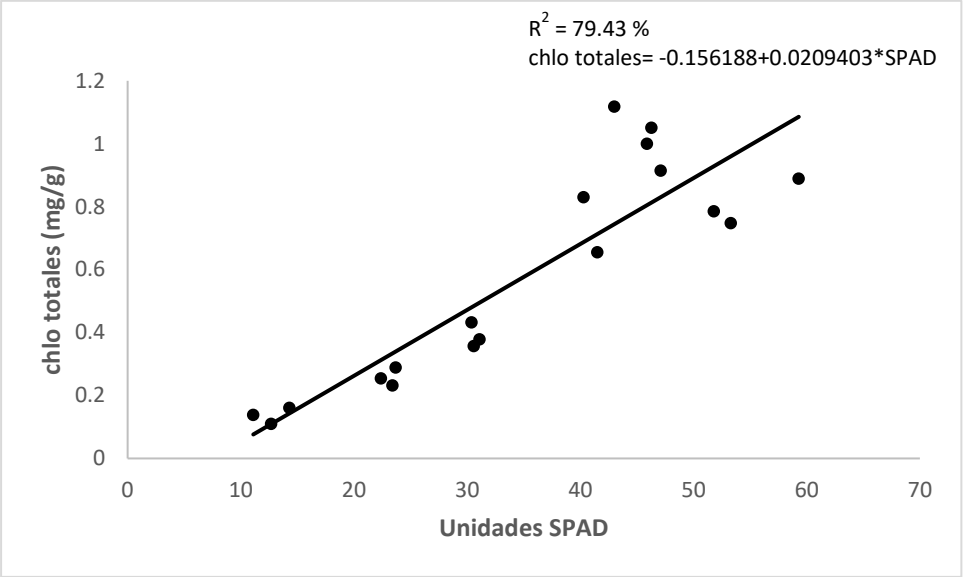

Figura 1-9: Regresión lineal entre unidades SPAD y contenido de clorofilas totales (Chlo total) de plantas juveniles de aguacate ´Hass´. Los datos se ajustaron a la recta chlo totales= -0.156188+0.0209406*SPAD, con un R^2 de 79.43%.

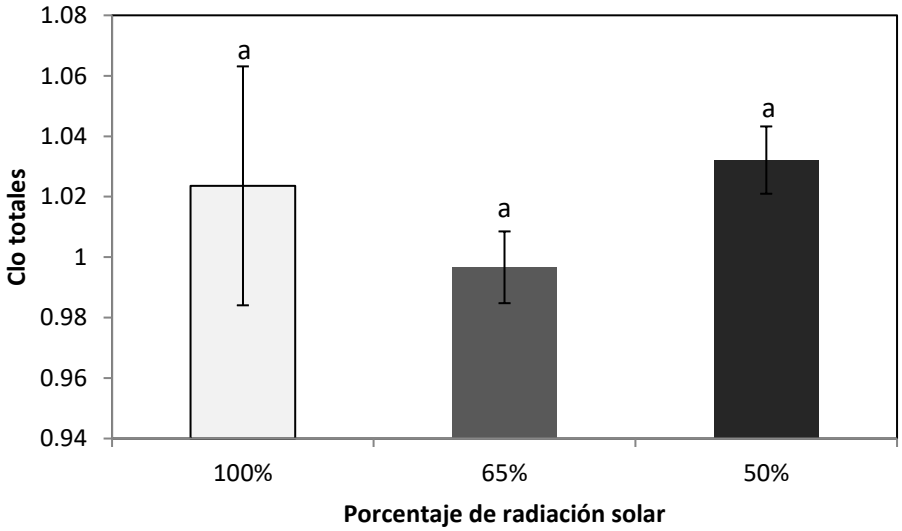

Figura 1-10: Contenido de clorofilas totales estimado a partir de unidades SPAD en plantas juveniles de Aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de radiación solar. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias

($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Datos obtenidos a partir de plantas de 10 meses después de iniciar tratamiento.

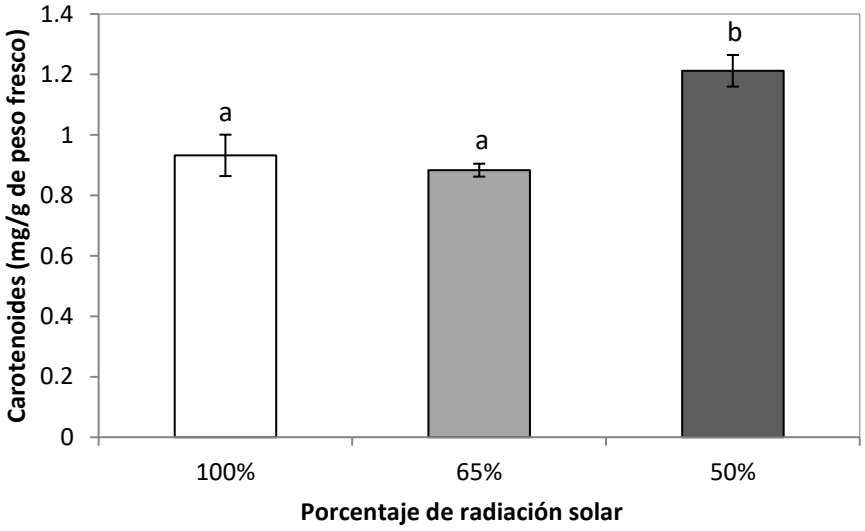

Figura 1-11: Contenido de carotenoides de plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de sombra. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Datos obtenidos a partir de plantas de 10 meses después de iniciar tratamiento.

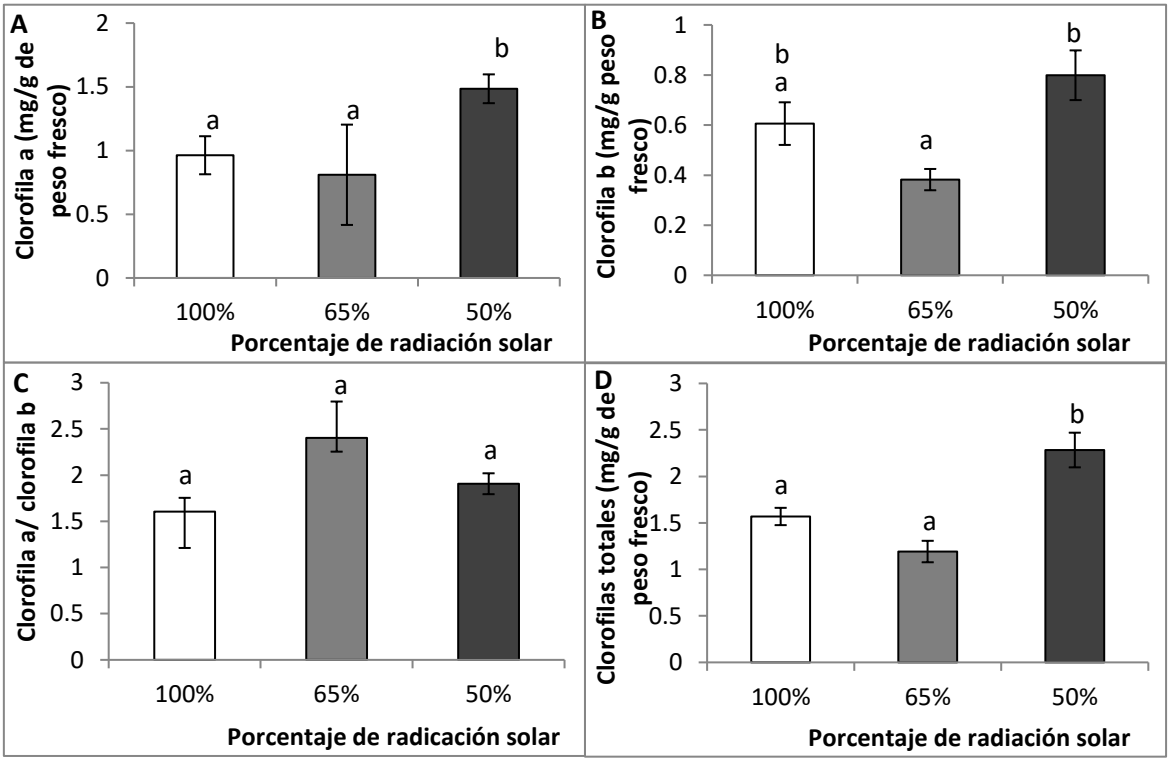

Figura 1-12: Contenido de clorofila a, clorofila b, relación clorofila a/ clorofila b y clorofilas totales en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de radiación solar. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Datos obtenidos a partir de plantas de 10 meses después de iniciar tratamiento.

No se encontraron diferencias significativas en la relación clorofila a/ clorofila b (Figura 1-12 C).

1.3.6 Caracterización morfológica

Las características morfológicas son las más evidentemente afectadas por las condiciones de luminosidad, la altura resultó ser menor en plantas sometidas a radiación solar completa, registrándose alturas medias de 94 cm (Figura 1-13). En el caso del diámetro de los tallos no se encontró diferencias entre los tratamientos (Figura 1-13). Se calculó el área foliar específica de los tres tratamientos y se encontró el menor valor (85.8 cm^2/g) en el tratamiento de radiación solar total, el tratamiento con 50 % de radiación resultó ser diferente en sus valores en comparación con el de 100 % de radiación solar con una media de 121.8 cm^2/g; sin embargo, no fue diferente con los resultados obtenidos en el tratamiento de 65 % de radiación (112 cm^2/g). Este resultado es coherente con los hallazgos de la parte anatómica evaluada, ya que la menor AFE de las hojas de plantas sin sombra o crecidas bajo radiación solar total presenta mayor grosor.

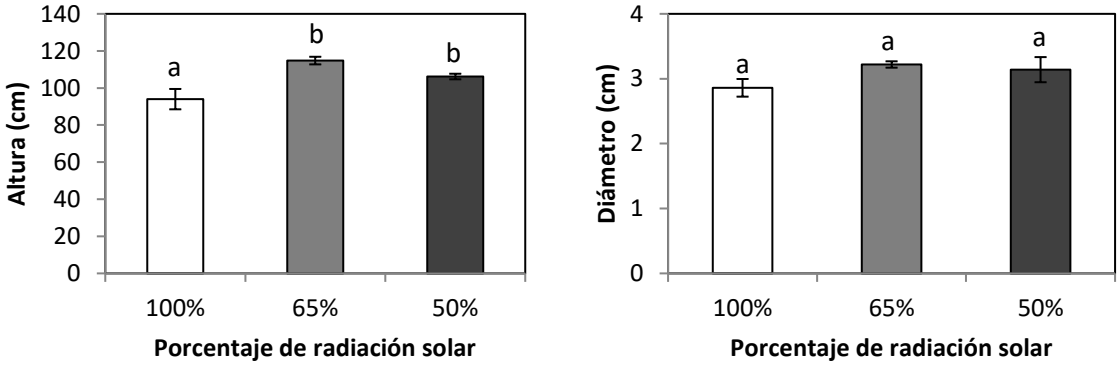

Figura 1-13: Altura de plantas juveniles de Aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de radiación solar. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Datos obtenidos a partir de plantas de 12 meses después de iniciar tratamiento.

