



## EFFECTO DE BIOCONTROLADORES SOBRE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE HONGOS DE SUELO EN UN CULTIVO DE MARACUYÁ (*Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*)

Óscar A. Granobles    Celina Torres G.  
Universidad del Valle

Recibido: julio 23, 2013

Aceptado: noviembre 18, 2013

Págs. 151-162

### Resumen

Las poblaciones fúngicas del suelo se encuentran involucradas en un amplio rango de procesos ecosistémicos, como la participación en los ciclos biogeoquímicos, descomposición de materia orgánica y en la causa de algunas enfermedades de especies vegetales. En la ola invernal del 2010, en los suelos del Norte del Valle del Cauca, se generó probablemente un cambio en la dinámica poblacional de hongos patógenos asociados al cultivo de Maracuyá, debido al cambio de condiciones ambientales del suelo. Esta investigación estuvo encaminada a determinar cómo la dinámica de las poblaciones de hongos varía con respecto a diferentes tratamientos. Se comparó la diversidad, abundancia y riqueza de hongos del suelo, en parcelas tratadas con una mezcla de *Trichoderma harzianum* - *Bacillus subtilis*, Vinazas y manejo convencional con fertilizantes:  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$  y FOSS 61 y la mezcla: DAP, Triple 15 y KCL, en la finca “La Esperanza” municipio de Roldanillo. Las cepas aisladas y purificadas se caracterizaron morfológicamente a través de claves taxonómicas. Se identificaron 13 especies, 28 morfotipos: 17 géneros y 2 morfoespecies. El ANOVA no mostró diferencias significativas en diversidad ( $p=0.31$ ), abundancia ( $p=0.98$ ) y riqueza ( $p=0.50$ ). Las especies de *Trichoderma* no fueron significativamente abundantes y no se observó actividad biocontroladora, pero su presencia en el suelo participa en la transformación de los agroquímicos utilizados, restaurando los terrenos intervenidos. Por su parte *Bacillus subtilis*, presentó actividad antibiótica sobre los hongos patógenos aislados del suelo, confirmando su actividad como biocontrolador, mientras que las vinazas no mostraron diferencias con respecto a los biocontroladores y los agroquímicos no mostraron efecto inhibitorio de hongos patógenos en la época de sequía.

**Palabras claves:** Suelo, hongos filamentosos, bacterias antagonicas, vinazas, control biológico.

### Abstract

Soil fungal populations are involved in a wide range of ecosystem processes, such as the biogeochemical cycles, decomposition of organic matter and some plant diseases. In the rainy season of 2010, in the soils of the North of the Valle del Cauca State, Colombia, a change occurred in the population dynamics of pathogenic fungi in passion fruit crops, probably because of the soil environment changes. This investigation aimed to determine the dependence of the dynamics of fungal populations with respect to different soil treatments. The diversity, abundance and richness of soil fungi was studied in plots as a function of soil treatment with three blends: a mixture of *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, and vinasses; a blend of conventional fertilizers ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ) and FOSS 6; and a blend of DAP, Triple 15 and KCl. Experiments were conducted in “La Esperanza” homestead in the outskirts of the municipality of Roldanillo. Strains were isolated, purified and morphologically characterized by taxonomic keys.

Thirteen species, 28 morphotypes (17 genera and 2 morphospecies) were identified. ANOVA showed no significant difference in diversity ( $p = 0.31$ ), abundance ( $p = 0.98$ ), and richness ( $p = 0.50$ ). *Trichoderma* species were not significantly abundant and no biocontrolling activity was observed. However, *Trichoderma* participates in the degradation of the agrochemicals, restoring the intervened soil. Meanwhile, *Bacillus subtilis* showed antibiotic activity on pathogenic fungi isolated from the soil, evidencing biocontrol activity. Vinasse did not behave differently from the biocontrollers and the agrochemicals did not show inhibitory effect of pathogenic fungi in the dry season.

