

**POBLACIONES DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZÓSFERA DEL
CULTIVO DE LA CALABAZA (*Cucurbita moschata* Dutch.) DURANTE UN
PROGRAMA DE AGRICULTURA SUSTENTABLE**

Por

Mariela González Vázquez

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En

Protección de Cultivos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2005

Aprobado por:

Evelyn Rosa, MS.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Carlos Flores, MS.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

José A. Chavarría Carvajal, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Myrna Alameda, MS.
Representante Escuela Graduada

Fecha

Nelson Semidey, Ph. D.
Director del Departamento

Fecha

Agradecimientos

Al Dr. José Andrés Chavarría Carvajal por su ayuda, por la confianza y la oportunidad de ser parte de sus proyectos.

Al Agro. Carlos Flores y a la Investigadora Evelyn Rosa por su ayuda y por aceptar ser parte de mi comité.

Al Sr. Luis Silva Negrón por su disposición a ayudarme.

Al Departamento de Protección de Cultivos, en especial a sus dos secretarias María Pagán y Jeanette. Morales

A la Dra. Lydia Rivera por su ayuda en el campo de la micología.

A la Profesora Myrna Alameda por su ayuda incondicional.

A mis compañeros de tesis Sor Yathira Rosado y José Carlos Santiago. Nunca olvidaré los buenos momentos que pasamos juntos trabajando en la tesis.

A mi amiga Idarnis Gaztambide por su ayuda en mis momentos de crisis.

A mi familia por darme su apoyo moral para que realizara este proyecto

A todas las personas que me quieren de verdad, porque son mi energía para seguir adelante todos los días.

Abstract

Pumpkin (*Cucurbita moschata* Dutch), is the most economically important vegetable in Puerto Rico. During the period 2003-2004 the production was 285,903 hundredweights (cwt.), with a farm value of \$ 5.8 millions. Methyl bromide (CH₃Br) is a gaseous fumigant used worldwide as soil disinfectant, previous to the seeding of many crops like vegetables and fruits. Recently the used of this chemical have been questioned, due to that depletes the ozone cap of the Earth. For this reason the search of new alternatives to methyl bromide that are not hazards for the environment has been intensified. Some of these alternatives include the combination of techniques such as crop rotation, organic amendments and solarization. During the study of new alternatives is important to follow the changes in populations levels and frequency of the microorganisms associated to the rhizosphere of the main crop. The treatments evaluated were: T1. Corn (var. "Mayorbela") plus a cycle of pumpkin; T2. Velvetbean (*Mucuna deeringiana*) plus a cycle of pumpkin; T3. Soil incorporation of organic matter (7.3 kg/plant of poultry litter) plus two cycles of pumpkin; T4. Soil solarization (120 days) plus a cycle of pumpkin; T5. Chemical control (Nemacur 15 G 3.0 g a.i./plant) plus two cycles of pumpkin; and T6. Absolute control (two cycles of pumpkin). For the isolation of fungi and bacteria 10-g soil from each treatment was used to prepare serial dilutions to 10⁻⁴. Rose Bengal Streptomycin Agar was used for the isolation of fungi. Total bacteria population was isolated in Tryptic Soy Agar (TSA 5 %). Also, selective media and a chitin-amended media were used for the isolation and identification of fungi and bacteria. Differences between treatments were observed when the means were compared using LSD $P \leq 0.05$. The most frequently isolated chitinolytic-fungi were *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *Humicola* spp. y *Trichoderma* spp. After the use of crop rotation, organic amendments and solarization, bacterial composition changed to a predominant Gram positive population. Therefore, the sustainable agricultural practices changed the soil microflora, diversifying it and increasing its population levels.

Resumen

La calabaza (*Cucurbita moschata* Dutch), es la hortaliza de mayor importancia económica en Puerto Rico. Durante el período 2003-2004 la producción de calabaza fue de 285,903 quintales, con un valor de \$5.8 millones. El bromuro de metilo (CH_3Br) es un fumigante gaseoso utilizado a nivel mundial como desinfectante del suelo, previo a la siembra de una amplia gama de cultivos, entre los que se encuentran las hortalizas y frutales. Recientemente su uso ha sido cuestionado debido a que es uno de los mayores contribuyentes a la reducción de la capa de ozono de nuestro planeta. Por esta razón, se ha intensificado la búsqueda de nuevas alternativas al bromuro de metilo que no afecten adversamente el ambiente. Algunas de estas alternativas incluyen la combinación de técnicas como la rotación de cultivos, enmiendas orgánicas y la solarización. Durante el estudio de nuevas alternativas es importante dar seguimiento a los cambios en los niveles poblacionales y frecuencia de los microorganismos asociados a la rizósfera del cultivo. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: T1. Rotación de maíz (*Zea mays* var. “Mayorbela”) más un ciclo con calabaza; T2. Rotación del haba de terciopelo (*Mucuna deeringiana*) más un ciclo con calabaza; T3. Incorporación presiembra de materia orgánica al suelo (7.3 Kg./planta de gallinaza) más dos ciclos de calabaza; T4. Solarización (periodo de 120 días) más calabaza; T5. Control químico (Nemacur15 G 3.0 g i.a/planta) más dos ciclos de calabaza; y T6. Control absoluto (dos ciclos de calabaza). Para el aislamiento de hongos y bacterias se utilizaron 10 g de una muestra compuesta de suelo de cada uno de los tratamientos, realizando diluciones seriadas hasta 10^{-4} . Los hongos fueron aislados en agar con rosa de bengala y estreptomina, y las poblaciones totales de bacterias en agar de soya tréptico al 5 %. Se utilizaron medios diferenciales y enmendados con quitina para la clasificación e identificación de hongos y bacterias. Durante los dos ciclos de cultivo se observaron diferencias significativas ($\text{DMS } P \leq 0.05$) en los niveles poblacionales de hongos y bacterias asociados a la rizósfera. Los hongos más frecuentemente aislados fueron *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *Humicola* spp. y *Trichoderma* spp. Los tratamientos de rotación de cultivos, materia orgánica y solarización cambiaron las poblaciones bacterianas a una predominante Gram positivo. Por lo tanto, las prácticas de agricultura sustentable cambian la microflora del suelo al diversificarla y aumentar su nivel poblacional.

Tabla de Contenido

Lista de Cuadros.....	vii
Lista de Figuras.....	ix
Introducción.....	1
Objetivos.....	6
Revisión de Literatura.....	7
I. Agricultura Sustentable.....	7
II. Los microorganismos de la rizósfera del suelo.....	8
III. Rotación de Cultivos.....	10
IV. Materia Orgánica.....	13
V. Solarización.....	16
Materiales y Métodos.....	21
I. Localización del experimento.....	21
II. Fase de Campo.....	21
III. Fase de Laboratorio.....	23
1. Hongos.....	23
2. Bacterias.....	25
IV. Análisis estadístico.....	26
Resultados.....	27
I. Primer ciclo de Cultivo.....	27
1. Nivel poblacional de los hongos.....	27

2. Diversidad de hongos.....	27
3. Actividad quitinolítica de los hongos.....	29
II. Hongos a 60 días después del segundo ciclo.....	34
1. Nivel poblacional de los hongos.....	34
2. Diversidad de hongos.....	34
3. Actividad quitinolítica de los hongos.....	34
III. Hongos a 120 días del segundo ciclo.....	38
1. Nivel poblacional de los hongos.....	38
2. Diversidad de hongos.....	38
3. Actividad quitinolítica de los hongos.....	38
IV. Bacterias a los 120 días del primer ciclo.....	43
1. Nivel poblacional bacteriana.....	43
2. Diversidad bacteriana.....	47
3. Actividad quitinolítica bacteriana.....	47
V. Bacterias a los 60 días del segundo ciclo.....	47
1. Nivel poblacional bacteriana.....	47
2. Diversidad bacteriana.....	51
3. Actividad quitinolítica bacteriana.....	51
VI. Bacterias a 120 los días del segundo ciclo.....	55
1. Nivel poblacional bacteriana.....	55
2. Diversidad bacteriana.....	55

3. Actividad quitinolítica bacteriana.....	58
Discusión.....	60
I. Rotación de cultivos.....	61
II. Materia orgánica.....	62
III. Solarización.....	64
Conclusiones.....	69
Recomendaciones.....	70
Literatura Citada.....	71
Apéndice(s).....	80

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Niveles poblacionales de hongos asociados a la rizósfera bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	28
Cuadro 2. Diversidad de hongos de la rizósfera a los 120 días del primer ciclo bajo tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	31
Cuadro 3. Hongos con actividad quitinolítica a los 120 días del primer ciclo bajo diferentes tratamientos bajo un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	33
Cuadro 4. Diversidad de hongos asociados a la rizósfera a los 60 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental de Isabela, PR.....	35
Cuadro 5. Hongos con actividad quitinolítica a los 60 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	37
Cuadro 6. Diversidad de hongos asociados a la rizósfera a 120 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	40
Cuadro 7. Hongos con actividad quitinolítica a 120 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	42
Cuadro 8. Poblaciones bacterianas a los 120 días del primer ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, P.R.....	48
Cuadro 9. Diversidad bacteriana a los 120 días del primer ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	49
Cuadro 10. Bacterias con actividad quitinolítica a los 120 días del primer ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	50

Cuadro 11. Poblaciones bacterianas a 60 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	52
Cuadro 12. Diversidad bacteriana a 60 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos en un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	53
Cuadro 13. Bacterias con actividad quitinolítica a 60 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	54
Cuadro 14. Poblaciones bacteriales a 120 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela.....	56
Cuadro 15. Diversidad bacteriana a 120 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	57
Cuadro 16. Bacterias con actividad quitinolítica a 120 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.....	59

Lista de Figuras

- Figura 1. Hongos frecuentes durante el primer ciclo (40X). A. Conidióforo de *Cunninghamella elegans*; B. Colonia de *C. elegans* en agar de papa y dextrosa (ADP); C. Picnidio de *Rhizosphaera* spp; D. Colonia de *Rhizosphaera* spp. en ADP..... 30
- Figura 2. Hongo más frecuentemente aislado duran el 2^{do} ciclo a 120 días (100 X). A. Conidióforo monoverticilado de *Penicillium frequentans*; B. Conidióforo de *P. frequentans*; C. Colonia en agar de extracto de malta; D. Colonia en agar Czapeck enmendado con levadura..... 39
- Figura 3. Hongos quitinolíticos más frecuentemente aislados (40 X). A. Conidióforo de *Aspergillus flavus*; B. Colonia de *A. flavus* en ADP; C. Conidióforo de *Aspergillus terreus*; D. Colonia de *A. terreus* en ADP..... 44
- Figura 4. Hongos quitinolíticos más frecuentemente aislados (40 X). A. Conidia de *Humicola* spp.; B. Colonia de *Humicola* spp. en ADP; C. Conidióforo de *Mortirrella* spp.; D. Colonia de *Mortirrella* spp. en ADP..... 45
- Figura 5. Hongos quitinolíticos más frecuentemente aislados (40 X). A. Conidióforo de *Penicillium oxalicum*; B. Colonia de *P. oxalicum* en ADP; C. Conidióforo de *Trichoderma* spp.; D. Colonia de *Trichoderma* spp. en ADP..... 46

Introducción

La calabaza (*Cucurbita moschata*) se siembra cualquier en época del año y en toda la isla y es considerada la hortaliza de mayor importancia económica (Conjunto Tecnológico para la Producción de Calabaza, 1998). Durante el año 2003 - 2004 se incrementó la producción a 285, 903 quintales, traducándose en un valor de \$ 5.8 millones de dólares (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, 2004).