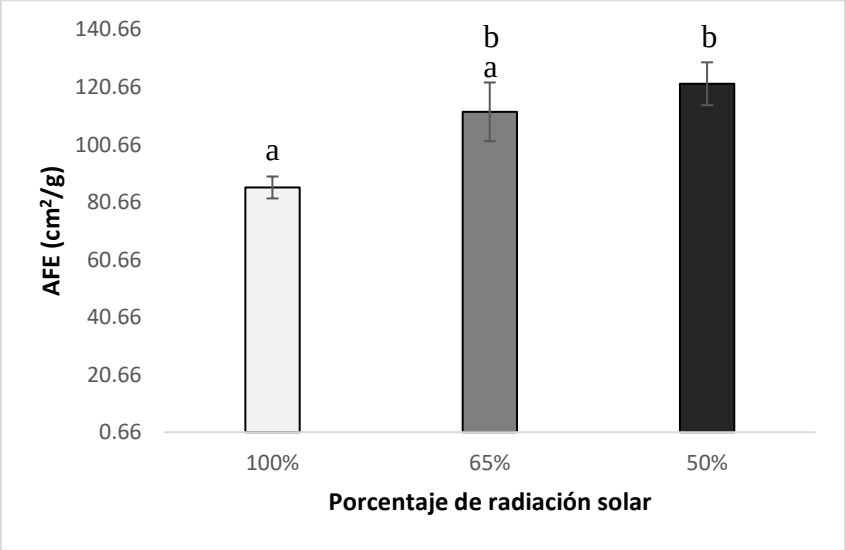

Figura 1-14: Área foliar específica (AFE) de plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de radiación solar. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Los datos fueron tomados en plantas de 12 meses después de iniciado tratamiento.

El porcentaje de cobertura foliar PCF fue calculado para hacer una estimación aproximada del área foliar de la planta. Se encontró que el PCF fue mayor en las plantas que presentaron mayor grado de sombreamiento o menor porcentaje de radiación solar (Figura 1-15) con un máximo de 78.12 % de cobertura para el tratamiento de 50 % de radiación solar. El menor PCF fue encontrado para las plantas con el 100% de radiación solar y coincide con el menor tamaño de dichas plantas.

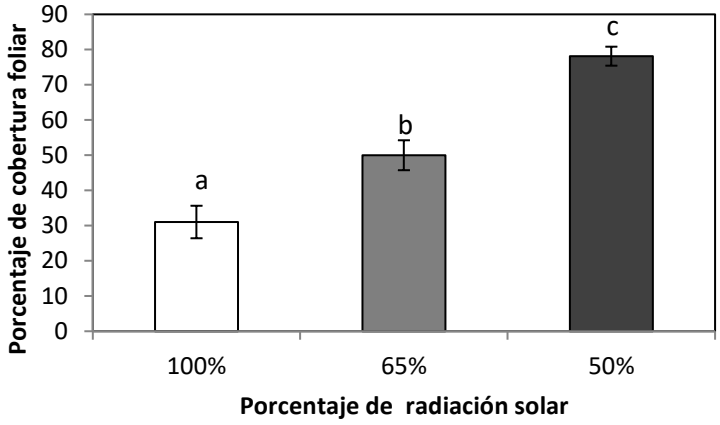

Figura 1-15: Porcentaje de cobertura foliar (PCF) de plantas juveniles de aguacate ´Hass´ bajo tres tratamientos de radiación solar. Los datos son mostrados como medias ± error estándar (n=5). Diferentes letras indican diferencias ($p < 0.05$, prueba de rangos múltiples de Tukey). Datos obtenidos a partir de plantas de 12 meses después de iniciar tratamiento.

1.4 Discusión

Los datos de intercambio gaseoso (transpiración y resistencia estomática) mostraron coherencia entre sí, ya que son variables inversas y esto se puede apreciar en el tratamiento de 65 % de radiación solar donde las plantas presentan la mayor transpiración y a su vez la menor resistencia estomática. Sin embargo, no fue posible evaluar el estado de asimilación de CO_2 de los tratamientos por lo que no se puede relacionar la salida de agua mediante la transpiración, con el CO_2 que realmente es fijado. Esto no permite afirmar que el tratamiento de 65 % de radiación solar es el que tiene el mayor rendimiento fotosintético, pero si se puede sugerir que tiene un buen estatus hídrico que le permite tener menor resistencia estomática en relación a las plantas expuestas a la luz directa.

Como indicador del estado fotosintético de las plantas bajo los diferentes tratamientos se recurrió a la fluorescencia de la clorofila, particularmente a la realización de curvas

rápidas de luz (RLCs), las cuales pueden ser usadas para detectar ajustes en corto plazo en el funcionamiento del aparato fotosintético, incluyendo la activación y desactivación del metabolismo del carbono sobre cambios en las condiciones ambientales de luz, la operación de los mecanismos fotoprotectores y la ocurrencia de fotoinhibición (Schreiber et al. 1997; White and Critchley 1999; Ralph et al. 2002; McMinn et al. 2004; Ralph and Gademann 2005; Serodio et al. 2005; Serodio et al., 2006). Estas curvas permiten evaluar estados de aclimatación a condiciones variables de luz, pero no evalúan el estado estable; sin embargo, se ha reportado que las RLCs pueden ser usadas para inferir con un mínimo de intrusión sobre el estado estable de foto aclimatación (Serodio et al., 2006). Los resultados indican una menor ETR_{max} en las plantas sometidas a 50 % de radiación solar, lo que indica un limitación a nivel de la cadena de transporte de electrones en dichas plantas, estas plantas presentaron menor resistencia estomática que las plantas expuestas a luz total, por lo que, si bien la entrada de CO_2 probablemente no es reducida, si lo es el proceso fotoquímico a nivel fotosintético en comparación con las plantas expuestas a los otros niveles de radiación.

Adicionalmente, en este estudio el mayor nivel de NPQ se encontró en las plantas sometidas a 50% de radiación solar (plantas crecidas bajo menor radiación solar comparado con los otros tratamientos) por lo que se evidencia una mayor disipación de la energía en forma no fotoquímica en relación con los otros niveles del tratamiento. Considerando la limitación encontrada mediante las RLCs, se sugiere que estas plantas activaron mecanismos de disipación de la energía en los niveles de luz evaluados dada su poca capacidad en la cadena de transporte de electrones, debido a su adaptación a la condición lumínica. Esta respuesta que implica un mayor NPQ, puede asociarse al mayor contenido de carotenoides de estas plantas, ya que estos están involucrados directamente en los procesos de disipación térmica. Hojas de sombra en doseles de especies tropicales tales como *Inga* spp., *Persea americana* y otras plantas leñosas contienen altas concentraciones de epóxido de luteína (Lx) (García-Plazaola et al., 2012; Förster et al., 2009; Matsubara et al., 2009; Husen et al., 2013), la presencia de este carotenoide se relaciona con la disipación térmica de la energía y se considera un ciclo alternativo al de la zeaxantina. Estudios han revelado NPQ asociado con luteína (L),

también como anteraxantina (A) y zeaxantina (z) en esas plantas (García et al., 2003; Matsubara *et al*., 2008; Förster et al., 2011; Husen et al., 2013). Los distintos componentes de NPQ pueden ser analizados, mediante la nomenclatura de Horton *et al.* (1996) que ha sido refinada por la designación del quenching no fotoquímico independiente de xantofilas (qE) y dependiente del ΔpH transtilacoidal como $NPQ_{\Delta pH}$ (Husen et al., 2013).

Respuestas que en el pasado fueron consideradas como indicadoras de daño fotoinhibitorio tales como el reducido rendimiento de fotones en la fijación de CO_2, evolución del oxígeno y quenching del máximo rendimiento de clorofila, en muchos casos ahora parecen ser el reflejo de procesos de fotoprotección (Björkman y Demmig,1994; Husen et al., 2013). En plantas como el aguacate que presentan los dos ciclos, de L y V, éstos presentan diferencias cinéticas, aunque la deepoxidación en vivo de Lx es algunas veces más lenta y requiere más altas intensidades de luz que V, recientemente se sabe que los productos de la de-epoxidación L, A y Z tienen dos funciones: amplificación de la fotoproteccción dependiente de energía y protección contra foto-oxidación (Matsubara et al., 2005). En un estudio realizado por Husen *et al*. (2013) en hojas de aguacate, la de-epoxidación de V, la cual es más rápida que la deepoxidación de Lx, se detuvo después de cerca de 60 minutos en luz del sol y el subsecuente incremento de [L] y [A+Z] a partir de nueva síntesis produjo un incremento de 2 a 5 veces de $NPQ_{\Delta LAZ}$ sobre el $NPQ_{\Delta pH}$ (Husen et al., 2013). Ya que la exposición a intensidades de luz altas en las hojas de las plantas evaluadas durante la construcción de las RLCs, no fue mayor a los 15 minutos, se puede afirmar que los componentes de NPQ ($NPQ_{\Delta pH}$, $NPQ_{\Delta LAZ}$) se encontraban activos pero sin la posibilidad de distinguir la contribución de cada uno de ellos al NPQ global.