**Keywords:** soil, filamentous fungi, Biological control

## 1 Introducción

El uso irracional de productos químicos ha generado serios problemas al ambiente, como es el caso de los insecticidas que se encuentran entre las herramientas agrícolas que están más asociadas con el daño ambiental, debido a que estos tienen como objetivo específico eliminar plagas, que generan un impacto letal o subletal en organismos que no son su objetivo, por ejemplo recicladores de nutrientes del suelo, polinizadores de plantas y depredadores de plagas (Devine *et al.*, 2008). Además las mismas plantas de cultivo son afectadas por los fertilizantes, causando toxicidad en los alimentos que consume la población humana (Arauz, 1998).

En los últimos años la agricultura se ha centrado en el estudio de los procesos naturales que ejercen los microorganismos antagónicos, que permiten la regulación de las poblaciones dentro de una dinámica equilibrada. Las investigaciones en control biológico han logrado identificar varios organismos que a través de diferentes mecanismos, ejercen un control natural sobre insectos plaga y enfermedades de especies vegetales de importancia económica (Probioma, 2008)

Uno de los microorganismos con mayor efecto antagónico comprobado debido a su ubicuidad, facilidad de aislamiento, rápido crecimiento, control de amplio rango de patógenos, acción como hiperparásito y alta competencia por alimento y espacio es *Trichoderma* spp. (Wells, 1988). Entre Bacterias antagonistas, *B. subtilis* ha demostrado eficiencia en el control de algunos patógenos como: *Curvularia*, *Alternaria*, *Fusarium*, entre otros (Lisboa, 2003).

Teniendo en cuenta que el suelo es el medio natural donde las comunidades microbianas encuentran condiciones favorables para su desarrollo y también es el escenario donde pueden llevar a cabo complejas y diversas interacciones entre los componentes abióticos y otros componentes bióticos del suelo, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de biocontroladores sobre la dinámica poblacional de hongos del suelo asociados a un cultivo de maracuyá *P. edulis Sims var. Flavicarpa* en el municipio de Roldanillo, Valle del Cauca, considerado como uno de los municipios más productivos del país, donde la cultura del uso de los agroquímicos se mantiene y se han presentado problemas de inundaciones en años anteriores, generando posiblemente una alteración a la dinámica microbiana y por ende la proliferación de enfermedades (figura 1).



Figura 1. Mancha parda causada por *Alternaria passiflorae*

## 2 Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo entre los meses de Mayo y Octubre de 2012 en la finca “La Esperanza”, ubicada en la vereda “El Rincón” del corregimiento de Puerto Quintero; área rural del municipio de Roldanillo, Valle del Cauca con unas coordenadas de N 4° 4’ 42.6” W 76° 4’ 49.7” con una altitud de 966 m.s.n.m, temperatura promedio de 28°C y humedad relativa del 58%. Se tomó una parcela 1080 m<sup>2</sup> (80m de largo x 13.5m de ancho) como área de trabajo. Se sembraron 270 plántulas de Maracuyá distribuidas en 9 surcos a una distancia de 2.6m entre plántulas y 1.5m entre surcos.

Se establecieron tres surcos para la aplicación de los controladores biológicos *T. harzianum* –*B. subtilis* (Th+B<sub>s</sub>), 3 surcos para el tratamiento con Vinazas (V) como otra alternativa biológica y 3 surcos para el Manejo Convencional con químicos (MC). Las aplicaciones se realizaron cada 20 días durante el periodo de estudio. Adicionalmente se registraron parámetros ambientales como temperatura, humedad relativa y radiación solar, mediante una estación meteorológica portátil.

Las muestras de suelo fueron tomadas aleatoriamente y posteriormente procesadas en el Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM), mediante diluciones seriadas y sembradas en medio de cultivo Rosa de Bengala (Figura 2). Para la identificación de las cepas se aislaron en medio PDA y se utilizaron las claves taxonómicas de Watanabe, (2002).