El cultivo de calabaza es afectada por hongos como *Erysiphe cichoracearum*, *Sphaerotheca fuliginea* (añublo polvoriento), *Pseudoperonospora cubensis* (añublo lanoso), *Didymella bryoniae* (tizón gomoso), *Colletotrichum orbiculare* (antracnosis), *Cercospora citrullina* (mancha de la hoja), *Alternaria cucumerina* (mancha de la hoja) y *Corynespora cassicola* (mancha de tarjeta). Además de bacterias como *Pseudomonas syringae* (mancha foliar angular) y es afectado por nematodos fitoparásitos como *Meloidogyne* spp., el cual es el nematodo de mayor importancia económica en hortalizas (Conjunto Tecnológico para la Producción de Calabaza, 1998).

El bromuro de metilo (CH_3Br), ha sido utilizado a nivel mundial como el mayor fumigante del suelo para el control de bacterias, hongos, nematodos y malezas (Eshel et al., 2000). En el año 1991, el Protocolo de Montreal, definió al bromuro de metilo como un químico que reduce la capa de ozono del planeta Tierra. Por este motivo se discontinuó su producción y se estableció un plan para reducir su uso a través de los años (Nolling y Becker, 1994). Por esta razón, se ha intensificado la búsqueda de alternativas de nuevos métodos de control que no afecten adversamente el ambiente y sustituyan al bromuro de

metilo. El continuo uso de plaguicidas sintéticos de amplio espectro para el control de las enfermedades causan problemas de toxicidad y persistencia en el medio ambiente. Debido a esa preocupación la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), ha surgido la búsqueda de prácticas no convencionales para la producción de alimentos más saludables (Chellemi, 2002). Así mismo, se reconoce que la desinfección química del suelo es incompatible con una agricultura sustentable y su uso ha sido restringido, por lo que nuevas alternativas han surgido ante esta necesidad (Block et al., 2000). Las prácticas para una agricultura sustentable son el resultado de la necesidad para incrementar la producción agrícola sin tener consecuencias adversas para el ambiente (Edwards et al., 1990). La agricultura sustentable enfatiza el mantenimiento de la productividad del ecosistema y un suministro de alimentos adecuado para toda persona, conservando la calidad del ambiente y preservando los recursos no renovables y la diversidad biológica (McSorley y Porazinska, 2001). La combinación de técnicas como la rotación de cultivos (Francis y Clegg, 1990), las enmiendas orgánicas (King, 1990) y la solarización (Eshel et al., 2000) son alternativas bajo estudio para el control de diversos grupos de patógenos.

La rotación de cultivos es útil en el manejo de enfermedades causadas por patógenos de suelo. Aunque esta técnica no es efectiva para todos los patógenos, puede tener éxito en el manejo de patógenos que son anuales en el cultivo (Martin, 2003). El sistema de rotación de cultivos ofrece un medio para manejar poblaciones patógenas y poblaciones beneficiosas autóctonas de la rizósfera que son antagonistas de patógenos de la raíz (Rovira et al., 1990).

Las enmiendas orgánicas pueden ser útiles en el manejo de enfermedades que son

controladas comunmente por fumigación del suelo. Por ejemplo, una enmienda con contenido alto de nitrógeno al descomponerse a amonio es tóxico para ciertos organismos como los nematodos fitoparásitos (Martin, 2003).

La solarización ha sido usada desde 1975 para el manejo de patógenos del suelo y se sigue utilizando en muchas áreas del mundo. Se ha demostrado que esta práctica es económicamente efectiva al reducir enfermedades en raíz de la fresa en el estado de Oregon, Estados Unidos (Martin, 2003).

La rizósfera se define como un volumen de suelo que es adyacente e influenciado por la raíz de la planta (Bolton et al., 1993). Es un hábitat complejo que varía en tiempo y espacio; difiere del resto del suelo en sus propiedades biológicas, químicas y físicas (Kerry, 2000). La zona del suelo alrededor de la raíz es dinámica ya que en ella está presente una intensa actividad microbiana y grandes poblaciones de microorganismos que interactúan en esa localidad física, debido a la liberación de compuestos orgánicos como polisacáridos y amino ácidos (Grayston et al., 1998). Entre un 10 % y un 30 % del carbono asimilado por las plantas es liberado a la rizósfera, dando soporte a la actividad microbiana que generalmente es mayor que en el resto del volumen de suelo. Se considera que hay un 60 % de bacterias y un 12 % de hongos en la rizósfera (Kerry, 2000). La determinación cuantitativa de la cantidad de microorganismos presentes en la rizósfera es útil para el estudio de la ecología y el ciclo de nutrientes. El estudio de la microflora del suelo provee información sobre las actividades metabólicas de todos los constituyentes del suelo, cómo se afecta el crecimiento de la planta y el crecimiento y la función de otros microorganismos

(Bolton et al., 1993). La manipulación de la rizósfera para alterar su composición o las actividades de sus microorganismos ofrecen la oportunidad de desarrollar diferentes tecnologías, tales como el uso de control biológico y la biodegradación de contaminantes orgánicos (Bolton et al., 1993). El éxito de las técnicas microbianas de la rizósfera del suelo dependen de aislar y entender los mecanismos por los cuales se influencia el crecimiento de la planta y entender las características básicas que constituyen una colonización competitiva de la rizósfera (Blaine, 1993). Los microorganismos que crecen en la rizósfera son ideales como agentes de control biológico por presentar la primera línea de defensa de las raíces contra la infección por patógenos (Weller, 1988). Por ejemplo, se ha encontrado que algunos hongos son patógenos de huevos de nematodos. Esos hongos inhiben el proceso reproductivo de la hembra o se adhieren física y/o bioquímicamente, destruyendo la integridad de los huevos y de los juveniles (Morgan Jones y Rodríguez Kabana, 1988) .

Las rizobacterias, según reportes de la Universidad de California Berkeley (1970), son agentes de control biológico a través de la antibiosis y parasitismo. La investigación indica que las rizobacterias ejercen competencia con otros organismos al crecer cerca de los puntos de infección de la raíz, como también en los canales que proveen acceso físico a la raíz, estando en una posición ideal al limitar el establecimiento y diseminación de patógenos (Weller et al., 2002). Las rizobacterias son importantes en la adquisición de nutrientes por la planta, por ejemplo, hacen disponible el hierro en forma de sideróforos para recompensar esa deficiencia nutricional (Sharman et al., 2003).

El propósito de esta investigación fue el de estudiar tres prácticas de agricultura

sustentable como son la rotación de cultivo utilizando el maíz (*Zea mays*) y el haba de terciopelo (*Mucuna deeringiana* Borr.); las enmiendas orgánicas utilizando gallinaza y la solarización para evaluar su efecto en las poblaciones de microorganismos (hongos y bacterias) asociadas a la rizósfera del suelo. Para tal efecto, se evaluaron dos ciclos de calabaza en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, Colegio de Ciencias Agrícolas, Recinto Universitario de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico. El primer ciclo de siembra correspondió al período de junio a octubre del año 2003 donde se aplicaron las prácticas agrícolas sustentables y el segundo ciclo de siembra correspondió al período entre diciembre 2003 a abril 2004 después del uso de las prácticas agrícolas sustentables.

Objetivos

1. Determinar el efecto de prácticas agrícolas sustentables sobre los niveles poblaciones de bacterias y hongos asociados a cada tratamiento
2. Clasificar cada grupo de organismos asociados a cada tratamiento basados en el uso de medios de cultivo selectivo y tinción Gram.
3. Determinar el efecto de las prácticas agrícolas sustentables sobre la diversidad de hongos y bacterias.

Revisión de Literatura

I. Agricultura Sustentable

El bromuro de metilo, se utilizó por las pasadas cuatro décadas, como el fumigante de suelo predilecto para la siembra comercial de una amplia gama de cultivos agrícolas. Debido a que es un fumigante de amplio espectro, posee presión de vapor alta, la cual facilita su distribución a través del suelo y es de costo efectivo (Martin, 2003). En Estados Unidos durante el año 1993, su uso se empezó a discontinuar debido a que se clasificó como una de las sustancias principales que destruyen la capa de ozono de la Tierra (Martin, 2003). A raíz de esta situación, este producto se sustituyó por las cloropicrinas (tricloronitrometano), las cuales no eran efectivas controlando una amplia gama de patógenos por lo que se usó en combinación con otros fumigantes (Martin, 2003). Otro fumigante utilizado fue 1,3-Dicloropropeno (Telone[®], Dow AgroScience) el cual aunque efectivo, afecta la calidad del aire. El uso continuo de plaguicidas químicos afecta la productividad y produce una serie de efectos adversos entre los que podemos citar: 1- Incremento de los costos y la dependencia de entradas internas de químicos y energía; 2- Deterioro continuo de la productividad del suelo debido a la erosión y la pérdida de nutrientes; 3- Contaminación del suelo y cuerpos de agua debido a fertilizantes y plaguicidas; 4- Daños a la salud humana y de los animales y la pérdida de calidad en los alimentos debido a la contaminación con químicos agrícolas (Parr, et al., 1990). Debido a que la agricultura convencional depende de la disponibilidad de agentes químicos para el control de patógenos de plantas se han

buscado nuevas alternativas como lo es la agricultura sustentable (Martin, 2003). La agricultura sustentable se enfatiza en el mantenimiento de la productividad del ecosistema y en la adquisición adecuada de alimentos para todas las personas, preservando la calidad del ambiente y conservando los recursos no renovables y la diversidad biológica (Mcsorley y Porazinska, 2001). El uso de los fumigantes químicos y su consecuencia en la salud humana y en el ambiente concierne a todos, por lo que se han buscado métodos alternos al control de plagas y enfermedades (Akhtar, 2000). Se han buscado métodos que no sean costosos, de fácil aplicación y que no sean peligrosos al ambiente. La solarización del suelo, el uso de materia orgánica y la rotación de cultivos pueden ser técnicas más efectivas para el control de patógenos bajo condiciones específicas (Block et al., 2000). A través de las prácticas de agricultura sustentable se busca la identificación y la disminución de la pérdida de energía mientras se mantiene la productividad (Kennedy y Smith, 1985).

II. Los microorganismos de la rizósfera del suelo

El término rizósfera proviene de la palabra griega *rhizo* o *rhiza* que quiere decir raíz (el área de influencia) y esfera, la localización física (alrededor de la raíz). Algunos investigadores la subdividen en ectorizósfera, o rizósfera externa, y endorizósfera, o rizósfera interna, donde ocurre la invasión y colonización de las células corticales de la raíz por los microorganismos del suelo. La capa de suelo más cercana a la raíz recibe el nombre de rizoplano (Bolton et al., 1993). La rizósfera se considera una capa microbiana estrecha que proviene desde la endodermis de la raíz hacia el suelo. El tamaño y composición de la

microflora de la rizósfera depende no sólo del tipo de suelo , sino también de la planta que la constituye (Miller et al., 1989).