Según Chartzoulakis *et al*. (2002) la anatomía foliar en aguacatero está influenciada por condiciones ambientales. En cuanto a las características anatómicas de las hojas de las plantas evaluadas, no se encontró diferencia en la densidad estomática entre los niveles del tratamiento, por lo que las diferencias en la transpiración obedecen exclusivamente a diferencias en el estado de apertura de los estomas. Se confirmó la condición

hipostomática de las hojas según lo reportado por Heisman (1939), quien afirma que la hoja del aguacatero es hipoestomática, con estomas sólo en la superficie abaxial. Estudios en razas y cultivares de aguacatero bajo diferentes condiciones y etapas de desarrollo, han mostrado que la densidad estomática puede variar de 100 a 610 estomas por mm^2 (Kadman, 1965); sin embargo, en el presente estudio, el rango de densidad estomática estuvo entre los 650 y 700 estomas por mm^2, presentando una mayor densidad a la reportada y sin diferencias entre las tres intensidades de luz. Esto último corresponde con lo reportado por Mickelbart *et al* (2000), quienes no encontraron diferencia en la densidad estomática entre hojas de luz y hojas de sombra en plantas de aguacate 'Hass', pero contrastando con los resultados de Hirano (1931), quien encontró una diferencia de aproximadamente el doble en la densidad estomática en hojas de sol y hojas de sombra de 'Eureka' lemon. Así mismo, en otras especies el sombreado podría ocasionar diferencias aún dentro del misma dosel del árbol, como en manzano (*Malus domestica* Borkh.), en el que ocasiona una reducción en la densidad estomática (Cowart, 1936; Barrientos *et al*, 2003). Estos resultados de densidad estomática en plantas juveniles de aguacate se pueden extrapolar para plantas adultas, ya que Saavedra (1993) detectó en árboles de 4 meses, 9, 15 y 23 años de edad que la densidad estomática es muy estable en cada cultivar a través de su desarrollo (Barrientos *et al*, 2003).

Los valores de los grosores de los distintos tejidos en la lámina foliar se encuentran cercanos a los reportados por Chartzoulakisa et al., (2012), pero ligeramente más bajos en la capa de parénquima esponjoso, lo que hace que el grosor total sea menor en comparación con los datos reportados para aguacate ‘Hass’ con buen status hídrico. La sección transversal de hojas de aguacate ‘Fuerte’ y ‘Hass’ mostraron que en ambos cultivares el parénquima en empalizada está compuesto por dos capas sucesivas y diferenciadas, la primera inicia en contacto con la epidermis superior y la otra con el parénquima esponjoso (Chartzoulakisa et al., 2012). Así como lo encontrado en este trabajo, en el que los tratamientos de menor radiación solar generan una reducción en el grosor total de la hoja dado por la disminución de PZI, se ha descrito en otros trabajos que la intensidad de luz promueve alteraciones en la estructura de la organización de las hojas, dando como resultado lo que se ha llamado hojas de sol y sombra (Cutter

1978; Sousa et al., 2003), las cuales tienen características anatómicas particulares que las diferencian. Hojas expuestas a altas intensidades de luz, generalmente presentan un aumento en el número de capas celulares en el parénquima de empalizada, y consecuentemente en el mesófilo (Kubínová 1991; Sousa et al., 2003). El grosor de la capa epidérmica parece estar muy conservado en plantas bajo distintas condiciones de luz; por ejemplo, las células epidérmicas de plantas de *Tradescantia pallida* sometidas a cinco distintas intensidades de luz fueron de tamaño similar (Sousa et al., 2003).

En las plantas evaluadas el grosor en PZI y consecuentemente del mesófilo conlleva a su vez a una menor masa por unidad de área de las hojas bajo el menor nivel de radiación solar, lo que se evidencia en mayor AFE en los tratamientos de 65 % y 50 % de radiación solar. Así mismo, se ha reportado por Buisson y Lee (1993) y Sousa et al., (2003), en *Carica papaya*, que las hojas de las plantas que se mantienen a la sombra eran más delgadas y con menor masa foliar en comparación con las que se mantienen en condiciones de alta iluminación (Sousa et al., 2003).

La relación entre la respuesta anatómica y la actividad fotosintética puede ser develada analizando la relación entre el grosor de las capas mesofilares y la conductancia del mesófilo. El grosor del parénquima en empalizada es un buen predictor de la máxima tasa fotosintética, pero sólo en especies específicas (Sousa et al., 2003).

En general, el espesamiento foliar con el aumento de la irradiancia se asocia con aspectos estructurales y fotosintéticos (Strauss y Berlyn, 1994; Sousa et al., 2003). De esta forma, el aumento del grosor del parénquima en empalizada es conocido como una respuesta al crecimiento en altas irradiancias y en algunos tipos de estrés. Por ejemplo, en plantas de aguacate, el grosor del parénquima en empalizada y del total de la lámina de hojas sometidas a estrés hídrico fue menor en comparación con el control (Chartzoulakisa et al., 2012). El tejido de parénquima en empalizada columnar facilita la distribución más equitativa de la luz a cloroplastos dentro de la hoja, pues facilita la penetración de los componentes de luz directa, permitiendo que la luz penetre más profundamente en las hojas y se distribuya más luz uniformemente a los cloroplastos

dentro de la hoja (Vogelmann y Martin 1993; Sousa et al., 2003). Las características estructurales del mesófilo determinan directamente la conductancia y consecuentemente la actividad fotosintética (Bongi and Loreto, 1989; Chartzoulakisa et al., 2012); así mismo, el arreglo denso de las células del parénquima esponjoso puede resultar en la reducción de la conductancia en hojas de aguacate sometidas a estrés hídrico (Chartzoulakisa et al., 2012).

En el presente estudio se encontraron diferencias en el AFE de las plantas evaluadas, de las cuales el menor valor se encontró en las plantas que crecieron bajo radiación solar total, las hojas de estas plantas se caracterizaron por ser gruesas y con pocas áreas de la lámina, mientras que las hojas de las plantas bajo menor radiación solar fueron más delgadas y con láminas más grandes. A menudo se observa en especies tolerantes a la sombra y cultivadas en condiciones de poca luz una gran masa seca foliar por área (LMA), que haría que las hojas fueran más resistentes a los herbívoros (Walters y Reich 1999, Rijkers et al 2000, Hanba et al., 2002). Los resultados obtenidos parecen indicar que las plantas evaluadas no tienen las características de tolerancia a la sombra en cuanto al AFE.

Los valores de contenidos de Clorofilas totales estuvieron en el rango entre 1.190 mg/g y 2.280 mg/g, encontrándose el mayor valor en las plantas del tratamiento de 50% de radiación solar. Wallihan y Sharpless (1970) reportaron valores máximos de clorofilas totales de 1.022 mg/g en hojas de aguacate ‘Hass’ en desarrollo, este valor se acerca al mínimo registrado en el presente estudio, el cual fue hallado en hojas de plantas sometidas a 65 % de radiación solar. Por otro lado, las plantas bajo 50 % de radiación solar presentaron un contenido de casi el doble en relación con los otros tratamientos de luz. Las hojas de sombra (exposición a menor radiación solar) presentaron una mayor cantidad de clorofilas y carotenoides en comparación con las hojas de plantas crecidas para exposición de radiación solar toal, este efecto de la iluminación sobre el contenido de pigmentos se ha encontrado en otras especies (Sousa et al., 2003). En el caso de la clorofila, es de esperar que plantas con altos requerimientos de luz presenten mayor concentración de estos pigmentos cuando crecen en condiciones de limitación de luz

como estrategia para optimizar el cosechamiento de luz. Por otro lado, los carotenoides han sido asociados con la protección del aparato fotosintético en contra de la acción de radicales libres de oxígeno (Krause, 1988; Sousa et al., 2003); sin embargo, en el presente estudio la mayor concentración de carotenoides se presentó en las hojas de plantas sometidas al 50 % de radiación solar.

En cuanto a las características morfológicas, los resultados fueron acordes con las observaciones generales realizadas en plantas bajo condición de baja y alta iluminación (Miralles, 2011). Así mismo, en otros estudios realizados en plantas de aguacate se reportan los mismos resultados, las plántulas cultivadas en interiores en luz tenue desarrollan tallos largos de tipo látigo o de vid, con entrenudos muy alargados, hojas lineales reducidas y pocas o ninguna rama; en el extremo opuesto, las plántulas de aguacate que se han desarrollado bajo alta iluminación en las laderas pacíficas de Centroamérica muestran un hábito de arbusto compacto (Frank et al., 1958).

El porcentaje de cobertura foliar fue usado como un estimador del área foliar de las plantas, la cual es dependiente del número total de hojas y del área foliar de cada una de ellas. El crecimiento bajo condiciones de poca radiación solar favorece la producción de más hojas y con mayor área foliar, lo que resulta en mayores porcentajes de cobertura foliar en las plantas sometidas a menor radiación solar e incluso fue diferente entre los tratamientos de 65% y 50% de radiación solar. Se ha podido hacer una serie de observaciones en Florida y Cuba sobre el hábito de crecimiento del aguacate en relación con la exposición a la luz; aunque muchas variedades muestran la tendencia de los juveniles a desarrollarse en árboles piramidales, esbeltos y altos, los viejos árboles individuales en Cuba, si no están rodeados de cerca por otros árboles y reciben iluminación más o menos uniforme por todos lados, invariablemente presentan coronas densas y redondeadas (Frank et al., 1958).

1.5 Conclusiones

A partir del experimento diseñado y de las variables evaluadas se encontraron diferencias fisiológicas, anatómicas y de la morfología en las plantas expuestas a

distintas condiciones de luz obtenidas mediante polisombras artificiales. La metodología empleada en cuanto a la fluorescencia de la clorofila permitió identificar una limitación a nivel de la cadena de transporte de electrones en las plantas sometidas a 50% de radiación solar en comparación con los otros tratamientos y un consecuente incremento en la disipación de la energía por vía no fotoquímica, sin embargo, no se identificó fotoinhibición indicándose un buen estado funcional del fotosistema II y de la maquinaria de disipación de la energía. Las plantas bajo los tratamientos de radiación solar de 65% y 50% presentaron menor resistencia estomática en comparación con las plantas expuestas a la radiación solar total, aunque no se encontró diferencia en la densidad estomática entre los tres tratamientos. Los contenidos de clorofilas y carotenoides fueron afectados por el tratamiento de menor radiación solar pero no por el de radiación solar moderada. En cuanto a respuesta fisiológica, las plantas evaluadas presentaron características de plantas facultativas para crecer en ambientes poco iluminados. Anatómicamente, las plantas sometidas a luz total presentaron mayor grosor del mesófilo, debido al incremento en grosor únicamente de la capa de parénquima en empalizada primario, esto se reflejó también en una menor AFE en las plantas que crecieron a plena exposición solar. Los resultados de AFE indican que las hojas evaluadas no tienen características de plantas tolerantes a la sombra. En cuanto a la morfología de las plantas se encontraron diferencias entre los tratamientos, el tratamiento de menor radiación solar (50%) promovió el crecimiento en altura y el desarrollo foliar presentándose plantas más altas y frondosas que las que crecieron bajo plena exposición de radiación solar.