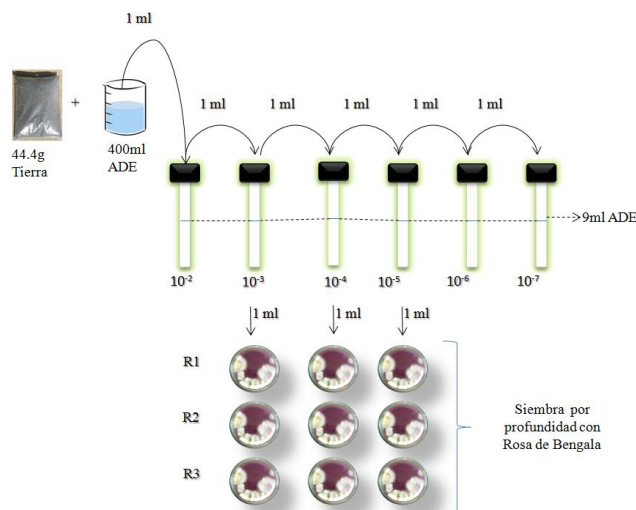


Figura 2. Metodología dilución seriada

Se trabajó con las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  debido a que las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  presentaban más de 300 UFC y las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  presentaron menos de 30 UFC.

### 3 Resultados y discusión

Durante el desarrollo de la investigación se presentaron temperaturas desde 28.3°C en el mes de Mayo hasta 39.9 °C en el mes de Agosto y una humedad relativa desde 50.9% en el mes de Junio hasta 66.5% en el mes Julio y radiaciones solares entre 757 w/m<sup>2</sup> en el mes de Junio y 850 w/m<sup>2</sup> en el mes de Agosto (figura 3).

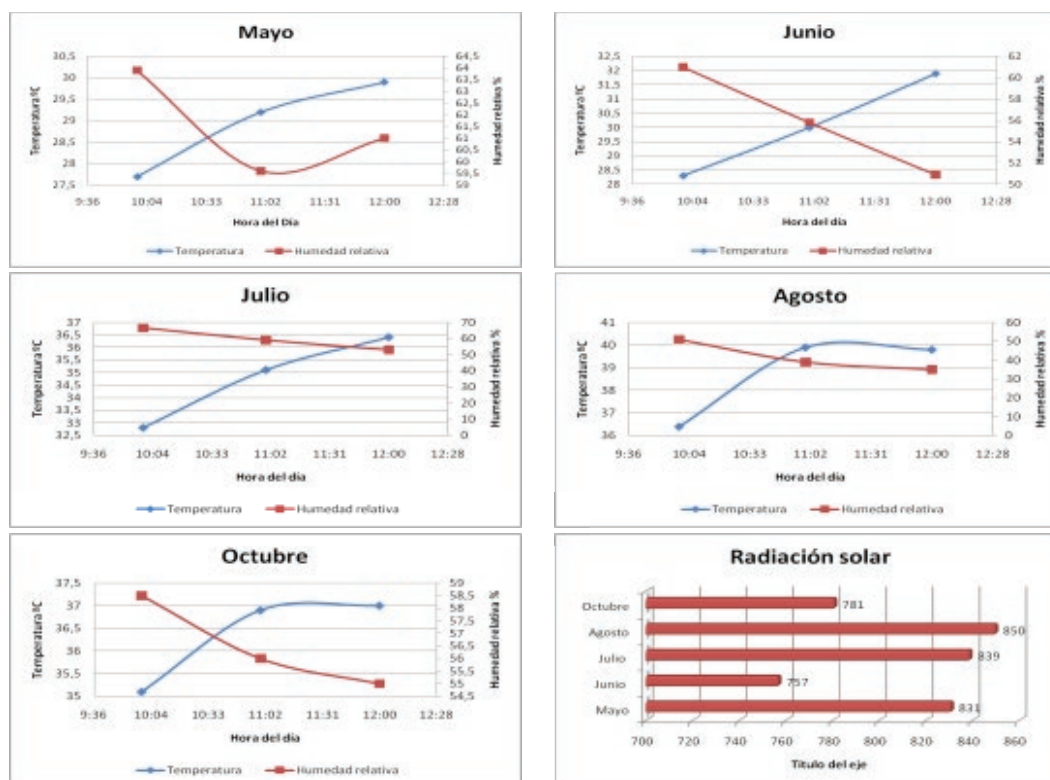


Figura 3. Registro de temperatura, humedad y radiación solar en el periodo evaluado.

En los muestreos realizados en campo se caracterizaron 13 especies, 28 morfotipos: 17 géneros y 2 morfoespecies fúngicas (tabla 1).

Tabla 1. Morfoespecies fúngicas aisladas del suelo.