Los componentes de la raíz son: 1- capa de la raíz: la cual produce las sustancias mucilaginosas que lubrican la raíz y adhieren las partículas de suelo y los microorganismos, y actua como recurso de nutrientes; 2- células epidermales y pelos de la raíz: los cuales son puntos de interacción e infección con los microorganismos; 3- la corteza: compuesta por células de la endodermis y la epidermis de la planta (Cambell y Greaves, 1990).

El rol central de los microorganismos en los procesos del ecosistema consiste en ciclos de nutrientes biogeoquímicos y la biodegradación (Proseer, 2002). La biomasa microbiana y su actividad pueden ser afectadas por cambios en la calidad y cantidad del sustrato, las condiciones ambientales y esta relacionado con el contenido de materia orgánica (Li et al., 2004).

El interés en el estudio de su microbiología surge de la habilidad de los microorganismos del suelo de influenciar el crecimiento de la planta y viceversa (Bolton et al., 1993). La rizósfera puede considerarse como una zona de amortiguamiento microbiológico en donde la microflora sirve para proteger a la planta del ataque del patógeno (Alexander, 1980). Las bacterias con potencial de control biológico pertenecen a los géneros *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Cellulomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. y *Serratia* spp. (Weller, 1988). Además, la microflora de la rizósfera, puede actuar como bioremediadoras al descomponer compuestos sintéticos como los plaguicidas. Los microorganismos como *Bacillus* spp.,

Pseudomonas spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., y *Trichoderma* spp. pueden usar los plaguicidas como sustratos (Alexander, 1980).

Los hongos tienen un rol importante en el ciclo de nutrientes y en el desarrollo de las plantas (Bridget y Spooner, 2001). Mientras algunos hongos son reconocidos por causar enfermedades en las plantas y en algunos casos devastar cultivos, otros son reconocidos como antagonistas de patógenos de plantas, descomponedores de residuos de plantas y muchos otros proveen nutrientes a las plantas y estimulan su crecimiento (Gomes et al., 2003). También, afectan las comunidades bacterianas de forma directa cambiando la fisiología de la planta hospedera o indirectamente cambiando los patrones de exudación de la raíz (Gomes et al., 2003).

III. Rotación de Cultivos

La rotación de cultivos es una secuencia planificada de alternar y crecer diferentes cultivos en un mismo predio en diferentes épocas (Kaminski et al., 1997). La rotación es efectiva ya que mejora el uso de nutrientes, reduciendo la erosión del suelo, incrementando la producción y mejorando la textura del suelo (Chavarría Carvajal, 2002). Al rotar los cultivos se reduce la posibilidad de que los patógenos específicos a ciertas plantas regresen cada año (Kaminski et al., 1997). La abundancia y las actividades de los microorganismos del suelo están influenciadas por factores ambientales como la humedad, tipo de suelo, nutrientes y pH; así como también por los factores que distinguen la planta, como lo es la especie y la edad. La disponibilidad de diferentes compuestos de carbono, influenciado por las diferentes

especies de plantas, hacen las comunidades microbianas diferentes (Grayson et al., 1998). Cada sistema específico de rotación de cultivos presenta un nicho ecológico único disponible para ser ocupado por microorganismos que pueden ser beneficiosos o perjudiciales para el crecimiento de la planta (Rovira et al., 1990).

El haba de terciopelo (*Mucuna deeringiana* Borr.) se ha utilizado para la producción de forraje, como abono verde y cultivo de cobertura (Acosta et al., 1991). Es una leguminosa que fue introducida de África al sureste de Estados Unidos a finales del siglo 19. El haba de terciopelo requiere un clima cálido y húmedo para un crecimiento excelente. Además, puede crecer en una amplia gama de texturas de suelo y en suelos ácidos (Vicente y Acosta, 1987). Se ha informado que es eficaz para controlar el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y los nematodos (Acosta et al., 1991). Los exudados de la raíz del haba de terciopelo favorecen microorganismos particulares a colonizar la rizósfera. Esos organismos existen en alto número en la raíz de la leguminosa, los cuales pueden interferir con el desarrollo de los nematodos fitoparásitos al evitar el que los huevos eclosionen, e interfiere con el reconocimiento del hospedero (Kloepper et al., 1991 y 1992). Los exudados de la raíz son los componentes primarios los cuales seleccionan o inhiben el crecimiento de bacterias en la rizósfera (Vargas Ayala, 1995). Kloepper *et al.*, demostraron que la rotación con *Mucuna* transforma la microflora bacteriana de la rizósfera en comparación con otras leguminosas. Las rizobacterias pueden afectar los nematodos por la secreción de productos metabólicos como lo son las enzimas y las toxinas (Stirling, 1991). Los resultados de Vargas Ayala (1995), demostraron que en la rizósfera del haba de terciopelo hay una alta población

de hongos antagonistas de nematodos noduladores. *Fusarium oxysporum*, *Penicillium jathinellum* y *Trichoderma harzianum* fueron aislados de la rizósfera del haba de terciopelo y demostraron su actividad biocontroladora al ejercer parasitismo en los juveniles y huevos del nematodo nodulador, *Meloidogyne incognita*. En la rizósfera de las leguminosas, según estudios comparativos, se puede encontrar un mayor número de colonias bacterianas que en la rizósfera de plantas no leguminosas (Fahraeus y Ljunggren, 1968). En Florida (Estados Unidos), el haba de terciopelo, se utiliza como forraje anual de verano para intercalar con maíz (Vicente y Acosta, 1987). Además, se utiliza en combinación con maíz u otros cultivos para mejorar la fertilidad del suelo y suprimir el número de patógenos del suelo (Rodríguez Kabana et al., 1992). Spedding y colaboradores (2004) estudiaron los efectos de sembrar maíz en diferentes épocas y encontraron que cambia las condiciones del suelo de diferentes maneras y esto a su vez cambia la biomasa de los microorganismos presentes. En otros estudios realizados por Larkin (2003) se estudió la rotación del cultivo de la papa (cultivo principal) con maíz dulce, canola, habichuela y soya. Estos estudios demostraron que la rotación provoca efectos en las comunidades microbianas. Por ejemplo, se observaron poblaciones altas de microorganismos y una mayor diversidad en el cultivo de maíz dulce. La rotación con maíz aumentó la transformación de nitrógeno microbiano en la rizósfera, específicamente inmovilizando y denitrificando y lo que contribuye a que el carbono esté más disponible en la rizósfera (Qian et al., 1997)

La práctica de rotación de cultivos evita que ciertos microorganismos afecten el crecimiento y productividad de la planta a través de metabolitos tóxicos como el cianuro.

Además, promueve rizobacterias como *Pseudomonas* spp., las cuales son conocidas como promotoras del crecimiento de la planta (PGPR siglas en inglés) a través de la producción de antibióticos e incrementando la disponibilidad de nutrientes (Schippers et al., 1987).

IV. Materia Orgánica

La materia orgánica es una mezcla compleja de material vivo, muerto y en descomposición. Aporta macronutrientes importantes como fósforo, nitrógeno y azufre al suelo (Smith et al., 1993). Además, tiene un rol importante en el desarrollo y funcionamiento de los ecosistemas terrestres. Es el mayor determinante en el ciclo de nutrientes y de carbono en la biosfera; es el principal recurso de nutrientes para la planta y contribuye a la calidad del suelo (estructura, resistencia o erosión) y representa el mayor reservorio de carbono en el sistema biosfera-atmósfera (Fontaine, et al., 2003). Los agricultores que practican la agricultura orgánica usan materia orgánica como acondicionadora del suelo, particularmente en sistemas de producción intensiva de hortalizas para sostener la productividad, y mejorar la fertilidad y calidad del suelo (Abbasi et al., 2002). Las enmiendas orgánicas mejoran la calidad del cultivo como también las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos agrícolas (Chavarría Carvajal, 1997). El uso de composta y otras enmiendas orgánicas para la supresión de enfermedades, son prácticas efectivas para reducir el uso de fungicidas (Dissanayake y Hoy, 1999) y es efectivo en el control de enfermedades causadas por patógenos del suelo (Han et al., 2000). La materia orgánica se ha utilizado con éxito en la supresión de enfermedades causadas por *Pythium* spp., en cultivos de pepinillo y algodón

(Dissanayake y Hoy, 1999). Abbasi y sus colaboradores (2000) demostraron que los agentes de control biológico aumentaron en la rizósfera de las plantas de tomate y se redujo la severidad de enfermedades causadas por patógenos del suelo, al utilizar enmiendas orgánicas compuesta de desperdicios orgánicos, desperdicios municipales y estiércol de aves. También, se mejoró el drenaje y la retención de agua de los suelos enmendados y se liberaron más nutrientes para la planta. Los efectos beneficiosos de estas enmiendas orgánicas dependen de una adecuada aplicación sino, pueden ser fitotóxicas y reducen la producción. Los altos niveles de actividad microbiana son el principal factor en el control de las enfermedades (Boulter et al., 2002). La explotación de las actividades antagonistas de los microorganismos descomponedores de materia orgánica, puede ser una de las mejores herramientas en las prácticas de biocontrol, que pueden ser desarrolladas para el manejo de nematodos parásitos de plantas (Chavarría Carvajal, 2001). La proliferación de una flora microbiana beneficiosa resulta en el incremento de las actividades enzimáticas del suelo enmendado y en la acumulación de compuestos específicos finales, con características nematicidas. El efecto de la materia orgánica depende de su naturaleza, por ejemplo, la materia con alto contenido de nitrógeno, al descomponerse por la actividad microbiana en amonio, es tóxica a los nematodos (Rodríguez Kabana, y Morgan Jones, 1987). Los microorganismos que asimilan nitrógeno (N_2) tienen la capacidad de utilizar amonio, nitrato y otras formas combinadas de nitrógeno (Alexander, 1980).

Boulter et al., (2002), realizaron estudios utilizando diferentes tipos de composta para controlar *Sclerotinia homoeocarpa* en grama. Los autores encontraron que al incorporar

composta al suelo se redujo la severidad e incidencia de la enfermedad. Además, observaron un aumento de poblaciones microbianas que son beneficiosas al ejercer los mecanismos de competencia y antagonismo con las poblaciones de patógenos.