2. CAPÍTULO 2: EFECTO DEL SOMBRÍO NATURAL EN PLANTAS DE AGUACATE EN UN SISTEMA DE CULTIVO MIXTO DE CAFÉ, AGUACATE Y BANANO

2.1 Introducción

La práctica de cultivos mixtos, es una práctica alternativa que permite atenuar las desventajas ambientales que genera un monocultivo tales como la erosión y el uso extensivo de pesticidas. No obstante, la principal forma de producción agrícola actual se basa en el monocultivo. Los cultivos mixtos son considerados como potencialmente ventajosos para la productividad, estabilidad de salidas, resiliencia a los disturbios y sostenibilidad ecológica (Malézieux et al., 2009). Así mismo, se pueden considerar los beneficios sociales que brindan, pues la mayoría de granjeros del mundo, particularmente aquellos localizados en regiones tropicales, aún dependen para su alimentación y sustento de sistemas agrícolas multiespecies (Malézieux et al., 2009). Para el establecimiento de un cultivo mixto, es importante conocer las condiciones ecofisiológicas apropiadas para cada especie, es importante de esta forma distinguir los requerimientos lumínicos de cada una.

El hábitat nativo del aguacate, se presume sería bastante parecido a los bosques lluviosos estacionales de tierra baja y de montaña de Costa Rica. La disminución de la temperatura del aire y el incremento de la nubosidad, con el incremento de la altitud, son probablemente los principales responsables de la limitación del crecimiento de los bosques de montaña tropical (Wolstenholme y Whiley, 1999); sin embargo, otros factores como la disponibilidad de nutrientes, pueden ser limitantes también. Las características de las plantas de este tipo de ambiente, son particulares, la competencia por la luz determina una prelación hacia el crecimiento vegetativo y el incremento en la altura de las plantas. La disponibilidad de luz, la estructura de la hoja y la longevidad da como resultado un índice de área foliar relativamente bajo; la productividad está limitada por una substancial inversión del carbono en el crecimiento y por un comparativamente grande sistema radical, debido a las características del suelo (Wolstenholme y Whiley,

1999). En aguacate, el principal limitante en el proceso fotosintético es la disponibilidad de radiación en las diferentes partes del dosel (Bernal, 2016).

Para el caso del aguacate, las características fisiológicas y del crecimiento son el resultado de las adaptaciones a su ambiente originario. Las hojas grandes y el gran tamaño de la semilla de los aguacates del tipo Guatemalteco, al igual de lo que se conoce de su hábitat nativo, están sugiriendo sobre principios ecofisiológicos una adaptación evolutiva a un ambiente de bosque sombreado y húmedo (Bower et al., 1977). Una de las limitantes para el cultivo del aguacate, es que el árbol presenta una tendencia natural al crecimiento vegetativo que resulta en una mayor asignación de materia seca a éste, en detrimento del desarrollo de órganos reproductivos (Whiley et al., 1988; Wolstenholme, 1990; Gandolfo, 2008).

Varios atributos fisiológicos, tales como un bajo punto de compensación por luz y una rápida renovación de hojas con una vida relativamente corta en plantas de aguacate, refleja las condiciones de su presunto centro de origen (Whiley and Schaffer, 1994; Wolstenholme and Whiley, 1999; Wolstenholme, 2002; Schaffer y Whiley, 2003). En cultivos 'Hass' el punto de compensación por luz es de aproximadamente 10 µmol fotones m^{-2} s^{-1} para hojas iluminadas por radiación solar total (Whiley y Schaffer, 1994). Estas características de bajo punto de compensación por luz, brindarían una ventaja adaptativa para la captación de luz fotosintética en un ambiente de sotobosque con baja radiación; adicionalmente, en su hábitat nativo, la prelación hacia el crecimiento vegetativo, dado el frecuente reemplazamiento de hojas excesivamente sombreadas permitiría una ventaja competitiva para maximizar la fotosíntesis. Sin embargo, en una situación de cultivo, esta predilección por el crecimiento vegetativo resulta en un incremento del sombreamiento del dosel (Schaffer y Whiley, 2003).
En este ensayo se analizaron características fisiológicas y su relación con la condición de iluminación, en plantas juveniles de aguacate 'Hass', establecidas en un cultivo mixto de café, plátano y aguacate, del tipo "relay inter-cropping" (Andrews y Kassam, 1976; Perrin y Phillips, 1978)

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Área de estudio y material vegetal

Se realizó un ensayo mediante un montaje experimental en la finca el Pedregal, ubicada en la vereda San Pablo del municipio de Pasca en el departamento de Cundinamarca a 1.860 msnm, con coordenadas 4°18´43.5´´ N 74°20´11.4´´. Se estableció una parcela experimental siguiendo las recomendaciones de Buenas Prácticas Agrícolas para el cultivo de aguacate 'Hass', se seleccionaron 100 plantas de aguacate 'Hass' injertadas sobre un patrón criollo en un vivero de la región y se establecieron dentro de un cultivo mixto de cafetal y banano que se encontraba previamente establecido en la finca; de esta forma algunas plantas quedaron bajo exposición directa al sol y otras fueron sombreadas por las plantas de banano. Se realizó un análisis del suelo previo a la siembra para determinar el tipo de suelo, sus necesidades nutricionales y a partir de ello, se estableció el programa de fertilización anual; a su vez, se realizó la adecuación de drenajes, barreras físicas o biológicas, control de arvenses y otras medidas de higiene necesarias para mantener el mejor estado fitosanitario del cultivo.

Para determinar el nivel de sombreamiento, 24 meses después del trasplante, se realizó un análisis de cobertura del dosel mediante fotografía hemisférica sobre cada planta evaluada, utilizando el software Gap Light Analyzer versión 2.0. Adicionalmente, la iluminancia solar fue medida utilizando un Smartphone Moto g segunda generación y la aplicación GPS status, tomando cuatro puntos sobre cada una de las plantas evaluadas. Se realizaron salidas de campo los días 19, 20 de Enero y 29, 30 de Diciembre de 2016 en las que se evaluaron variables fisiológicas y las condiciones de iluminación de ocho plantas.

2.2.2 Caracterización ambiental

Se instaló una estación meteorológica marca Coltein en cada parcela experimental y se registró a intervalos de 15 minutos durante todos los días de estudio la radiación fotosintéticamente activa (PAR), precipitación, humedad relativa y temperatura.

2.2.3 Intercambio gaseoso

Se registraron datos de intercambio gaseoso en hojas externas del tercio medio, sanas y completamente extendidas, usando un IRGA Lci+ pro. Se siguió la metodología planteada por Melgarejo *et al* (2010), con un punto de saturación constante por luz de 609 µmol fotones m^{-2} s^{-1}, CO_2 constante de 400 ppm, para determinar la tasa de asimilación de CO_2, transpiración, conductancia estomática, uso eficiente del agua, entre las 9 y las 11 horas, en plantas bajo distintas condiciones de sombra.

Se hicieron mediciones de transpiración, radiación PAR y resistencia estomática usando un Porómetro Li-cor Li-1600.

2.2.4 Fluorescencia de la Clorofila

Se hizo el registro del rendimiento cuántico máximo potencial (Fv/Fm), rendimiento cuántico operacional (ϕ) y tasa de transporte de electrones realizando mediciones en tres hojas del tercio medio por cada planta, en hojas adaptadas a la oscuridad por 30 minutos y en condiciones de luminosidad natural, entre las 9 y las 11 horas, utilizando un fluorómetro modulado PMS2 de Hansatech UK.

2.2.5 Métodos estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron mediante correlaciones de SPEARMAN previa transformación de los datos para cumplir supuestos de normalidad utilizando el software PAST v 2.17c.

2.3 Resultados

2.3.1 Cobertura del dosel

La fotografía hemisférica es una herramienta que permite estimar la entrada de luz bajo el dosel, un parámetro comúnmente utilizado es el canopy openess (grado de apertura del dosel) el cual es representado en forma de porcentaje. Canopy openess o apertura del dosel, es definida como una fracción no promedio de la parte no oscurecida del cielo (Sprugel et al. 1996; Stenberg et al., 1999). En la Figura 2-1 se muestran tres fotografías

hemisféricas representativas de las plantas estudiadas y sus respectivos valores de canopy openess estimados, las plantas que se encuentran cubiertas por plantas de banano presentan menor porcentaje de canopy openess. Al analizar la relación de la la radiación PAR con el canopy openess se encontró una relación lineal (coeficiente de correlación en descripción de figura 2-2). La Figura 2-2 muestra gráficamente la relación entre las variables de iluminación mencionadas.

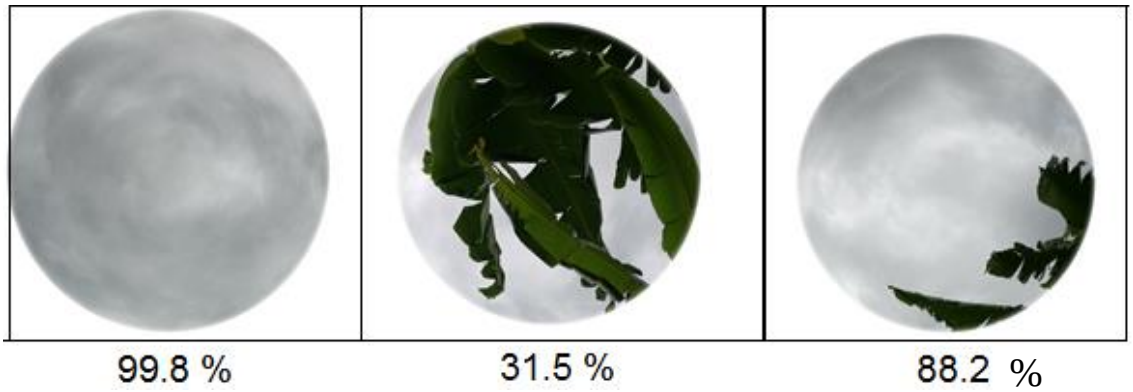

Figura 2-1: Canopy openess (grado de apertura de dosel) sobre plantas juveniles de aguacate ´Hass´ 26 meses después de transplante en cultivo mixto. A manera de ejemplo se muestran fotografías hemisféricas tomadas sobre tres plantas de aguacate y se evidencian distintas condiciones de luminosidad. Las fotografías fueron analizadas mediante el programa Gap Analyzer.