Especie-Género	Control	Biológicos (Th+Bs)				Vinazas (V)			Manejo Convencional (MC)			
		Jun	Jul	Agos	Oct	Jul	Agos	Oct	Jun	Jul	Agos	Oct
<i>Aspergillus humicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
<i>Aspergillus nidulans</i>	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X
<i>Aspergillus parasiticus</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus seccion clavati</i>	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X
<i>Aspergillus sp2</i>	-	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	X	-	X	-	X	X	-	-	X	X	-	X
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
<i>Penicillium verruculosum</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium citrinum</i>	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sp1</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
<i>Penicillium sp2</i>	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sp3</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sp4</i>	-	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Penicillium sp5</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
<i>Penicillium sp6</i>	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mucor sp1</i>	X	-	X	-	X	-	-	-	-	X	-	X
<i>Mucor sp2</i>	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Curvularia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
<i>Phytophthora sp.</i>	X	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	X
<i>Botryotrichum sp.</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium sp1.</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
<i>Fusarium sp2</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	X
<i>Verticillium sp1.</i>	X	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
<i>Verticillium sp2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	X	X	X	X	X	-	X	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces sp.</i>	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces inflatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
<i>Mortierella sp</i>	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum sp</i>	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X
<i>Uncinula sp.</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cephalosporium sp1</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cephalosporium sp2</i>	-	-	-	X	-	X	-	-	-	X	-	X
<i>Chalaropsis sp</i>	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-
Morfoespecie 1	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
Morf especie 2	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma sp1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
<i>Trichoderma sp2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
<i>Gliocladium sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
<i>Nigrospora sp</i>	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
<i>Curvularia lunata</i>	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-

Las especies más abundantes fueron *A. nidulans*, *A. niger*, *P. citrinum*, *Penicillium sp1*, *Penicillium sp4*, *Penicillium sp6*, *Verticillium sp2* y *Cephalosporium sp1* (figura 4).