Penicillium spp. es un hongo con una alta participación en la descomposición de materia orgánica y es caracterizado por la producción de Penicilina, una sustancia antibiótica (Raper y Thom, 1930). Algunas especies de *Penicillium* son versátiles debido a la producción de una variedad de enzimas extracelulares. Por ejemplo, algunas cepas hidrolisan celulosa, pero se conoce poco sobre la habilidad del hongo para degradar quitina (Giambattista et al., 2001). La quitina, β -(1,4) - unido al homopolisacárido de N - acetilglucosamina, es el segundo polisacárido estructural abundante, presente en el exoesqueleto de los artrópodos y en la pared celular de los hongos (Milton et al., 2003). Las quitinasas son enzimas con actividad hidrolítica específica directa contra el homopolímero de quitina y podría tener un rol en la virulencia de algunos patógenos que infectan insectos via membrana peritrófica (Liu et al., 2002). La degradación de quitina es un proceso clave en la naturaleza como recurso de nutrientes y permite el crecimiento de ciertos organismos que poseen quitina como constituyente principal de la pared celular o cutícula (Baratto et al., 2003). Las quitinasas son producidas por varios microorganismos claves en los procesos de control biológico como los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* spp. y el género *Gliocladium* spp. (Podile y Prakash, 1996). La bacteria *Serratia marcescens* ha sido utilizada como agente de control biológico del hongo *Sclerotium rolfsii* a través de la producción de quitinasas (Ordentlich et al., 1988). Se ha encontrado que varias cepas de

Bacillus spp. tales como *B. alvei*, *B. lentus*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* segregan quitinasas durante su crecimiento (Liu et al., 2002). Giambattista y colaboradores (2001), caracterizaron la actividad quitinolítica de *P. janthinellum* y concluyeron que el uso de las enzimas quitinolíticas son una posible estrategia contra patógenos de alimentos al reducirse el uso de fungicidas.

La Patulina es un antibiótico producido por *Penicillium patulum*, *Aspergillus clavatus* y *A. terreus*, el cual se encontró que tiene efecto de control biológico contra las enfermedades de pudrición (“damping off”) en tomate (Lynch, 1990). Según, Chavarría Carvajal (1992), las interacciones antagónicas entre microorganismos son importantes en determinar el número y variedad de organismos capaces de habitar la rizósfera.

V. Solarización

La solarización es un método de desinfección, desarrollado en Israel en 1976 por Katan y colaboradores, para controlar patógenos del suelo y malezas, mayormente como tratamiento de suelo presiembra (Katan, 1981). La solarización del suelo es un proceso que emplea radiación solar para calentar el suelo bajo un plástico transparente de polietileno a temperaturas que son detrimentales para patógenos del suelo. El incremento en temperatura se debe a la eliminación de evaporación y parcialmente al efecto de invernadero ejercido por la capa de polietileno (Chen y Katan, 1980). Uno de los primeros modos de acción de la solarización del suelo envuelve la estimulación de organismos beneficiosos responsables de ejercer control biológico sobre patógenos fitoparasíticos (Stapleton et al., 1987).

El éxito de la solarización se debe a su efecto sobre los organismos mesofílicos, como lo son la mayoría de los patógenos de plantas y plagas, que no son capaces de sobrevivir por largos períodos a temperaturas sobre los 37 °C (Stapleton y De Vay, 1982). La sensibilidad al calor la ocasiona la inestabilidad de las membranas celulares y la inactivación de las enzimas, por lo que se afectan los procesos respiratorios (Sharon et al., 2001). *Bacillus* spp. es una bacteria que persiste a condiciones desfavorables por la formación de endosporas, las cuales son resistentes a altas temperaturas. Esta bacteria ha sido evaluada en una gran variedad de especies de plantas por su habilidad para controlar enfermedades. Desde 1983, *B. subtilis* a 13 , ha sido vendida como tratamiento para el cultivo de maní bajo el nombre de QUANTUM-400 (Weller, 1998). Varias especies de *Bacillus* como lo son *B. megaterium*, *B. subtilis* y *B. cereus* han demostrado efecto inhibitorio al ser supresores de hongos patógenos o poblaciones bacterianas del suelo. *Bacillus thuringiensis* tiene efecto antibiótico en organismos procarióticos como *Micrococcus luteus*, *M. aurantiacus*, *Erwinia caratovora* y *Streptomyces chysommallus* (Ferreira et al., 2003). *B. thuringiensis* produce una toxina termoestable que puede ser tóxica a poblaciones de *Meloidogyne* spp., *Panagrellus* spp. y *Aphelenchus* spp. y evita o previene que las larvas de ambos nematodos formen nódulos en las raíces de tomate (Sayre, 1980). Otro mecanismo de biocontrol presente en las bacterias es el parasitismo, siendo *B. penetrans* estudiado por su interacción con los nematodos (Sayre, 1980).

Trichoderma spp. es un hongo que sobrevive al calor solar y posee mecanismos de antibiosis, competencia, micoparasitismo e hidrólisis enzimática, los cuales son útiles en

actividades de control biológico. Es un hongo que posee acción enzimática a través de las quitinasas, las cuales degradan quitina, componente presente en los huevos de los nematodos (Sharon et al., 2001). *Trichoderma* spp., parasita el micelio de hongos patógenos como *Rhizoctonia* spp. y *Sclerotium* spp., inhibe el crecimiento de *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Herobasidium* spp., reduciendo las enfermedades causadas por esos patógenos (Harmen, 2000). Además, *Trichoderma harzianum*, es un agente biocontrolador de *Meloidogyne javanica* a través de la actividad proteolítica (Sharon, et al., 2001). Otros hongos termotolerantes son *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., los cuales intervienen en la regulación de poblaciones patógenas a través de la producción de antibióticos (Stapleton y De Vay, 1982). La solarización reduce poblaciones de *Fusarium* spp., (Chellemi et al., 1994), *Phytophthora cinnamoni* (Barbercheck y Broemsen, 1986), *Phytophthora nicotinae* (Coelho et al., 1999), *Verticillium dahliae* (López Escudero y Blanco López, 2001). Además, reduce infecciones de la raíz por *Phytophthora fragariae*, *Pythium* spp., y *Rhizoctonia* spp. (McGovern et al., 2002; Pinkerton et al., 2002).

Cambios en la microflora después de la aplicación de la solarización pueden mejorar el crecimiento de la planta (Pinkerton et al., 2002). Las bacterias que colonizan las raíces de las plantas y promueven su crecimiento positivamente por cualquier mecanismo son llamadas “rizobacterias que promueven el crecimiento” (PGPR) (Khalid et al., 2004). Bacterias asociativas como los grupos de *Azospirillum* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Enterobacter* spp. son rizobacterias que se han caracterizado por sus efectos beneficiosos en la plantas. Por ejemplo, *Bacillus polymyxa* es una rizobacteria promotora

supresora de nematodos y enfermedades causadas por hongos en forma directa al hacer al hospedero más resistente y a la vez más saludable (Khasn y Akram, 2000). El mecanismo de estimulación del crecimiento de la planta por las bacterias asociativas, es la movilización de nutrientes, estimulado por fitohormonas y antagonismo contra patógenos de suelo (Egamberdiyeva y Höflich, 2003). Khalid y colaboradores (2004), encontraron que algunas cepas de bacterias promotoras del crecimiento de la planta producen hormonas como las auxinas. Este tipo de hormona mejora el sistema radicular, resultando en una producción mayor de biomasa. Frecuentemente, los suelos solarizados se vuelven supresivos a patógenos, mientras las *Pseudomonas fluorescens* se incrementan colonizando la rizósfera y las raíces (Gamliel y Katan, 1993). Cepas específicas de *Pseudomonas* actúan de dos formas promoviendo el crecimiento de la plantas. Estas son, de forma directa por la supresión de patógenos y de forma indirecta a través de la secreción de fitohormonas y vitaminas, o por el incremento de la absorción de minerales por la planta. Uno de los minerales más importantes es el hierro que convertido en sideróforo (moléculas de bajo peso con afinidad a hierro (III) quelado) por ciertas cepas bacterianas está más disponible a la planta, reduciendo el uso de fertilizantes (Sharman et al., 2003). Éste es un mecanismo de control biológico, debido a que el hierro es menos disponible a patógenos por diversas razones: no producen sideróforos por ellos mismos, no pueden usar los sideróforos producidos por los antagonistas en su medio ambiente y producen pocos sideróforos o con poca afinidad al hierro (Weller, 1988). Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* cepa IE6⁺ es supresora de *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* en tomate, a través del secuestro de hierro

en el suelo (Siddiqui et al., 2003). En otros estudios realizados por la Universidad de Karachi en Pakistán, se demostró que el metabolito 2,4-DAPG producido por *Pseudomonas fluorescens* cepa CHAO redujo la infección por nematodos noduladores en tomate a nivel de invernadero (Siddiqui y Shaukat, 2003).

La solarización es un tratamiento cuyo efecto plaguicida y promotor del crecimiento de la planta es dependiente del ecosistema en que sea usado, debido a diferencias en el clima, tipo de suelo y naturaleza de los organismos presentes; son variables que pueden afectar el éxito del tratamiento y del cultivo a sembrar (Stapleton et al., 1987). La solarización es compatible con otros métodos físicos, químicos y biológicos para el control de enfermedades causadas por patógenos del suelo. En un estudio realizado por Stevens y colaboradores (2003), se observó que al incorporar *Trichoderma virens* al suelo luego de remover el plástico hubo una reducción en la incidencia de *Sclerotium rolfsii* en tomate. También, se combinó en el estudio la materia orgánica (gallinaza) y la solarización, encontrándose una disminución de un 60 % a un 100 % de esclerocios viables, lo cual puede estar relacionado con un aumento en la flora microbiana antagonista. En estudios realizados por Gamliel y Stapleton (1993), se combinó la solarización con residuos de crucíferas, los cuales son tóxicos por su alto contenido en compuestos de azufre. Se encontró que los compuestos volátiles generados eran tóxicos y por lo tanto una herramienta para controlar ciertos patógenos del suelo. Este estudio reflejó una reducción en las poblaciones de *Pythium ultimum* y *Sclerotium rolfsii* y un aumento en las poblaciones de microorganismos beneficiosos.

Materiales y Métodos

I. Localización del Experimento

El estudio fue realizado en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, Colegio de Ciencias Agrícolas, Recinto de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico. Este centro se encuentra localizado al noroeste de la Isla de Puerto Rico, a una altitud de 128 m sobre el nivel del mar. La precipitación promedio anual es de 1,630 mm y su temperatura promedio anual de 85 °C . El suelo predominante pertenece a la serie Coto (típico suelo Eustrtox), con un pH de 6.2 y menos de 1.0 % de materia orgánica. Este estudio constó de dos ciclos de siembra, el primero se realizó entre junio a octubre 2003 y el segundo de diciembre de 2003 a abril 2004. Antes de establecer el experimento se realizó un muestreo preeliminar de microorganismos (hongos y bacterias) para observar los niveles poblacionales iniciales y su diversidad.