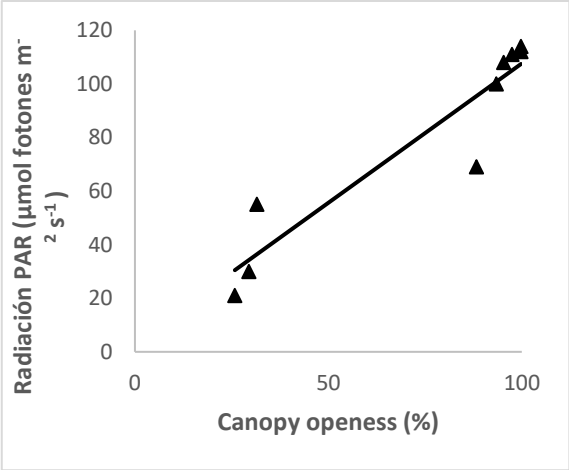

Figura 2-2: Relación entre radiación PAR y Canopy openess sobre plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos de iluminancia fueron tomados el 20 de Enero de 2016, así como los valores de radiación PAR. Coeficiente de correlación de SPEARMAN de 0.94.

2.3.2 Intercambio gaseoso

En la Figura 2-3 se muestra la tasa de asimilación de CO_2 (A) para cada nivel de apertura del dosel (canopy openess) en el cultivo mixto; las diferencias en apertura son dadas por la presencia de plantas de banano en estado adulto. El máximo valor de A fue de 13.9 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} y se encontró en la planta expuesta a un 95.4 % de apertura del dosel; así mismo, el menor valor fue de 5.96 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} y se encontró en la planta con apertura de dosel de 93.4 %. Se evidencia que si bien existe una relación aparentemente directa entre A y la apertura del dosel, dada a la disminución de los valores de A con la menor entrada de luz (relacionada con la apertura del dosel), el coeficiente de correlación no tiene un valor suficientemente alto (Tabla 2-1) para indicar una correlación estadística.

En referencia a la conductancia estomática (Figura 2-4), en las plantas evaluadas en el cultivo mixto, se encontró un máximo de conductancia, con un valor de 3.48 mol m^{-2} s^{-1} correspondiente con un porcentaje de apertura del dosel de 88.2 %. Los mayores porcentajes de apertura del dosel (99.8 a 95.4%) correspondieron con los valores más bajos de gs, siendo el mínimo 0.22 mol m^{-2} s^{-1}. Esta observación se corrobora con el coeficiente de correlación presentado en la Tabla 2-1, donde se muestra un valor de rho de Spearman de 0.29 para la relación entre gs e iluminancia, lo que nos permite indicar que no se encontró correlación entre dichas variables.

La tasa de transpiración (E), presentó un coeficiente de correlación con la apertura de dosel, similar a la relación entre A y apertura del dosel. En la Figura 2-5 se puede observar una tendencia de disminución de E en la medida en que el porcentaje de canopy openess se hace más bajo; sin embargo, el máximo de E con un valor de 3.49 m mol $m^{-2}s^{-1}$ no se presentó en el mayor porcentaje de apertura del dosel, sino en un porcentaje intermedio (Figura 2-5).

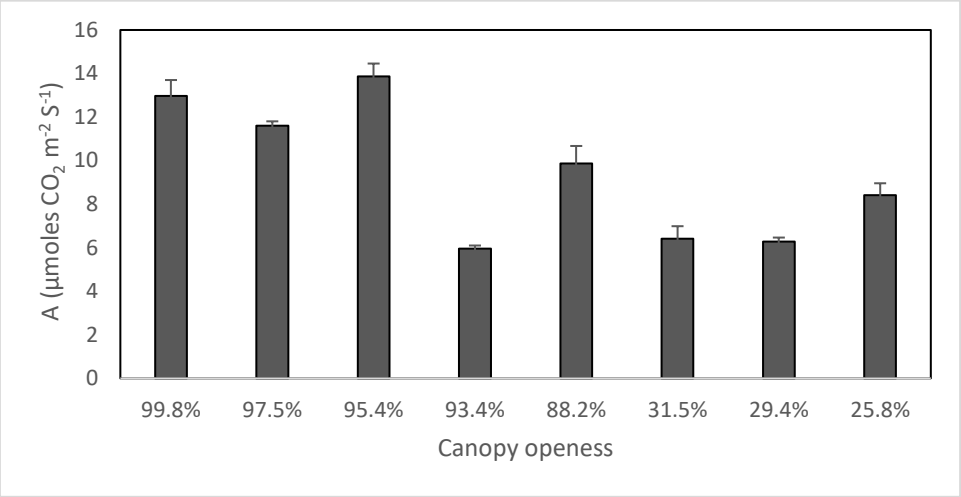

Figura 2-3: Tasa de asimilación de CO_2 en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados 15 meses después del trasplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

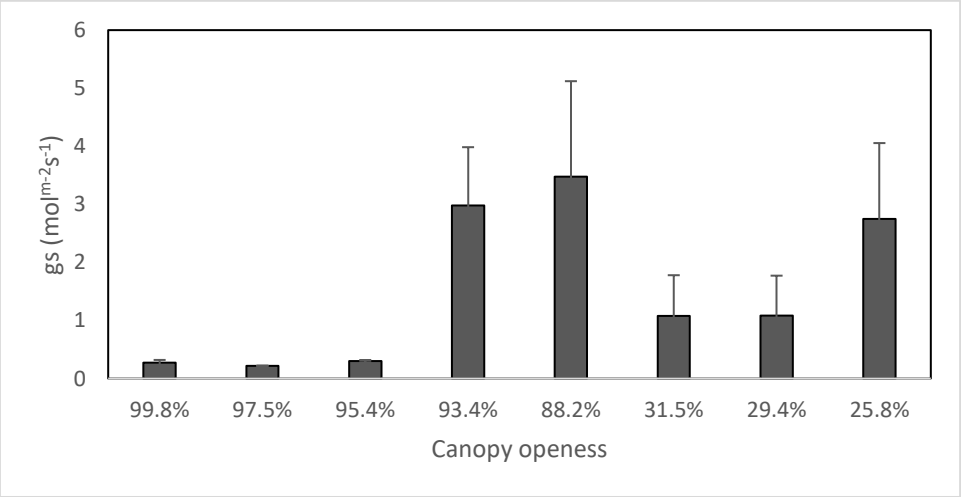

Figura 2-4: Conductancia estomática (gs) en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados 15 meses después del trasplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

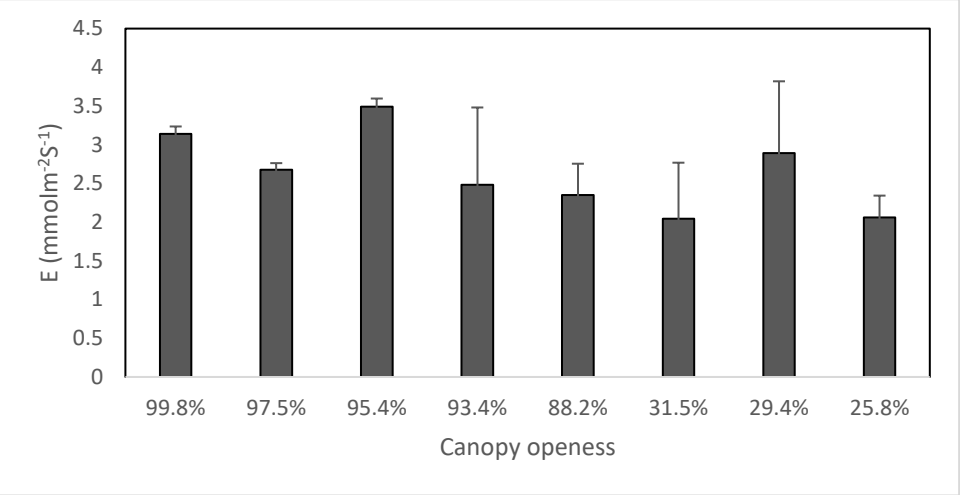

Figura 2-5: Tasa de transpiración en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados 15 meses después del trasplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

2.3.3 Fluorescencia de la clorofila

El rendimiento cuántico potencial del fotosistema II, indica el estado de desempeño del PSII y un acercamiento sobre cómo está su eficiencia fotosintética, pues se relaciona con la cantidad de centros de reacción abiertos en hojas adaptadas a oscuridad. En la Figura 2-6 se observa una ligera disminución en los valores de Fv/Fm a medida que el porcentaje de apertura del dosel disminuye, presentándose el menor valor de Fv/Fm en 0.78 en la planta bajo la condición de menor entrada de luz (25.8% de apertura del dosel), lo que indica que las plantas sometidas a mayor grado de sombrío, presentan menor cantidad de centros de reacción disponibles. Al observar los coeficientes de correlación en la Tabla 2-2, la relación entre Fv/Fm y radiación PAR presenta un valor de 0.89, lo que permite sugerir una correlación positiva entre las dos variables.

La figura 2-7 muestra los valores de ETR para cada uno de los porcentajes de apertura de dosel evaluados en el cultivo mixto. Al analizar la tasa de transporte de electrones (ETR) (Figura 2-7), se encontró que el valor máximo de ETR fue de 63.5 µmol de fotones m^{-2} s^{-1}, este valor corresponde a la planta bajo un porcentaje de apertura de dosel del 99.8 % (valor máximo de apertura del dosel); en tanto que el menor valor de ETR

correspondió a un porcentaje de apertura del dosel de 25.8 %. En general, se observa una disminución en los valores de ETR a menor apertura del dosel, resultado que es coherente con el concepto de ETR, ya que este parámetro tiene en cuenta la radiación PAR incidente al momento de la medición con el fluorómetro modulado. En la tabla 2-1 se indica el valor del coeficiente de correlación para la relación entre ETR y la iluminancia; el valor de 0.83 para la Rho de Spearman evidencia una correlación lineal positiva entre estas dos variables.