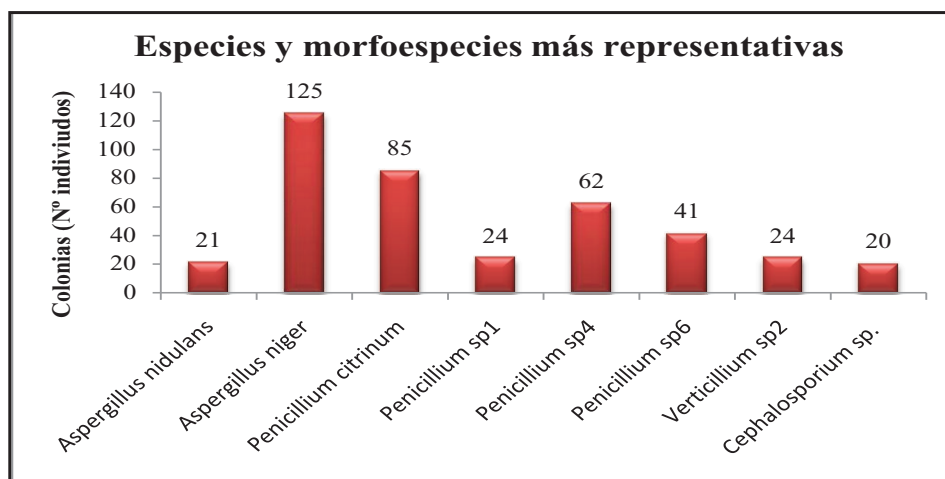

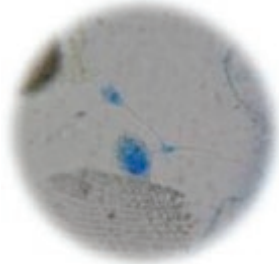
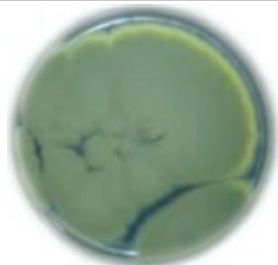
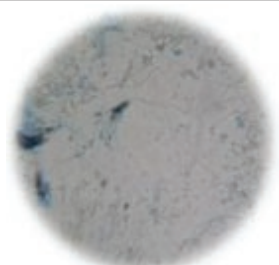
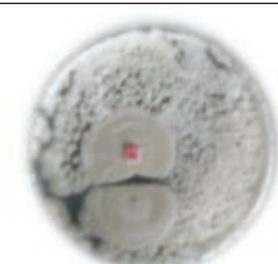
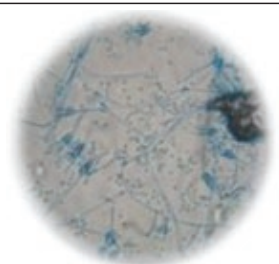
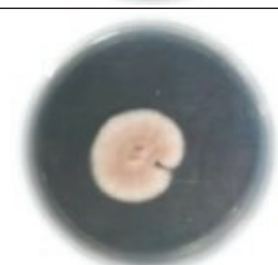
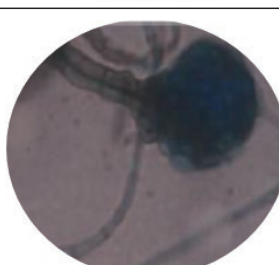

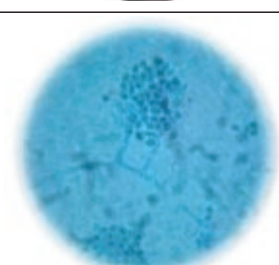


Figura 4. Especies fúngicas encontradas con mayor frecuencia.

Tabla 2. Observación macroscópicas y microscópicas de las especies fúngicas encontradas con mayor frecuencia.

Especie	Observación	
	Macroscópicas	Microscópicas
<i>Aspergillus nidulans</i>		
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Penicillium citrinum</i>		

<i>Penicillium</i> sp1		
<i>Penicillium</i> sp2		
<i>Penicillium</i> sp6		
<i>Verticillium</i> sp2		
<i>Cephalosporium</i> sp.		

*A. niger* y *Penicillium* spp, son considerados por muchos investigadores como hongos benéficos en la solubilización de fosfatos presentes en el suelo (Pérez *et al.*, 2012), sin embargo estos son considerados patógenos, especialmente en frutas cítricas (Martínez, 2003; Brakhage *et al.*, 1999).

Las familias más abundantes a lo largo del estudio estuvieron representadas por la familia Trichocomaceae con 421 individuos o colonias, seguidos por Hypocreaceae

con 37 individuos, Nectriaceae con 26 individuos, Mucoraceae con 23 individuos y Davidiellaceae con 15 individuos (figura 5).

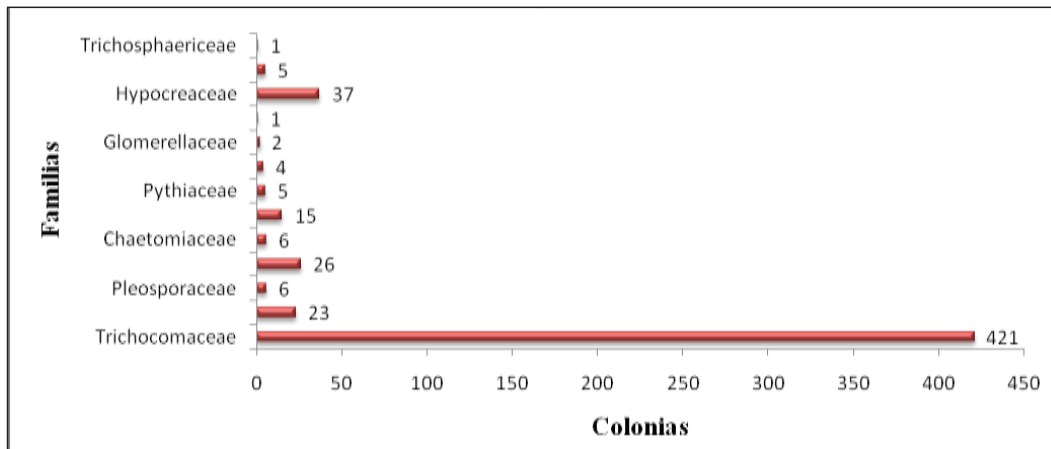


Figura 5. Abundancia de familias encontradas

Al comparar las especies y morfoespecies más abundantes por cada tratamiento se encontró que *A. niger* fue la especie más representativa para todos los tratamientos, seguido de *Cephalosporium* sp2 y *C. cladosporioides* en los tratamientos Biológico-Convencional y Convencional-Vinazas respectivamente (figura 6).