II. Fase de campo

Antes de establecer los tratamientos se preparó el terreno con dos cortes de arado y dos de rastra. El diseño experimental utilizado consistió en bloques completamente aleatorizados (DBCA) con seis tratamientos y cuatro réplicas. Se utilizó como cultivo principal la calabaza, *Cucurbita moschata* Dutch var. “Soler”, sembrada a 1.8 m x 1.8 m de distancia (8 plantas por parcela), para una densidad poblacional de 3,086 plantas por hectárea (Conjunto Tecnológico para la Producción de Calabazas, 1998). La dimensión del área

experimental fue de 43.20 m de largo por 40.20 m de ancho, subdividida en cuatro bloques de 10.80 m de largo y 7.20 m de ancho. Los tratamientos (T) estudiados fueron: T:1- Rotación con maíz (*Zea mays* var. "Mayorbela") más calabaza. En el primer ciclo se sembró maíz a una distancia de 75 cm entre hilera por 25.40 cm entre planta para una densidad de siembra de 30,000 plantas por hectárea (Agro. Carlos Flores, comunicación personal). Durante el segundo ciclo se sembró calabaza. T:2- Rotación con haba de terciopelo (*Mucuna deeringiana* Borr). En el primer ciclo se sembró el haba de terciopelo como cultivo de rotación a una distancia de 91.44 cm entre hilera y 30.48 cm entre planta, para una densidad de siembra de 1,700 plantas por hectárea. Al terminar el primer ciclo el haba de terciopelo se cortó y se dejó secar al sol por una semana, incorporándose la materia seca antes de la siembra del segundo ciclo de cultivo con calabaza. T:3- Incorporación de materia orgánica al suelo (gallinaza 7.3 kg/planta) proveniente de una granja de pollos parrilleros con (3 % de nitrógeno). La incorporación al suelo se realizó mediante un pase de cultivador mecánico y posteriormente se humedeció el suelo a capacidad de campo para acelerar el proceso de descomposición de la materia orgánica. Luego de una semana se sembró la calabaza, repitiéndose el proceso de incorporación durante el segundo ciclo. T:4- Solarización del suelo, se realizó durante el primer ciclo de cultivo mediante el uso de una cubierta plástica de polietileno de 0.6 cm de pulgada de grosor (Klerk[®]) y un sensor de temperatura (HOBO, Gempler) a 12.5 cm de profundidad por 120 días para medir los cambios en temperatura a intervalos de una hora. Al remover el plástico se sembró calabaza en el segundo ciclo. T:5- Control químico, durante ambos ciclos se sembró calabaza y se aplicó Nema-cur 15G (3.0 g

i.a./planta). T:6- Control absoluto, se sembró calabaza en ambos ciclos. Durante el primer ciclo se colocó un sensor de temperatura a una profundidad de 12.5 cm para comparar las temperaturas del suelo de este tratamiento con el de solarización.

Previo a los tratamientos se realizó un muestreo de suelo para observar las poblaciones de microorganismos y su diversidad. Para determinar el efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de microorganismos se tomó una muestra compuesta del suelo de la rizósfera de cada uno durante los dos ciclos. Las muestras de suelo se tomaron al final primer ciclo (120 días), 60 días y 120 días del segundo ciclo.

III. Fase de Laboratorio

Se pesaron 10 g de suelo de la muestra compuesta y se añadió a un matraz con 90 ml de fosfato de potasio 0.02 M esterilizado (pH de 6.8) como amortiguador. Se colocó por 12 minutos en un agitador orbital (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Para la extracción de hongos y bacterias el diseño experimental a nivel de laboratorio consistió en diez réplicas (placas Petri por tratamiento) y seis tratamientos, basados en la distribución de los tratamientos a nivel de campo.

1. Hongos

Una alícuota de 100 μ l de la dilución 10^{-3} , tomada con una micropipeta (Eppendorf, Hamburg, Alemania), se distribuyó sobre la superficie del agar con rosa de bengala y estreptomicina (ARBE) (Skipper et al., 1986) usando un esparcidor de células (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y un plato giratorio (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Las placas

fueron incubadas a 28 °C por cuatro días, luego se cuantificaron el número de colonias de forma manual y se expresó como \log_{10} ufc/g de suelo seco. Se seleccionaron al azar tres colonias de hongos por placa, para un total de 30 colonias por tratamiento y 180 por época de muestreo. Los hongos aislados se purificaron en agar de papa y dextrosa (ADP) (Difco, Detroit, MI) y se caracterizaron por su actividad quitinolítica utilizando agar con sales minerales y quitina. Por ejemplo, hongos como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Trichoderma* spp. son positivos para la prueba al cambiar el medio a uno traslúcido (Godoy et al., 1982). Los hongos se identificaron en base a sus características morfológicas utilizando cámaras húmedas, un estereoscopio (Fisher Scientific, Spt-ITH, Pittsburgh, PA) y un microscopio compuesto (Leica DM, Buffalo, N.Y.), utilizando las claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1998; Barron, 1983; Domesch & Gams 1970; Domesch. et al, 1980). Para identificar hasta especie el género *Penicillium* spp. se utilizaron los medios de cultivo de agar de extracto de malta (AEM) (Difco Detroit, MI), Czapeck (Difco Detroit, MI) con agar y extracto de levadura (CYA) y Czapeck (Difco Detroit, MI) con agar y glicerol 25 % (G25N). A los siete días de crecimiento se evaluó el color, la textura, la presencia de exudado y el tamaño de la colonia. Además, se evaluaron las características morfológicas del hongo: composición del conidióforo (monoverticilado, biverticilado o terverticilado), tamaño del mismo y la presencia de los fiálidos y métulas (Domesch, 1980; Pitt 1986; Thom,1949). Para la identificación por especie de *Aspergillus* spp. los aislados se cultivaron en agar de extracto de malta (Difco Detroit, MI) y Czapeck con agar (Difco Detroit, MI) para su identificación por especie (Domesch, 1980; Raper, 1949). Se evaluaron las características

de la colonia y del conidióforo (vesícula, fiálidos y métulas). Una vez purificados los hongos se almacenaron en cuñas de agar de papa y dextrosa (ADP) (Difco Detroit, MI) para su preservación. Las colonias y las estructuras de los hongos aislados fueron fotografiadas para registro y referencias futuras (microscopio con cámara Olympus Optical BX40, Co y cámara digital Olympus Optical, Co. D-565, Melville, N.Y.). Los hongos que no produjeron estructuras de reproducción fueron clasificados como desconocidos.

2. Bacterias

Para medir las poblaciones totales de las bacterias se distribuyeron 0.52 μ l de la dilución 10^{-4} , sobre la superficie del agar de soya tríptico al 5 % (AST) (Difco, Detroit, MI) y 0.52 μ l de la dilución 10^{-3} en agar de *Pseudomonas* (AAP) (“Pseudomonas Isolation Agar”, Difco, Detroit, MI) utilizando un esparcidor de células y un plato giratorio. Para realizar la prueba de *Bacillus* spp. se calentó la dilución 10^{-4} por 20 minutos a 80 °C en un baño de María. Las bacterias que no son del tipo *Bacillus* spp. no sobreviven a esa temperatura, por lo tanto mueren. Luego se cultivó en agar de soya tríptico al 5 % siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Las placas Petri se incubaron a 28 °C durante 24 horas, cuando el número de colonias pudo ser determinado de forma manual, se expresó como logaritmo base diez unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco (\log_{10} ufc/g de suelo seco). Se seleccionaron al azar, tres colonias de bacterias por placa, para un total de 30 colonias por tratamiento y 180 colonias bacterianas por muestreo. Las bacterias aisladas se purificaron en caldo de soya tríptico (CST) (Difco, Detroit, MI) enmendado con agar granular (Difco, Detroit, MI) y se caracterizaron por medio de tinción Gram como Gram positiva y Gram

negativa (BD*Difco/BBL Gram Stain Kit; Difco, Detroit, MI). También, se caracterizaron por su actividad quitinolítica al cultivarlas en medios enmendados con quitina, utilizando un medio semimínimo con quitina (Kalbe, et al., 1996). Para realizar esta prueba se utilizó una placa Petri (60 mm x 15 mm) se inoculó realizando una línea en el centro de la placa, con la ayuda de una aguja esterilizada. Si el medio cambia a traslúcido la prueba es positiva. Las cepas bacterianas aisladas se transfirieron a caldo de soya tréptico (Difco, Detroit, MI) enmendado con agar granular (Difco, Detroit, MI) y se incubaron por 24 horas a 28 °C. De cada placa Petri se obtuvieron 3 ml de una solución amortiguadora fosfatada salina al raspar la superficie de la placa con una aguja de inocular esterilizada. Las células se colectaron en microtubos, y se centrifugaron a 10,000 rpm por 6 minutos. Se resuspendieron en caldo de soya tréptico con 20 % de glicerol y se almacenaron a -20 °C en un congelador (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) para preservarlas.

IV. Análisis estadístico

Se realizaron estudios bioestadísticos utilizando el análisis de varianza (ANOVA) (Ott, R. L. y M. Longnecker, 2001) con el programa de estadísticas InfoStat/Estudiantil (Universidad de Córdoba, Argentina, 2002). Las medias fueron comparadas para significancia utilizando diferencias mínimas significativas (DMS) cuando el valor de F fue significativo ($P \leq 0.05$).

Resultados

I. Primer ciclo de cultivo:

1. Nivel poblacional de los hongos

Se realizó un muestreo preliminar para conocer las poblaciones iniciales de hongos presentes en el área de estudio antes de aplicar los tratamientos. Se registró una población preliminar de hongos de 3.57 ufc/ g de suelo seco, la cual es una población cercana al tratamiento de control absoluto (3.55 ufc/ g de suelo seco) al final del primer ciclo de cultivo.

Durante el primer ciclo a los 120 días se observaron diferencias significativas al compararse las medias utilizando la prueba de Diferencia Media Significativa (DMS) con $P \leq 0.05$ en los niveles poblacionales de los hongos estudiados bajo los diferentes tratamientos. Las poblaciones de hongos más alta se observaron en los tratamientos de rotación de cultivo con haba de terciopelo con un valor de 3.77 ufc/ g de suelo seco, seguido por el tratamiento de materia orgánica, con 3.74 ufc/ g de suelo seco y el control químico, con un valor de 3.73 ufc/ g de suelo seco (Cuadro 1). La población significativamente más baja se observó en el tratamiento de solarización con 2.19 ufc/ g de suelo seco. Durante el mes de agosto se alcanzaron las temperaturas máximas en el tratamiento de solarización con 53.27 °C, y en el tratamiento control con 31.75 °C .

2. Diversidad de hongos

Luego de la aplicación de los distintos tratamientos se identificaron los géneros de hongos *Acremonium* spp., *Choanoephora* spp., *Humicola* spp. y *Mortierella* spp., que no

Cuadro 1. Niveles poblacionales de hongos asociados a la rizósfera bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.^{1,2,3}

Tratamiento	1 ^{er} ciclo 120 días	2 ^{do} ciclo 60 días	2 ^{do} ciclo 120 días
Maíz	3.65 b	4.18 a	4.05 b
Haba de Terciopelo	3.77 a	3.83 e	3.88 e
Materia Orgánica	3.74 a	4.03 b	4.02 bc
Solarización	2.19 d	3.94 cd	4.44 a
Control Químico	3.73 a	3.91 cd	3.94 cd
Control Absoluto	3.55 c	3.84 de	4.00 bc
DMS ($P \leq 0.05$)	0.07	0.07	0.11

¹Valores en cada columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) ($P \leq 0.05$).

²Media de diez réplicas.