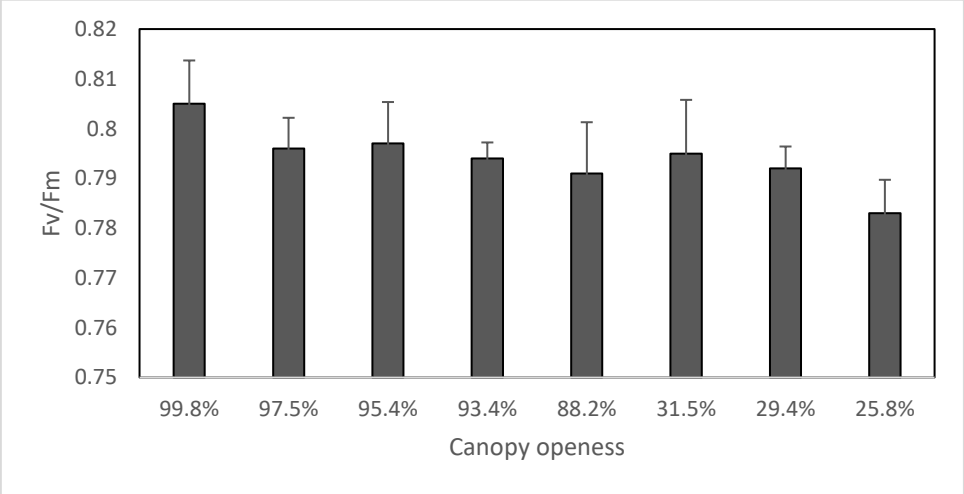

Figura 2-6: Rendimiento cuántico potencial del fotosistema II (Fv/Fm) en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados 26 meses después del transplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

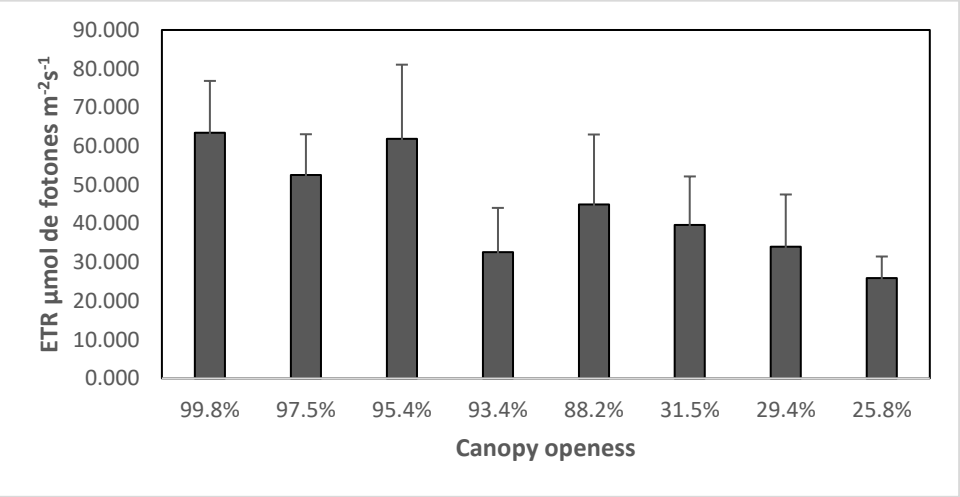

Figura 2-7: Tasa de transporte de electrones (ETR) en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados 15 meses después del transplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

El rendimiento cuántico operacional (ϕ) no presentó correlación con la iluminancia, presentándose un bajo valor de coeficiente de correlación (-0.17, ver tabla 2-1); así mismo en la Figura 2-8 no se observa ningún tipo de tendencia entre ϕ y la apertura del dosel, los valores de ϕ fueron similares para todos los porcentajes de apertura del dosel, con valores entre 0.43 y 0.52.

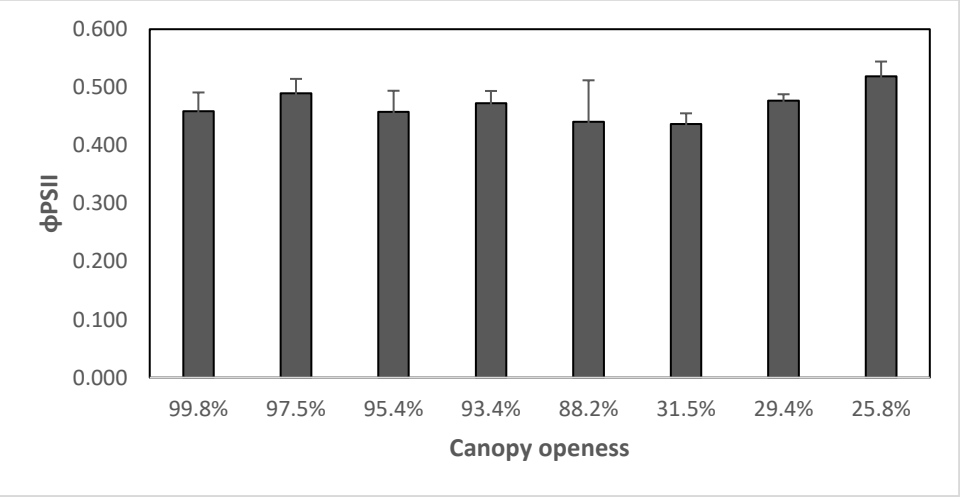

Figura 2-8: Rendimiento cuántico operacional del fotosistema II (ϕPSII) en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados 15 meses después del transplante, entre las 9 y 11 horas. El gráfico representa medias ± error estándar (n=5).

2.3.4 Relaciones entre las condiciones de iluminación y las variables fisiológicas

La apertura del dosel es un indicador de la cantidad de luz que ingresa bajo el dosel en el cultivo mixto, en este caso el dosel está conformado por plantas adultas de banano, como vimos en la sección 2.3.1. Existe una correlación positiva entre la apertura del dosel y la radicación PAR. Algunas variables fisiológicas presentaron correlación con la iluminancia, como es el caso de ETR y en menor medida con A; otras como ϕ no presentaron ningún tipo de correlación. Del mismo modo, Fv/Fm presentó una correlación positiva con la radicación PAR. En estos casos, las gráficas de barras que relacionan las variables enunciadas y la apertura del dosel, muestran la tendencia de la correlación.

Tabla 2-1: Coeficientes de correlación de Spearman para las distintas variables ecofisiológicas en relación con la apertura del dosel en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados en plantas de 15 meses de edad luego de su establecimiento. Las negrillas indican los valores de Rho más altos. Rendimiento cuántico operacional del fotosistema II (ϕ PSII), tasa de transferencia de electrones (ETR), tasa transpiratoria (E), conductancia estomática (gs), tasa de asimilación de CO_2 (A), radiación fotosintéticamente activa (PAR), uso eficiente del agua (WUE).

Coeficiente de correlación de SPEARMAN							
	ϕ PSII	ETR	E	gs	A	PAR	WUE
Iluminancia	-0.17	**0.83**	**0.55**	0.29	**0.57**	**0.81**	-0.31

Tabla 2-2: Coeficientes de correlación de Spearman para las distintas variables ecofisiológicas en relación con la radiación PAR en plantas juveniles de aguacate ´Hass´ en cultivo mixto. Los datos fueron tomados 15 meses de establecimiento. Las negrillas indican los valores de Rho más altos. Radiación fotosintéticamente activa (PAR), rendimiento cuántico potencial del fotositéma II (Fv/Fm), tasa transpiratoria (E), resistencia estomática (Resist).

Coeficiente de correlación de SPEARMAN				
	SPAD	Fv/Fm	E	Resist
PAR	0.32	**0.89**	0.14	- 0.23

2.4 Discusión

Siguiendo la distinción entre plantas de luz y plantas de sombra, las plántulas de especies demandantes de luz pueden sobrevivir y crecer solo bajo altos niveles de luz, mientras que las semillas de especies tolerantes a la sombra pueden sobrevivir bajo alto grado de sombra (Augspurger 1984; Kitajima 1994; Hanba et al., 2002). Los valores de A resultaron ser más altos según la correlación hallada en las plantas con más iluminación, aunque no se realizaron curvas de luz para calcular $A_{max.}$ Estudios en varias especies dan como resultado que el punto de fotosíntesis máxima por saturación por luz (Amax) fue generalmente más alto en plantas demandantes de luz cuando crecen bajo altos niveles de luz, que el de las plantas tolerantes a la sombra bajo la misma condición (Kozlowski & Pallardy 1997; Hanba et al., 2002). Sin embargo, algunos experimentos en plántulas de árboles han mostrado resultados contrastantes, especies tolerantes a la sombra no mostraron mayor eficiencia cuántica que las especies demandantes de luz bajo condiciones de sombra tanto en plantas caducifolias como no caducifolias. (Walters y Reich 1999; Hanba et al., 2002).

En cuanto al intercambio gaseoso, el aguacate es una planta típica C3, con una máxima capacidad de intercambio de CO_2 alcanzada a 20-25 °C. El punto de saturación de luz para la fotosíntesis en árboles adultos de aguacate cv. Hass es de 1.110 µmol quanta m^{-2} s^{-1} de flujo de fotones fotosintéticos, alrededor de la mitad de lo que se obtiene al mediodía en el trópico (Paull y Duarte, 2011). En la parcela experimental evaluada, la radiación PAR máxima fue de 112 µmol m^{-2} s^{-1} debido a las condiciones de alta nubosidad de al momento de la medición, las mediciones de A se hicieron a 609 µmol fotones m^{-2} s^{-1}. La fotosíntesis del aguacate es sensible a la alta demanda evaporativa y a la baja humedad del suelo, sin embargo, esas respuestas son en principio un resultado de la reducción de la conductancia estomática (Neuhaus, 2003; Schaffer y Whiley, 2003). El aguacte es una planta en la que se han encontrado puntos de saturación bajos, estos puntos relativamente bajos reflejan, indudablemente, el hábitat lumínico bajo el cual se desarrolló originalmente el aguacate, un bosque tropical lluvioso.

Aunque variables como Fv/Fm y A, fueron mayores en las plantas bajo mayor apertura del dosel, se resalta el carácter de plasticidad fisiológica del aguacate debido a las condiciones de su ambiente originario. Las características de la hoja describe a un árbol considerado como un colonizador de pequeñas brechas o un árbol cuya historia se desarrolló, dentro de un bosque con exposición a una intensidad de luz fluctuante (nublado y sol directo), que puede potencialmente dañar la función de la hoja, bajo esta situación las hojas de aguacate no están completamente adaptadas a la sombra o a la luz solar directa y deben ser capaces de manejar cambios grandes y rápidos en su ambiente (Mandemaker, 2007).

Cabe resaltar el que la condición del suelo de la parcela experimental pudo haber afectado los valores de las variables de intercambio gaseoso, esto por la posible competencia radicular entre las especies dentro del sistema mixto, y por la pedregosidad del terreno, ya que el desarrollo del sistema radical del aguacate, afecta las mediciones de intercambio gaseoso, presentándose resultados diferentes según los obstáculos o facilidades que presente la raíz para su crecimiento. Muchas de las primeras mediciones de tasa de intercambio de CO_2, fueron hechas en plantas en contenedores, estas plantas parecen haber sufrido una restricción radical y tuvieron substancialmente

menores tasas de intercambio de CO_2 que plantas en condición de cultivo (Whiley et al., 1999). Bajo condiciones óptimas, las tasas de intercambio de CO_2 han sido medidas como máximo entre 15 y 20 µmol CO2 $m^{-2}s^{-1}$ (Mandemaker, 2007).