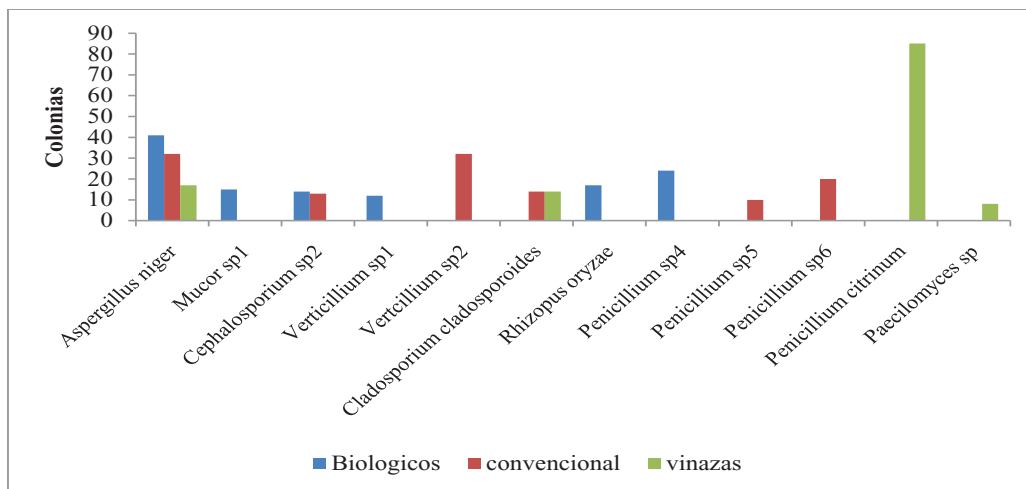


Figura 6. Abundancia de especies por tratamiento.

La comparación de las especies más abundantes demostró que los tratamientos biológico y convencional fueron los que albergaron las especies fúngicas con mayor frecuencia, sin embargo en el tratamiento vinazas se encontró a *P. citrinum* como la especie más abundante por tratamiento y aislamiento. Esta especie es típica de las épocas de sequía y fue aislada frecuentemente en el mes de agosto, donde la temperatura registró hasta 39.9°C, lo cual concuerda con lo reportado por Mok *et al.*, (1997) y Lurá *et al.*, (2001), donde afirman que la temperatura requerida para el crecimiento de este microorganismo fluctúa entre 30-40°C.



La importancia del agua sobre la microbiota fúngica radica en que ésta es el solvente por excelencia de casi todas las reacciones químicas y enzimáticas de las células y tiene un efecto directo sobre la abundancia y riqueza de especies, por lo tanto tener una humedad relativa adecuada es indispensable para cualquier hongo u organismo vivo. Cuando el agua es mínima, la capacidad para catalizar reacciones químicas es deficiente o simplemente carece de ellas (Orpurt y Curtis, 1957), tal es el caso de géneros fúngicos utilizados como biofertilizantes y/o biocontroladores como *Trichoderma*. En el mes de Mayo, después de la colecta control, se adicionó (*T. harzianum* y *B. subtilis*) como tratamiento Biológico. Para los meses de Junio y Julio se aisló a *T. harzianum*, lo que indica que las condiciones ambientales fueron las mínimas necesarias para su germinación y posterior crecimiento. Sin embargo en los meses siguientes, *T. harzianum* no se encontró en las muestras de suelo analizadas. En experimentos realizados a temperaturas entre 25 y 30°C y en humedades superiores a 80%, el hongo *T. viride* presenta un mejor crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial (Pérez *et al.*, 1990), posiblemente al presentar temperaturas tan altas entre los meses de Agosto a Octubre no se dieron las condiciones necesarias para la germinación de las esporas del hongo.