³Población total de hongos expresadas como \log_{10} ufc/g de suelo seco

habían sido observados en el muestreo preliminar (Apéndice 1). El hongo que con más frecuencia se aisló en todos los tratamientos fue *Cunninghamella elegans*, perteneciente al grupo de los zigomicetos. Este hongo se encontró un 5 % del total de los cultivos presentes en el tratamiento de rotación con maíz (Figura 1). *Fusarium* spp. fue aislado frecuentemente en la mayoría de los tratamientos, excepto en el tratamiento de solarización, donde no se encontró. El porcentaje mayor de aislados pertenecientes a este género se recuperaron del tratamiento de materia orgánica con un 5 %. *Fusarium* spp., es un hifomiceto caracterizado por formar un cuerpo fructífero conocido como esporodoquio. En el tratamiento de solarización el porcentaje mayor de hongos aislados pertenecían al género *Aspergillus* spp. con un 3.89 % del total de las colonias. Además, se encontraron los siguientes hongos termotolerantes: *Humicola* spp. y *Mortierrella* spp. Dentro de los Sphaeropsidales, el más abundante durante el ciclo fue *Rhizosphaera* spp. (Figura 1) con un 5 % en el tratamiento de solarización y de los Hifomicetos formadores de conidióforos fue *Penicillium* spp. con un 7.22 % en el tratamiento de control químico (Cuadro 2).

3. Actividad quitinolítica de los hongos

El número mayor de hongos quitinolíticos fueron encontrados en el control absoluto con 13 aislados, representando un 43.3 % dentro de una población total de 30 aislados. El 30 % de los hongos quitinolíticos en este tratamiento pertenecían al género *Trichoderma* spp., y el 13.3 % es representado por *Aspergillus terreus* y *Penicillium* spp. En la rotación con *Mucuna deeringiana* y el tratamiento de solarización se encontraron 10 aislados, representando un 33.3 % (Cuadro 3).

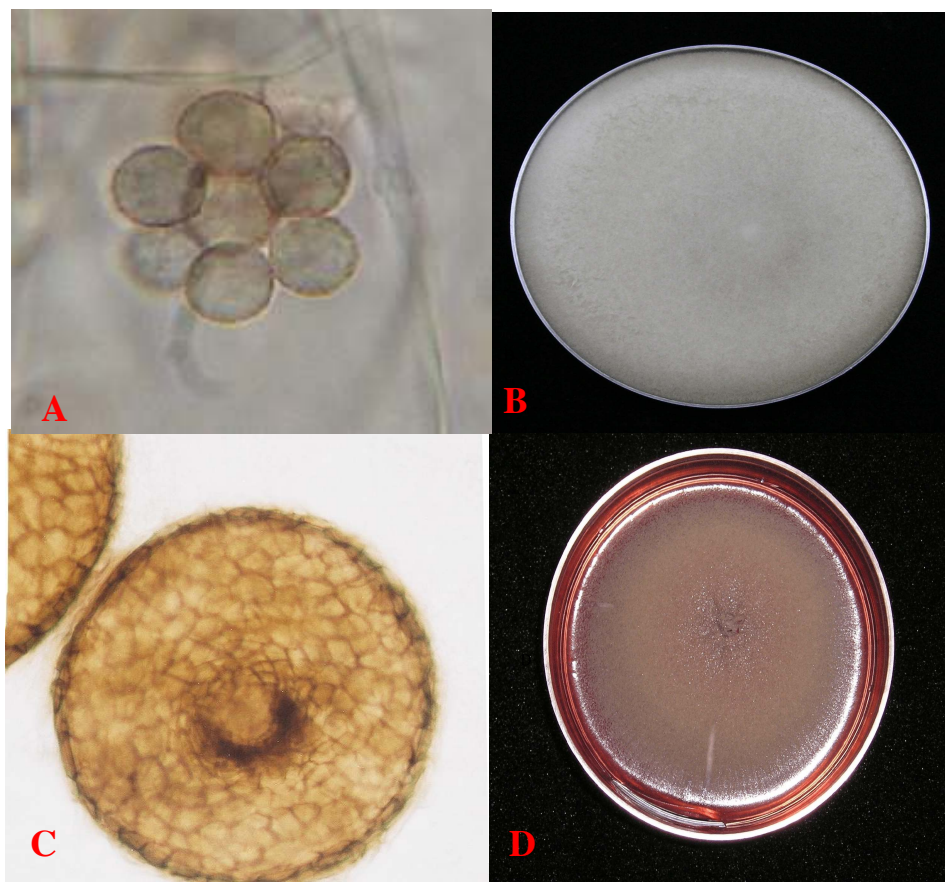


Figura 1. Hongos más frecuentes durante el primer ciclo (40X).
A. Conidióforo de *Cunninghamella elegans*; B. Colonia de *C. elegans* en agar de papa y dextrosa (ADP); C. Picnidio de *Rhizosphaera* spp; D. Colonia de *Rhizosphaera* spp. en ADP.

Cuadro 2. Diversidad de hongos asociados a la rizósfera a los 120 días del primer ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.^{1,2}

Clasificación	T:1	T:2	T:3	T:4	T:5	T:6
<i>Acremonium roseolum</i>	0 (0) ³	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
<i>Acremonium</i> spp.	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Acremonium</i> spp. (Total)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
<i>Aspergillus niger</i>	1 (0.6)	3 (1.7)	1 (0.6)	5 (2.8)	0 (0)	3 (1.7)
<i>Aspergillus terreus</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.1)	0 (0)	1 (0.6)
<i>Aspergillus</i> spp.	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Aspergillus</i> spp. (Total)	2 (1.1)	3 (1.7)	1 (0.6)	7 (3.9)	0 (0)	4 (2.2)
<i>Aurebasidium</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
<i>Choanoephora</i> spp.	1 (1.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
<i>Cladosporium</i> spp.	0 (0)	2 (1.1)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
<i>Cunninghamella elegans</i>	9 (5.0)	5 (2.8)	4 (2.2)	2 (1.1)	2 (1.1)	4 (2.2)
<i>Curvularia</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.1)	0 (0)
<i>Fusarium</i> spp.	2 (1.1)	4 (2.2)	9 (5.0)	0 (0)	6 (3.3)	3 (1.7)
<i>Humicola</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)

Clasificación	T:1	T:2	T:3	T:4	T:5	T:6
<i>Mortierrella</i> spp.	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	2 (1.1)	0 (0)	1 (0.6)
<i>Mucor</i> spp.	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)
<i>Penicillium ehinulatum</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.1)	0 (0)	0 (0)
<i>P. hirsutum</i>	2 (1.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>P. oxalicum</i>	2 (1.1)	1 (0.6)	2 (1.1)	3 (1.7)	2 (1.1)	1 (0.6)
<i>P. restrictum</i>	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.1)	1 (0)
<i>P. verrucosum</i>	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Penicillium</i> spp.	3 (1.7)	8 (4.4)	5 (2.8)	2 (1.1)	9 (5.0)	2 (1.1)
<i>Penicillium</i> spp. (Total)	9 (5.0)	9 (5.0)	7 (3.9)	7 (3.9)	13 (7.2)	4 (2.2)
<i>Phoma</i> spp.	0 (0)	1 (0.6)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Trichoderma</i> spp.	3 (1.7)	4 (2.2)	0 (0)	3 (1.7)	1 (0.6)	9 (5.0)
<i>Rizhospaera</i> spp.	1 (1.1)	0 (0)	0 (0)	9 (5.0)	0 (0)	1 (0.6)
Desconocidos ⁴	2 (1.1)	1 (0.6)	7 (3.8)	1 (0.6)	2 (1.1)	3 (1.7)
Total	180 (100.0)	180 (100.0)	180 (100.0)	180 (100.0)	180 (100.0)	180 (100.0)

¹T1= Maíz, T2= *Mucuna*, T3= Materia Orgánica, T4= Solarización, T5= Control Químico, T6= Control Absoluto.

²Valores representan el número total de 180 aislados por muestreo.

³Paréntesis = valores en paréntesis representan el porcentaje

⁴Hongos sin la presencia de estructuras reproductivas para su identificación

Acremonium spp. total incluye: *A. roseum* y *Acremonium* spp.

Aspergillus spp. total incluye: *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*.

Penicillium spp. total incluye: *P. echinulatum*, *P. hirsutum*, *P. oxalicum*, *P. restrictum*, *P. verrucosum* y *Penicillium* spp.

Cuadro 3. Hongos con actividad quitinolítica a los 120 días del primer ciclo bajo diferentes tratamientos bajo un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR¹

Tratamientos	Actividad quitinolítica positiva	Actividad quitinolítica negativa
Maíz	8 (26.7) ²	22 (73.3)
Haba de Terciopelo	10 (33.3)	20 (66.7)
Materia Orgánica	4 (13.3)	26 (86.7)
Solarización	10 (33.3)	20 (66.7)
Control Químico	9 (30.0)	21 (70.0)
Control Absoluto	13 (43.3)	17 (56.7)
Total	30 (100.0)	30 (100.0)

¹Valores representan el número de aislados de 30 analizados.

²Paréntesis = valores expresados como porcentaje

II. Hongos a 60 días después del segundo ciclo de cultivo:

1. Nivel poblacional de los hongos

La población significativamente más alta se observó en el tratamiento de rotación con maíz con 4.18 ufc/ g de suelo seco. La población más significativamente baja se observó en el tratamiento de rotación con haba de tercielo con un valor de 3.83 ufc/ g de suelo seco (Cuadro 1). No hubo diferencia significativa entre el tratamiento de solarización, (3.94 ufc/g de suelo seco) y el control químico, (3.91 ufc/g de suelo seco).

2. Diversidad de hongos

En el tratamiento de materia orgánica el mayor número de aislados pertenecían al género *Cunninghamella elegans* con 14 aislados, lo cual representó un 7.8 % del total de 180 aislados. Al igual que en el primer ciclo, éste fue el organismo más comúnmente aislado a través de los diferentes tratamientos. *Trichoderma* spp. fue el hongo más común en el tratamiento de rotación con haba de tercielo, al identificarse 14 aislados, lo cual representó un 7.78 % (Cuadro 4). *Aspergillus* spp. fue el mayor representante en el tratamiento de solarización con un 5 % de los aislados. No se encontró el género *Fusarium* spp. en el tratamiento de solarización; ni a *Curvularia* spp. en ningún de los tratamiento en este ciclo, a diferencia del ciclo anterior.

3. Actividad quitinolítica de los hongos

El mayor número de aislados con actividad quitinolítica se observó en los tratamientos con *M. deeringiana* con 15 aislados (50.0 %) pertenecientes al género *Trichoderma* spp., y solarización con 13 aislados, lo cual representa un 43.3 % (Cuadro 5).