Se ha mostrado que a largo plazo, más del 40% de un cultivo de manzana consiste en espacio inutilizado, los mismo es cierto para los cultivos de aguacate (Bower, 1978). Dada esta situación, sería pertinente desarrollar estrategias que permitan optimizar el espacio, sin embargo una limitante es que la baja disponibilidad lumínica en la parte interna y en los estratos inferiores del árbol de aguacate, genera una reducción en la eficiencia fotosintética de la planta y una disminución en el rendimiento y calidad del fruto (Schaffer y Whiley, 2002; Hadari, 2004; Medina-Torres et al., 2011; Bernal, 2016). Adicionalmente el crecimiento del aguacate bajo sombra en un cultivo mixto, tendría como dificultad la tendencia a favor del crecimiento vegetativo (Wolstenholme, 1990; Bernal, 2016). Esta tendencia permite al aguacate superar la competencia por luz en las copas en las condiciones del bosque tropical lluvioso y el bajo punto de compensación lumínico, contribuyendo a maximizar la fotosíntesis de los árboles en su hábitat de origen (Bernal, 2016). Este habitad originario del aguacate, donde las condiciones de luz no son homogéneas, puede considerarse similar en cuanto a las características lumínicas a un cultivo mixto en donde plantas más altas generan un dosel.

2.5 Conclusiones

Se encontró una relación entre la apertura del dosel y la intensidad lumínica, evidenciándose condiciones diferenciales de iluminación dada el establecimiento de las plantas dentro de un cultivo mixto. La evaluación realizada mediante la metodología permitió establecer la relación entre las variables fisiológicas evaluadas y la intensidad lumínica diferencial de las plantas evaluadas, presentándose correlaciones positivas entre ETR y la iluminancia, así como Fv/Fm y la radiación PAR. La radiación solar fue diferencial dependiendo de la apertura del dosel generado por plantas adultas de plátano. Los resultados de Fv/Fm indican que las plantas mantienen la integralidad del fotosistema II en cualquiera de las condiciones evaluadas

3. Conclusiones y recomendaciones

A partir de las metodologías empleadas y la evaluación en los dos ensayos se encontró que el aguacate 'Hass' tiene características de plantas facultativas para crecer en condiciones de baja iluminación. En el ensayo con polisombras la evaluación del intercambio gaseoso sugiere que la exposición a luz total presentó menor conductancia estomática que los otros tratamientos, además las curvas ETR y el contenido de carotenoides no presentan diferencias entre las plantas que crecieron sin sombra y las de sombra moderada (35%), por lo que se considera que la sombra moderada no presenta un efecto negativo sobre las plantas, aunque se encontró mayor AFE en sus hojas. La evaluación con unidades SPAD no tuvo el mismo nivel de detalle que la determinación de clorofilas en laboratorio y no permitió encontrar diferencias entre los tratamientos evaluados. En condiciones de cultivo mixto la evaluación ecofisiológia de un solo factor se dificulta dada la gran cantidad de efectos de diverso tipo, sin embargo fue posible identificar relaciones entre algunos parámetros fisiológicos y la disponibilidad de luz.

Los resultados del ensayo con polisombras, permiten proponer la realización de más estudios en cultivo mixto ya que la baja radiación solar moderada (65%) no fue un factor negativo sobre las plantas y el cultivo mixto podría ser una opción de aprovechamiento del espacio, siempre que se garantice el requerimiento lumínico adecuado para la etapa de producción del aguacate.

4. Bibliografía

Andrews, D. J., A.H. Kassam. (1976). *The importance of multiple cropping in increasing world food supplies*. In eds.: R. I. Papendick, P. A. Sanchez y G. B. Triplett Multiple Cropping, American Society of Agronomy, Special Publication No. 27, Wisconsin.

Augspurger C.K. (1984*) Light requirements of neotropical tree seedlings: a comparative study of growth and survival*. Journal of Ecology 72: 777–795.

Baker N. (2008). *Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo*. Annual review of plant biology 59: 89-113.

Barrientos-Priego A. F., W. Michal, C. Trejo y L. López. (2003). *Índice y densidad estomática foliar en plántulas de tres razas de aguacatero.* Rev. Fitotec. Mex. Vol. 26 (4): 285 – 290.

Bernal J.A. 2016*. Estudios ecofisiológicos en aguacate cv. Hass en diferentes ambientes como alternativa productiva en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

Bertling, I., A.K. Cowan. (1998). *Effect of Photo-inhibition on Fruit Growth and Development in Hass Avocado*. South African Avocado Growers' Association Yearbook. 21:36-38.

Björkman O, B. Demmig-Adams. (1994). *Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In E-D Schulze, MM Caldwell, eds, Ecophysiology of Photosynthesis*. Ecological Studies, Vol 100. Springer-Verlag, Berlin, pp 19–47.

Bongi, G., F. Loreto. (1989). *Gas exchange properties of salt-stressed olive (Olea europaea L.) leaves*. Plant Physiol 90: 1408–1416.

Bower J.P. (1978). *The effects of shade and water relations in the Avocado cv edranol.* South African Avocado Growers' Association Research Report for 1978. 2:59-61.

Bower J.P., B. N. Wolstenholme, J.M. De Jager. (1977). *Incoming solar radiation and internal water status as stress factors in avocado, persea americana (mill.) cv edranol*. South African Avocado Growers' Association Proceedings of the Technical Committee. 1:35-40.

Buisson D., D. W. Lee. (1993). *The developmental responses of papaya leaves to simulated canopy shad*e. Am. J. Botany, 80 (8): 947-952.

Cerdas M.M., M. Calderón, E. Corredor. (2006). *Manual de manejo pre y poscosecha de Aguacate*. Centro de investigaciones agronómicas. Universidad de Costa Rica. Costa Rica.

Chartzoulakis K., A. Patakas, G. Kofidis, A. Bosabalidisc, A. Nastou. (2002). *Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars*. Scientia Horticulturae 95: 39–50.

Clough, J. M., R.S. Alberte, J. A. Teeri. (1979*). Photosynthetic adaptation of Solanum dulcamara L. to sun and shade environments*. Plant Physiol 64: 25-30.

Cossio, L. E., L. M. Hernández, J. G. López, R. Gómez, R. Sánchez. (2011). *Flujos de crecimiento vegetativo y reproductivo del aguacate 'hass-méndez' en nayarit, méxico*. Instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias-campo experimental Santiago Ixcuintla. Nyarit, México.

Cowart F. F. (1936). *Apple leaf structure as related to position of the leaf upon the shoot and to type of growth*. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 33: 145-148.

Cutter, E. G. (1978). *Plant Anatomy: Cells and Tissues Part I*, London. William Clowes and Sons: p315.

E. F. Wallihan and R. G. Sharpless. (1970). *The Iron-Chlorophyll Relationship In Young Hass Avocado Leaves*. Florida state horticultural society.

Fischer, G. y J.O. Orduz-Rodríguez. (2012). Ecofisiología en frutales. pp. 54-72. En: Fischer, G. (ed.). Manual para el cultivo de frutales en el trópico Produmedios, Bogotá.

Förster B, C.B. Osmond, B.J. Pogson. (2009). *De novo synthesis and degradation of Lx and V cycle pigments during shade and sun acclimation in avocado leaves*. Plant Physiol 149: 1179–1195.

Förster B, C.B. Osmond, B.J Pogson. (2011*). Lutein from deepoxidation of lutein epoxide replaces zeaxanthin to sustain an enhance capacity for nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in avocado shade leaves in the dark*. Plant Physiol 156: 393–403.

Frank D., Venning, B. Francis b. (1958). *Developmental morphology of the vegetative axis of avocado (persea americana) and its significance to spacing, pruning practices, and yields of the grove*. Proc. Fla. State Hort. Soc 71:350-356.

Gandolfo, S. P. (2008). *Factores Ecofisiológicos Relacionados con el Crecimiento Vegetativo, Floración y Desarrollo del Fruto del Aguacate.* Tesis doctoral. Universidad Politécnica De Valencia. Valencia, España.

García J.I., R. Esteban, B. Fernández, I. Kranner, A. Porcar. (2012*). Thermal energy dissipation and xanthophyll cycles beyond the Arabidopsis mode*l. Photosynth Res 113: 89–103.

García-Plazaola J.I., J.M. Olano, A. Hernández, J.M. Becerril. (2003). *The operation of the lutein epoxide cycle correlates with energy dissipation.* Funct Plant Biol 30: 319–324.

Hadari, M. (2004). *A three-dimensional model of the light regime in an avocado orchard*. Research thesis. Israel Institute of Technology. Shvat, Isarael.

Hanba Y. T., H. Kogami, I. Terashima. (2002). *The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in Acer species differing in light demand*. Plant, Cell and Environment. 25: 1021–1030.

Heisman, P. (1939). Notes on avocado anatomy. California Avocado Society Yearbook: 87-91.

Hirano E. (1931). *Relative abundance of stomata in citrus and some related genera*. Bot. Gaz. 92: 296-310.

Husen J., B. Förster, W. S. Chow, B. J. Pogson, B. Osmond. (2013). *Decreased Photochemical Efficiency of Photosystem II following Sunlight Exposure of Shade-Grown Leaves of Avocado: Because of, or in Spite of, Two Kinetically Distinct Xanthophyll Cycles?.* Plant Physiology 161: 836 – 852.

Issarakraisila, M. and J.A. Considine. (1994). *Effects of temperature on pollen viability in mango cv*. Kensington. Annals of Botany 73: 231-240.

Kadman, A. (1965). *Influence of transpiration and some other factors on the uptake, transport and accumulation of chlorine and sodium in avocado seedlings*. Proceedings of the Symposium on the Use of Isotopes and Radiation in Soil Plant Nutrition Studies, June 28 - July 2 1965, Ankara, Turkey. International Atomic Energy Agency. Viena, Austria. pp.539-562.

Kitajima K. (1994). *Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees*. Oecologia 98: 419–428.

Kozlowski T.T., S.G. Pallardy (1997). *Physiology of Woody Plants*. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Krause, G. H. (1988). *Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damage and protective mechanism*s. Physiol. Plantarum 74: 566-574.

Kubínová, L. (1991). *Stomata and mesophyll characteristics of barley leaf as affected by light: Stereological analysis*. J. Exp. Botany, 42 (241): 995-1001.

Malézieux E., Y. Crozat, C. Dupraz, M. Laurans, D. Makowski, H. Lafontaine, B. Rapidel, S. de Tourdonnet, M. Valantin. (2009). *Mixing Plant Species in Cropping Systems: Concepts, Tools and Models*: A Review. Sustainable Agriculture: 329-353.

Mandemaker, A.J. (2007*). Review: Photosynthesis of avocado*. New Zealand Avocado Growers' Association Annual Research Report Vol 7: 1 – 10.