El ANOVA mostró que la humedad relativa presentada en el mes de Agosto (promedio 42%) fue significativamente diferente a los meses de Mayo (promedio 62%) y Julio (promedio 60%). Por tanto se podría considerar que la humedad fue un factor determinante para la germinación y desarrollo de *T. harzianum*.

En estudios sobre solarización (radiación solar), se afirma que *T. spp.* y *B. subtilis* son microorganismos resistentes a este efecto, incluso superan a organismos patógenos, pero las temperaturas alcanzadas por la solarización no siempre son letales para los patógenos ni para los antagonistas y por tanto se reducen las probabilidades de un vacío biológico (Cebolla *et al.* 1991), esto se confirma con los parámetros ecológicos como la riqueza, abundancia y diversidad de especies que a pesar que en ciertos meses las condiciones ambientales no fueron del todo óptimas, la abundancia de hongos no mostraron diferencias significativas en los tres tratamientos, (figura 7 y 8). Aunque no hubo diferencias significativas entre los parámetros ecológicos, se puede inferir que los tratamientos Biológico y Convencional obtuvieron el mayor número y abundancia de especies, determinándose así que estas prácticas son benéficas para el medio ambiente y la biodiversidad.

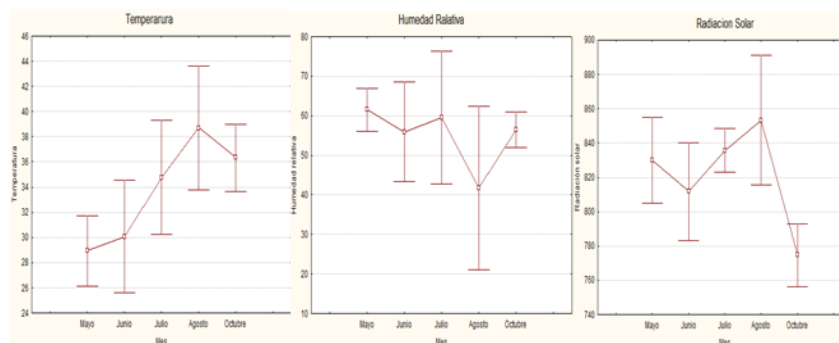


Figura 7. ANOVA de Temperatura, Humedad Relativa y Radiación Solar.

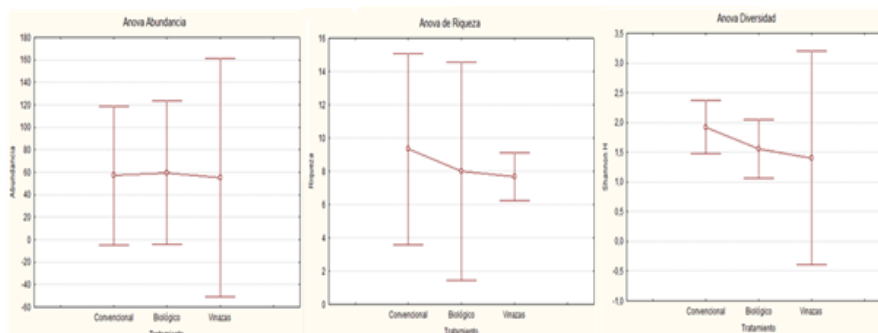


Figura 8. ANOVA de Abundancia, Riqueza y Diversidad de Especies.

#### 4 Conclusiones

Las condiciones ambientales como la temperatura y la humedad relativa fueron las adecuadas para el crecimiento y desarrollo de hongos mesófilos y xerofíticos de regiones tropicales y de época de sequía, lo cual se evidencia en la abundancia de individuos y la cantidad de especies y morfoespecies identificadas.

En este estudio no se pudo evidenciar una clara diferencia entre los controladores biológicos y las vinazas, sin embargo, se puede llegar a tener un buen efecto sobre la dinámica poblacional de hongos benéficos al cultivo de maracuyá y mejorar la calidad de los suelos al producirse un incremento en la microbiota no sólo fúngica sino también bacteriana.