Cuadro 4. Diversidad de hongos asociados a la rizósfera a los 60 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.^{1,2}

Clasificación	T:1	T:2	T:3	T:4	T:5	T:6
<i>Acremonium</i> spp.	0 (0) ³	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Aspergillus flavus</i>	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	7 (3.9)	0 (0)	0 (0)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Aspergillus niger</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
<i>Aspergillus terreus</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.1)	4 (2.2)	4 (2.2)
<i>Aspergillus</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (3.4)	0 (0)	2 (1.1)
<i>Aspergillus</i> spp.(Total)	2 (1.1)	0 (0)	0 (0)	9 (5.0)	5 (2.8)	6 (3.3)
<i>Bispora</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (4.4)	0 (0)	0 (0)
<i>Choanephora</i> spp.	2 (1.1)	0 (0)	4 (2.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Cladosporium</i> spp	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)
<i>Cunninghamella elegans</i>	5 (2.8)	3 (1.7)	14 (7.8)	1 (0.6)	5 (2.8)	2 (1.1)
<i>Fusarium</i> spp.	1 (0.6)	4 (2.2)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	2 (1.1)
<i>Humicola</i> spp.	0 (0)	1 (0.6)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)
<i>Mucor</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.1)	2 (1.1)

Clasificación	T:1	T:2	T:3	T:4	T:5	T:6
<i>Paecilomyces</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)
<i>Penicillium oxalicum</i>	3 (1.7)	0 (0)	0 (0)	2 (1.1)	1 (0.6)	0 (0)
<i>Penicillium</i> spp.	1 (0.6)	2 (1.1)	2 (1.1)	2 (1.1)	6 (3.3)	7 (3.9)
<i>Penicillium</i> spp.(Total)	4 (2.2)	2 (1.1)	2 (1.1)	4 (2.2)	7 (3.9)	7 (3.9)
<i>Phoma</i> spp.	0 (0)	2 (1.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Trichoderma</i> spp.	2 (1.1)	14 (7.8)	2 (1.1)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)
Deconocidos ⁴	14 (7.8)	3 (1.7)	6 (3.3)	6 (3.3)	11 (6.1)	9 (5.0)
Total	180 (100.0)	180 (100.0)	180 (100.0)	180 (100.0)	180 (100.0)	180 (100.0)

¹T:1= Maíz, T:2= Haba de terciopelo T:3= Materia Orgánica, T:4= Solarización, T:5= Control Químico, T:6= Control Absoluto.

²Valores representan el número total de 180 aislados por muestreo

³Paréntesis = Valores en paréntesis representan el porcentaje.

⁴Hongos sin la presencia de estructuras reproductivas para su identificación.

Aspergillus spp. total incluye: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Aspergillus* spp.

Penicillium spp. total incluye: *P. oxalicum*, *Penicillium* spp.

Cuadro 5. Hongos con actividad quitinolítica a los 60 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR¹

Tratamientos	Actividad quitinolítica positiva	Actividad quitinolítica negativa
Maíz	8 (26.6) ²	22 (73.3)
Haba de Terciopelo	15 (50.0)	15 (50.0)
Materia Orgánica	8 (26.6)	22 (73.3)
Solarización	13 (43.3)	17 (56.7)
Control Químico	5 (16.7)	25 (83.3)
Control Absoluto	7 (23.3)	23 (76.7)
Total	30 (100.0)	30 (100.0)

¹Valores representan el número de aislados de 30 analizados.

²Paréntesis () = Valores en paréntesis representan los porcentos.

III. Hongos 120 días del segundo ciclo

1. Nivel poblacional de los hongos

La población más significativamente alta se registró en el tratamiento de solarización con 4.44 ufc/ g de suelo seco. Se observó una rápida recuperación de las poblaciones de hongos a través del segundo ciclo. La población significativamente más baja se registró en haba de tercielo con 3.88 ufc/ g de suelo seco. El tratamiento de materia orgánica no demostró cambió en su población al compararse con el muestreo realizado a los 60 días al registrarse un valor de 4.02 ufc/g de suelo seco (Cuadro 1).

2. Diversidad de hongos

Cunninghamella elegans fue el hongo más frecuentemente aislado (5.6 %) en el tratamiento de materia orgánica. Se encontró un resultado similar a los 60 días en el segundo ciclo de cultivo donde el mayor número de aislados pertenecía a este género en dicho tratamiento. En el tratamiento de solarización el mayor número de aislados pertenecían al género *Penicillium* spp. con 11.1 %. La especie más frecuentemente aislada durante este ciclo a través de los tratamientos y que no se había reportado anteriormente (Cuadro 6) fue *P.frequentans* (Figura 2)

3. Actividad quitinolítica los hongos

El tratamiento de rotación con maíz presentó 15 aislados (50.0 %) y el tratamiento de materia orgánica 12 aislados (40.0 %). En ambos tratamientos el máximo representante de actividad quitinolítica fue *P.frequentans* (Cuadro 7).



Figura 2. Hongo más frecuentemente aislado durante el 2^{do} ciclo a 120 días (100 x). A. Conidióforo moverticilado de *Penicillium frequentans*; B. Conióforo de *P. frequentans*; C. Colonia en extracto de malta; D. Colonia en Czapeck con agar y extracto de levadura.

Cuadro 6. Diversidad de hongos asociados a la rizósfera a 120 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR^{1,2}

Clasificación	T1	T:2	T:3	T:4	T:5	T:6
<i>Acremonium roseolum</i>	1 (0.6) ³	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)
<i>Acremonium</i> spp. (Total)	1 (0.6)	1 (0.6)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)
<i>Aspergillus flavus</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.1)	0 (0)	0 (0)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)
<i>Aspergillus terreus</i>	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	2 (1.1)	1 (0.6)	0 (0)
<i>Aspergillus</i> spp. (Total)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	4 (2.2)	1 (0.6)	1 (0.6)
<i>Choanephora</i> spp.	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Cunninghamella elegans</i>	5 (2.8)	3 (1.7)	10 (5.6)	0 (0)	6 (3.3)	9 (5.0)
<i>Curvularia</i> spp	1 (0.6)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
<i>Fusarium</i> spp.	1 (0.6)	4 (2.2)	2 (1.1)	0 (0)	4 (2.2)	4 (2.2)
<i>Helicocephalum</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)
<i>Humicola</i> spp.	0 (0)	0 (0)	2 (1.1)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
<i>Metarhizium</i> spp.	1 (0.6)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Mucor</i> spp.	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Clasificación	T1	T:2	T:3	T:4	T:5	T:6
<i>Penicillium frequentans</i>	10 (5.6)	5 (2.8)	4(2.2)	7 (3.9)	6(3.3)	3 (1.7)
<i>P. oxalicum</i>	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Penicillium</i> spp.	2 (1.1)	0 (0)	2 (1.1)	13 (7.2)	9 (5.0)	7 (3.9)
<i>Penicillium</i> spp. (Total)	13 (7.2)	5 (2.8)	6 (3.3)	20 (11.1)	15 (8.3)	10 (5.6)
<i>Phoma</i> spp	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Rhizopus</i> spp.	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Trichoderma</i> spp	1 (0.6)	3 (1.7)	2 (1.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Deconocidos ⁴	5 (2.8)	11 (6.1)	5 (2.8)	5 (2.8)	2 (1.1)	5 (2.8)
Total	180 (100)	180 (100)	180 (100)	180 (100)	180 (100)	180 (100)

¹T:1= Maíz, T:2= Haba de terciopelo, T:3= Materia orgánica, T:4= Solarización, T:5= Control Químico, T:6= Control Absoluto.

²Valores representan el número total de 180 aislados por muestreo

³Paréntesis = Valores en paréntesis representan los porcentajes

⁴Hongos con ausencia de estructuras reproductivas para su identificación.

Acremonium spp. total incluye: *A. roseum*

Aspergillus spp. total incluye: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Aspergillus* spp.

Penicillium spp. total incluye: *P. frequentans*, *P. oxalicum*, *Penicillium* spp.

Cuadro 7. Hongos con actividad quitinolítica a los 120 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR¹

Tratamientos	Actividad quitinolítica positiva	Actividad quitinolítica negativa
Maíz	15 (50.0) ²	15 (50.0)
Haba de Terciopelo	9 (30.0)	21 (70.0)
Materia Orgánica	12 (40.0)	8 (60.0)
Solarización	9 (30.0)	21 (70.0)
Control Químico	8 (26.7)	22 (73.3)
Control Absoluto	5 (16.7)	25 (83.3)
Total	30 (100.0)	30 (100.0)

¹Valores representan el número de aislados de 30 analizados.

²Paréntesis = Valores en paréntesis representan los porcentajes.

En resumen los hongos quitinolíticos más frecuentemente aislados a través de todos los ciclos y tratamientos fueron: *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *Humicola* spp., *Mortierella* spp., *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma* spp. (Figuras 3, 4 y 5).

IV. Bacterias a los 120 días del primer ciclo

1. Nivel poblacional bacteriano

Se observó un aumento en el nivel poblacional bacteriana luego de aplicar los tratamientos en comparación con el valor de la población (4.54 ufc/ g de suelo seco) antes de la aplicación de éstos. Las poblaciones bacterianas totales más altas se observaron en los tratamientos de control químico (5.00 ufc/ g de suelo seco), solarización, (4.89 ufc/ g de suelo seco) y materia orgánica, (4.84 ufc/ g de suelo seco). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de materia orgánica y solarización. La población significativamente más baja se observó en el tratamiento de rotación con *M. deeringiana* con un valor de 4.57 ufc/ g de suelo seco. En el tratamiento de solarización la población de *Bacillus* spp. era la significativamente más alta con 4.78 ufc/ g de suelo seco. No se observaron diferencias entre el control absoluto (4.30 ufc/ g de suelo seco) y el control químico (4.34 ufc/ g de suelo seco).

La población de *Pseudomonas* fue más alta en el tratamiento de materia orgánica con 4.49 ufc/ g de suelo seco. No hubo diferencias entre la rotación con maíz, (4.00 ufc/ g de suelo seco), solarización, (4.04 ufc/ g de suelo seco) y control absoluto, (4.04 ufc/ g de suelo

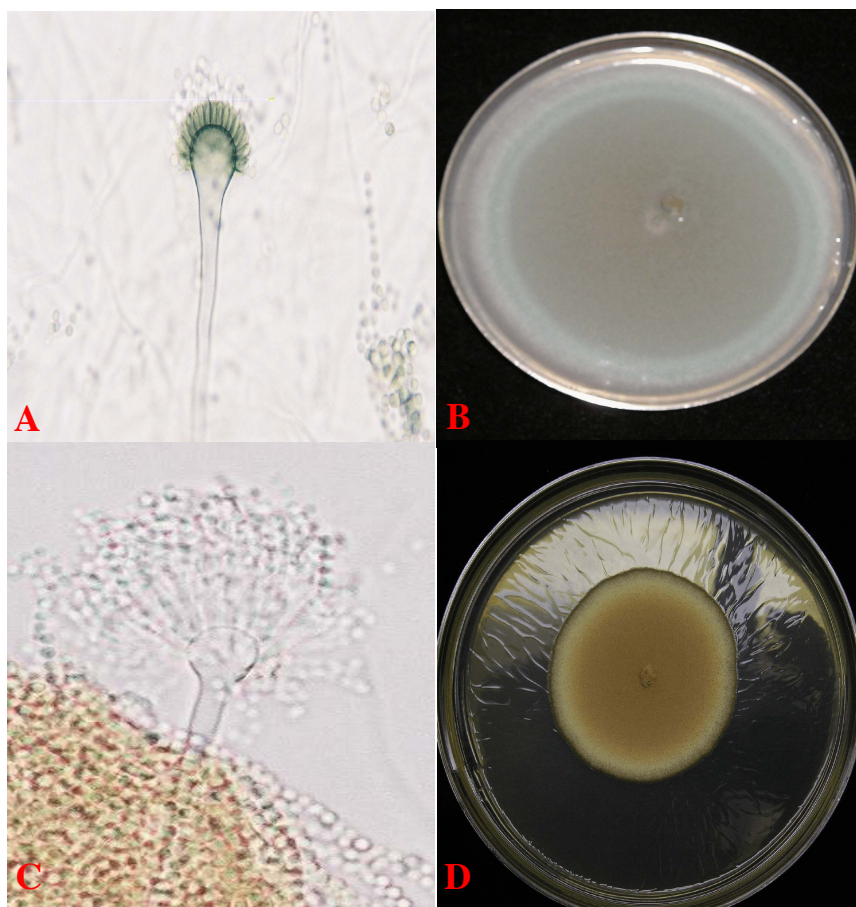


Figura 3. Hongos quitinolíticos más frecuentemente aislados (40 x).
A. Conidióforo de *Aspergillus flavus*; B. Colonia de *A. flavus* en ADP;
C. Conidióforo de *A. terreus*; D. Colonia de *A. terreus* en ADP.