Matsubara S., B. Förster, M. Waterman, S.A. Robinson, B. J. Pogson, B. Gunning, B. Osmond. (2005). *From ecophysiology to phenomics: some implications of photoprotection and shade –sun acclimation in situ for dynamics of thylakoids in vitro*. Philosphical Transactions of the Royal Society.

Matsubara S, T. Morosinotto, C.B. Osmond, R. Bassi. (2007). *Short- and longterm operation of the lutein-epoxide cycle in light-harvesting antenna complexes*. Plant Physiol 144: 926–941.

Matsubara S, G.H., Krause, M. Seltmann, A.Virgo, T.A. Kursar, P. Jahns, K. Winter. (2008). *Lutein epoxide cycle, light harvesting and photoprotection in species of the tropical tree genus* Inga. Plant Cell Environ. 31: 548–561.

Matsubara S, G.H, Krause, M. Seltmann, A. Virgo, T.A. Kursar, P. Jahns, K. Winter. (2008). *Lutein epoxide cycle, light harvesting and photoprotection in species of the tropical tree genus Inga*. Plant Cell Environment 31: 548–561.

Matsubara S, G.H. Krause, J. Aranda, A. Virgo, K.G. Beisel, P. Jahns, K. Winter. (2009*). Sun-shade patterns of leaf carotenoid composition in 86 species of neotropical plant*s. Funct Plant Biol 36: 20–36.

McMinn A., J.W. Runcie, M. Riddle. (2004*) Effect of seasonal sea ice breakout on the photosynthesis of benthic diatom mats at Casey*, Antarctica. J Phycol 40:62–69.

Medina R., S. Salazar., M. Ortiz., R. Valdivia. (2011). *Variación estacional de la fotosíntesis en varios cultivares de aguacate*. Revista Biociencias 1(3):35-45.

Melgarejo L. M. (2010). *Experimentos en Fisiología Vegetal. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegeta*l. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia.
Mickelbart M. V., R. Miller, S. Parry, M.L. Arpaia, and R. Heath. (2000). *Review: Photosynthesis of avocad*o. California Avocado Society 2000 Yearbook 84:139-150.

Miralles J., J.J. Martínez, J.A. Francoa, S. Bañón. (2011). *Rhamnus alaternus growth under four simulated shade environments: Morphological, anatomical and physiological responses.* Scientia Horticulturae 127: 562–570.

Morales L., A.F. Barrientos, F. Barrientos, M.T. Martínez. (1992). *Obtención de poliploides en aguacate (Persea americana Mill.) mediante el uso de colchicina*. Memoria 1992 de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas, Edo. de México: pp. 89-96.

Neuhaus A (2003)*. Managing irrigation for yield and fruit quality in avocado*. Ph.D. Thesis, School of Plant Biology, University of Western Australia, Perth, Australia.
Opportunities for manipulation in evergreen fruit trees. Acta Horticulturae 275: 451-459.
Perrin R.M., M.L. Phillips. 1978. *Some effects of mixed cropping on the population dynamics of insect pests*. Ent. exp. & appl: 24 (1978) 385—393.

Ralph P.J., S.M. Polk, K.A. Moore, R.J. Orth, W.O. Smith. (2002). *Operation of the xanthophyll cycle in the seagrass Zostera marina in response to variable irradianc*e. J Exp Mar Biol Ecol 271:189–207.

Ralph PJ, R. Gademann (2005). *Rapid light curves: a powerfull tool to assess photosynthetic activity.* Aquat Bot 82:222–237.

Reigosa, M. J., N. Pedrol. (2003*). La ecofisiología vegetal*. En: Reigosa, M. J.; Pedrol, N.; Sán-chez, A. *La Ecofisiología Vegetal: Una Ciencia de Síntesis*. Research Thesis for the Degree of Master of Science of Agricultural Engineering (Water, Soil and Environmental Engineering). Israel Institute of Technology. Haifa, Israel. 107 p.

Rijkers T., T.L. Pons, F. Bongers. (2000) *The effect of tree height and light availability on photosynthetic leaf traits of four neotropical species differing in shade tolerance*. Functional Ecology 14: 77–86.

Rodrigo, V.H.L., C.M. Stirling, Z. Teklehaimanot, A. Nugawela. (1997). *The effect of planting density on growth and development of component crops in rubber/banana intercropping systems*. Field Crops Res. 52:95–108.

Rodrigo, V.H.L., C.M. Stirling, Z. Teklehaimanot, A. Nugawela. (2001). *Intercropping with banana to improve fractional interception and radiation-use efficiency of immature rubber plantations*. Field Crops Res. 69:237–249.

Romero, M. A. (2012). *Comportamiento fisiológico del aguacate (Persea americana mill.) Variedad Lorena en la zona de Mariquita, Tolima*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados. Bogotá, ColombiaEspaña: Thomson. pp. 1-57.

Saavedra G. (1993) *Determinación de índices para selección hacia porte bajo en aguacate*. In: Memoria 1993 de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S. C. Coatepec Harinas, México. Diciembre 1993. pp: 129-137.

Saavedra G, H.D. vásquez, E. Mejía. (2012). *Aguacate (Persea americana Mill*.). pp. 319-348. En: Fischer, G. (ed.). *Manual para el cultivo de frutales en el trópico*. Produmedios, Bogotá.

Schaffer B., A.W. Whiley. (2002). Environmental physiology. In: Whiley AW, Schaffer B, Wolstenholme BN. (eds) Avocado: Botany, Production and Uses. CABI Publishing. Oxon, U.K. pp. 135-160.

Schaffer, B., A.W. whiley. (2003). *Environmental regulation of photosynthesis in avocado trees – a mini-review*. Proceedings V World Avocado Congress. pp. 335-342.

Schreiber U, R. Gademann, P.J. Ralph, A.W. Larkum. (1997) *Assessment of photosynthetic performance of Prochloron in Lissoclinum patella in hospite by chlorophyll fluorescence measurements*. Plant Cell Physiol 38: 945–951.

Sedgley, M. and W. J. Grant. (1983*). Effect of low temperatures during flowering on floral cycle and pollen tube growth in nine avocado cultivars*. Scientia Horticulturae, 18: 207-13.

Serodio J, S. Vieira, S. Cruz, F. Barroso. (2005a) *Short-term variability in the photosynthetic activity of microphytobenthos as detected by measuring rapid light curves using variable fluorescence*. Mar Biol 146:903–914.

Serodio J., S. Vieira, S. Cruz, H. Coehlo. (2006). *Rapid light-response curves of chlorophyll fluorescence in microalgae: relationship to steady-state light curves and non-photochemical quenching in benthic diatom-dominated assemblages*. Photosynth Research 90:29–43.

Smith, G. S., Buwalda, J. G., Green, T. G. A. AND Clark, C. J. (1989). *Effect of oxygen supply and temperature at the root on the physiology of kiwifruit vines.* New Phytologist 113: 431-437.

Solarte, M.E., L.V. Pérez Y L.M. Melgarejo. (2010). Ecofisiología vegetal. pp. 137-167. En: Melgarejo, L.M. (ed.). *Experimentos en fisiología vegetal*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Sousa E.A., E. A. Paiva, I. R. Dos Santos, V. F. Aguiar, Henrique. (2003) *The Influence of Light Intensity on Anatomical Structure and Pigment Contents of Tradescantia pallida (Rose) Hunt. cv. purpurea Boom (Commelinaceae) Leaves*; Brazilian Archives Of Biology And Technology.

Sprugel D.G., J.R. Brooks, T.M. Hinckley. (1996) *Effect of lighton shoot and needle morphology in Abies amabilis*. Tree Physiology 16: 91–98.

Stenberg P., T. Kangas, H. Smolander, S. Linder. (1999). *Shoot structure, canopy openness, and light interception in Norway spruce*. Plant, Cell and Environment 22: 1133–1142.

Storey, W.B.; Bergh, B.; Zentmyer, G.A. (1987). T*he origin, indigenous range and dissemination of the avocado*. California Avocado Society Yearbook 70: 127-133.

Strauss S., G.P. Berlyn. (1994). *Leaf anatomical responses to light in life tropical Moraceae of different successional status*. Am. J. Botany 81 (12): 1582-1591.

Valladares, F. 2006. La disponibilidad de luz bajo el dosel de los bosques y matorrales ibéricos estimada mediante fotografía hemisférica. Ecología 20: 11-30.

Van Schaik C.P., J.W. Terborgh, S.J. Wright. (1993). The phenology of tropical forest: adaptative, significance and consequences for primary consumers. Annu. Rev. Ecol. Syst.

Vogelmann, T. C., G. Martin. (1993) *The functional significance of palisade tissue: penetration of directional versus diffuse light*. Plant, Cell Environ 16: 65-72.

Walters M.B., P.B. Reich. (1999) *Low-light carbon balance and shade tolerance in the seedlings of woody plants: do winter deciduous and broad-leaved evergreen species differ?* New Phytologist 143: 143–154.

Wellburn A. R. (1994). *The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution.* Plant Physiology 144: 307-313.

Whiley, A.W. and E.C. Winston. (1987). *Effect of temperature at flowering on varietal productivity in some avocado-growing areas in Australia*. South African Avocado Growers' Association Yearbook, 10: 45-7.

Whiley, A.W., K. Chapman., J. Saranah. (1988). *Water loss by floral structures of avocado cv. Fuerte during flowering*. Australian Journal of Agricultural Research 39; 457-467.

Whiley, A.W. and Schaffer, B. (1994). A*vocado*, pp.3-35. In: CRC *Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops*. Vol. I. Subtropical and Tropical Crops. B. Schaffer, P.C. Andersen (eds.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. USA.

White A.J., C. Critchley. (1999*). Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus*. Photosynth Res 59:63–72.

Wolstenholme B. N. (1990*). Resource allocation and vegetative reproductive competition: opportunities for manipulation in evergreen fruit trees*. Acta Horticulturae 275:451-459.

Wolstenholme, B.N., (1977). *A simple climatic classification for tropical and subtropical areas and fruits in South Africa*. Crop Prod. 6, 35 - 39.

Wolstenholme B.N. (1990). *Resource allocation and vegetative reproductive competition:*

Wolstenholme, B. N., A. W. Whiley. (1999). *Ecophysiology of the avocado (persea americana mill.) tree as a basis for pre-harvest management.* Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 77-88.

Wolstenholme BN. (2002). *Ecology: climate and the edaphic environment.* In: Whiley AW, Schaffer B, Wolstenholme BN (eds) *Avocado: Botany, Production and Uses*. CABI Publishing, Oxon UK, pp 71-99.