Las especies de *Trichoderma* no fueron significativamente abundantes en el suelo mientras que *Bacillus subtilis*, si se observó con mayor frecuencia y mostró actividad antibiótica sobre los hongos patógenos, confirmándose su actividad como biocontroladora,

*Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* fueron los géneros más abundantes en el suelo del cultivo de maracuyá en Roldanillo, Valle del Cauca, debido a su papel como saprofitos facultativos, rápida capacidad de dispersión y ubicuidad

Se evidenció la presencia de hongos como *Penicillium citrinum*, *Cladosporium cladoporioides*, *Curvularia* sp, *Curvularia lunatus* y *Aspergillus niger* reconocidos patógenos típicos en épocas de sequía.

Las vinazas son otra buena alternativa para el incremento de la microbiota del suelo, ayudando de esa manera el bienestar del cultivo.

#### Agradecimientos

Agradecimientos a la Vicerrectoría de Investigaciones quienes apoyaron financieramente con recursos de convocatoria interna esta investigación enmarcada dentro del proyecto “Optimización del uso del recurso hídrico en cultivos de maracuyá (*pasiflora edulis*) como estrategia de competitividad en la cadena productiva en el distrito RUT”

donde participó el Grupo Biología de Plantas y Microorganismos de la Sección de Botánica del Departamento de Biología. Agradecemos al grupo REGAR quienes actuaron como coordinadores del Proyecto, al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM) y al personal de la Finca La Esperanza por su apoyo durante el desarrollo del trabajo.

### Referencias bibliográficas

- [1] Arauz F. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. 1ª edición. Editorial Universidad de Costa Rica. 467 p.
- [2] Brakhage A., Jahn B & Schmidt A. 1999. *Aspergillus fumigatus*: Biology, Clinical Aspect and Molecular Approaches to Pathogenicity. 1a edición. Editorial Karger. 221 pág.
- [3] Cebolla V., Matinéz P., del Busto A. & de Barreda G. 1991. La Horticultura Española, capítulo La desinfección del suelo por Energía Solar (Solarización). Una técnica no contaminante para la agricultura del futuro. 1ª edición. Ediciones de Horticultura. 464 p.
- [4] Devine G., Eza D., Ogasuku E. & Furlong M. 2008 Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. Rev peru med exp salud pública. Volumen 25: 74-100 p.
- [5] Lisboa M. 2003. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en Vid vinífera, trabajo de grado para optar el título de ingeniero agrónomo de la Universidad de Talca. 49p 2003
- [6] Lurá M., Fuentes M., Cabagna M., González A., Nepote A., Giugni M., Rico M. & Latorre M. 2001. Actividad de metabolitos de *Penicillium citrinum* sobre ratones *Mus musculus*. Revista iberoamericano de Micología, 18: 183-186 p.
- [7] Martínez E. 2003. Estudio de especies micotoxígenas del género *penicillium*: *penicillium verrucosum*. Tesis para optar el título de doctor en ciencias veterinarias de la universidad autónoma de Barcelona. 288 p.
- [8] Mok T., Koehler A., Yu M., Ellis D., Johnson P. & Wickhan N. 1997. Fatal *penicillium citrinum* pneumonia with pericarditis in a patient with acute leukemia. *Clinical Microbiology*. 35(10): 26-54 p.
- [9] Pérez A., de la Ossa J. & Montes D. 2012. Hongos solubilizadores de Fosfatos en Fincas Ganaderas del Departamento de sucre. *Revista Colombiana de Ciencias*. 4(1) 35-45 p.
- [10] Pérez N., Martínez B. & Díaz R. 1990. Efecto de diferentes condiciones de cultivo en el desarrollo de *Trichoderma viride*. *Revista de protección vegetal*, V5 (1-3) 38-44 p.

- [11] Probioma. 2008. Manuel de manejo ecológico de plagas: Métodos de producción ecológica y control biológico.
- [12] Watanabe, T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. Lewis Publisher. Boca Ratón, Florida, USA. 41- 250 p.
- [13] Wells. H. D. 1988 “Trichoderma as abiocontrol agent”, in Biocontrol of Plant Diseases, Vol I. Mukerji. K.G & Garg. K.L Eds CRC: Press, Boca, Ratón, FL

### **Dirección de los autores**

Óscar A. Granobles

Estudiante, Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali - Colombia  
oscargranobles@gmail.com

Celina Torres G.

Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali - Colombia  
celina.torres@correounivalle.edu.co