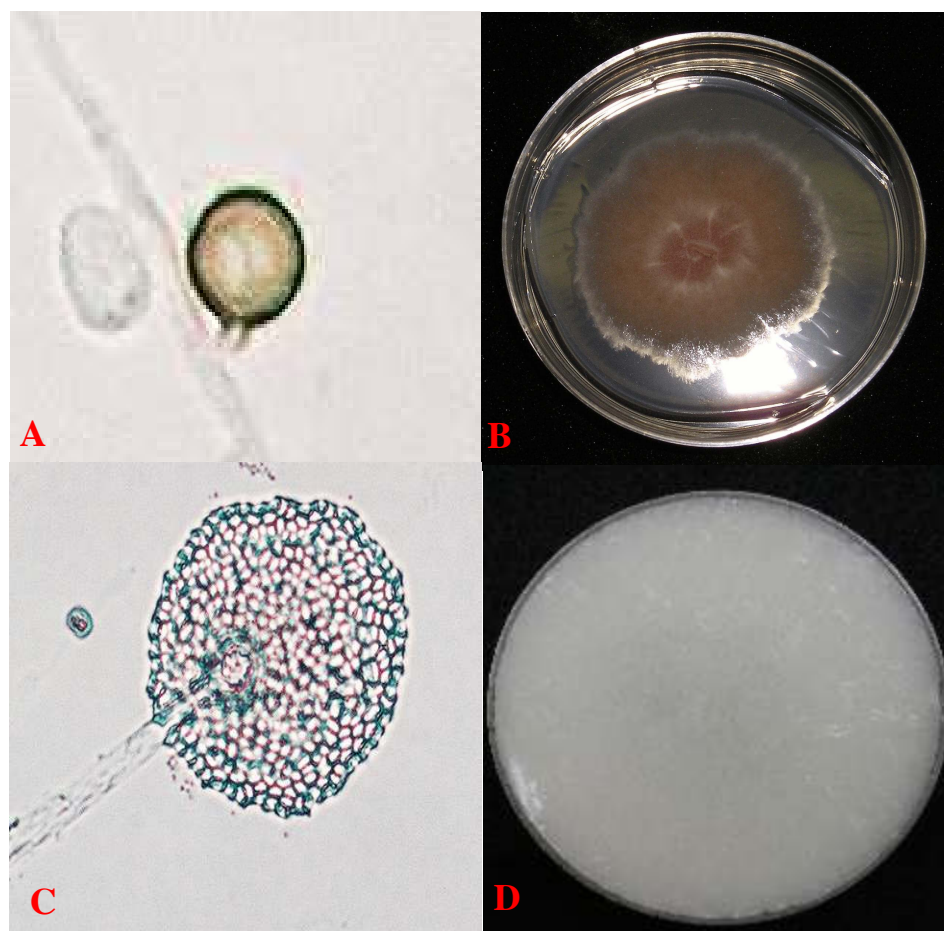


Figura 4. Hongos quitinolíticos más frecuentemente aislados (40 X).
A. Conidia de *Humicola* spp.; B. Colonia de *Humicola* spp. en ADP;
C. Conidióforo de *Mortirrella* spp.; D. Colonia de *Mortirrella* spp.
en ADP.

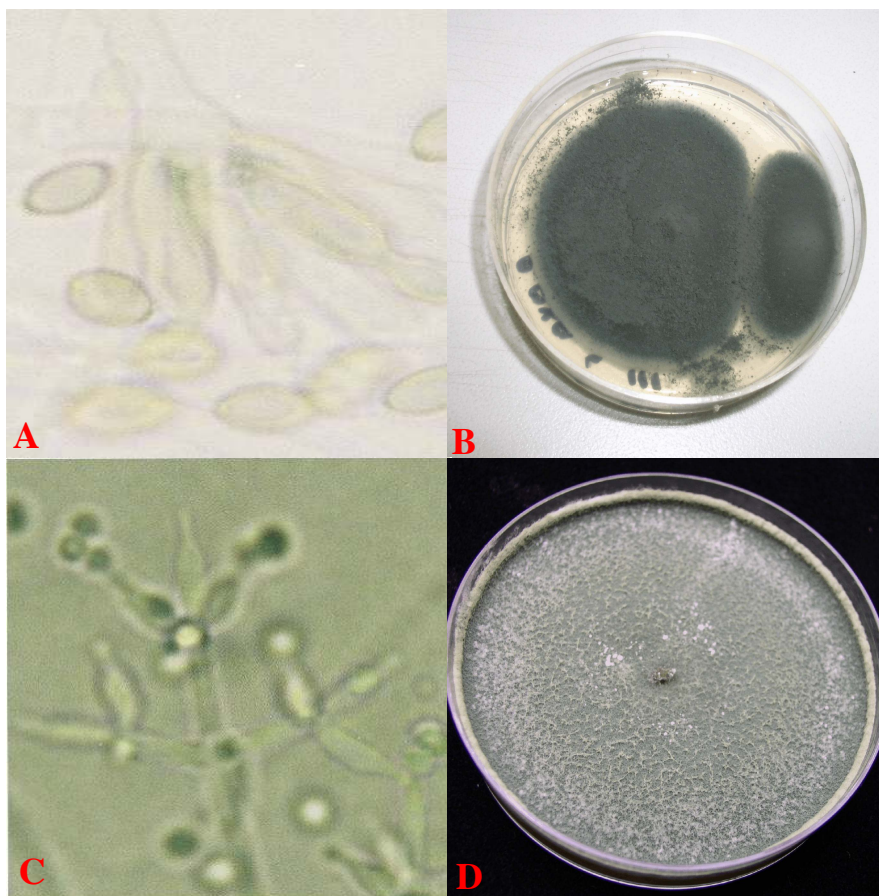


Figura 5. Hongos quitinolíticos más frecuentemente aislados (40 X)
A. Conidióforo de *Penicillium oxalicum*; B. Colonia de *P. oxalicum* en ADP; C. Conidióforo de *Trichoderma* spp; D. Colonia de *Trichoderma* spp. en ADP.

seco). La poblaciones más bajas se observaron en el tratamiento de rotación con haba de terciopelo con 3.66 ufc/ g de suelo seco (Cuadro 8).

2. Diversidad bacteriana

De la selección al azar de la poblaciones totales bacterianas se encontró que en la rotación con maíz, las cepas predominantes fueron 100 % Gram positivas, en comparación con rotación con *Mucuna* donde se observó un 90 % Gram positivas y en la solarización un 100 % Gram positivas. Estos resultados contrastan con el encontrado en el muestreo preliminar donde la diversidad bacteriana fue más equitativa al aislarse un 50 % Gram positivo y un 50 % Gram negativo (Apéndice 2) (Cuadro 9).

3. Actividad quitinolítica bacteriana

El mayor número de cepas con actividad quitinolítica se observaron en los tratamientos de materia orgánica con 8 cepas, representando un 26.7 % del total de aislados y el de control absoluto con 7 aislados, lo cual representó un 23.3 % (Cuadro 10).

V. Bacterias a los 60 días del segundo ciclo

1. Nivel poblacional bacteriano

Las poblaciones bacterianas totales más altas se observaron en los tratamientos de rotación con maíz con 4.92 ufc/ g de suelo y *M. deeringiana* con 4.97 ufc/ g de suelo seco. Los niveles poblacionales no fueron significativamente diferentes al comparar las medias de ambos tratamientos ($P \leq 0.05$). La población más baja se observó en el

Cuadro 8. Poblaciones bacterianas a los 120 días del primer ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, P.R.^{1,2,3}

Tratamiento	Totales	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Maíz	4.72 c	4.64 b	4.00 b
Haba de terciopelo	4.57 d	4.70 ab	3.66 c
Materia orgánica	4.84 b	4.61 b	4.49 a
Solarización	4.89 ab	4.78 a	4.04 b
Control Químico	5.00 a	4.34 c	4.45 a
Control Absoluto	4.83 bc	4.30 e	4.04 b
DMS (P ≤0.05)	0.11	0.10	0.05

¹Valores en cada columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) (P≤0.05).

²Media de diez réplicas.

³Colonias expresadas como log₁₀ ufc/g de suelo seco

Cuadro 9. Diversidad bacteriana a los 120 días del primer ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.¹

Tratamientos	Bacterias Gram positivo	Bacterias Gram negativo
Maíz	30 (100.0) ²	0 (0)
Haba de terciopelo	27 (90.0)	3 (10.0)
Materia orgánica	20 (66.7)	10 (33.3)
Solarización	30 (100.0)	0 (0)
Control Químico	15 (50.0)	15 (50.0)
Control Absoluto	15 (50.0)	15 (50.0)
Total	30 (100.0)	30 (100.0)

¹Valores representan el número de aislados de 30 analizados.

²Paréntesis = Valores en porcentaje representan porcentos.

Cuadro 10. Bacterias con actividad quitinolítica a los 120 días del primer ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR ¹

Tratamientos	Actividad quitinolítica positiva	Actividad quitinolítica negativa
Maíz	4 (13.3) ²	26 (86.7)
Haba de terciopelo	4 (13.3)	26 (86.7)
Materia Orgánica	8 (26.7)	22 (73.3)
Solarización	2 (6.7)	28 (93.3)
Control Químico	6 (20.0)	24 (80.0)
Control Absoluto	7 (23.3)	23 (76.7)
Total	30 (100.0)	30 (100.0)

¹Valores representan el número de aislados de 30 analizados

²Paréntesis = Valores en paréntesis representan porcentajes.

en el tratamiento de control químico con 4.79 ufc/ g de suelo seco

La poblaciones de *Bacillus* spp. en los tratamientos de rotación con maíz, rotación con haba de terciopelo y el control químico no fueron significativamente diferentes. La población significativamente más alta se observó en el tratamiento de materia orgánica con 4.76 ufc/ g de suelo seco. La población más baja se registró en el control absoluto con 4.49 ufc/ g de suelo (Cuadro 11).

Las poblaciones más altas de *Pseudomonas* spp. se observaron en los tratamientos de materia orgánica con 4.01 ufc/ g de suelo seco, control químico con 3.91 ufc/g de suelo seco y control absoluto con 3.99 ufc/ g de suelo seco. Estos valores no representan poblaciones significativamente diferentes. En la rotación con maíz se observó una población de 3.65 ufc/ g de suelo seco, siendo ésta la más baja (Cuadro 11).

2. Diversidad bacteriana

En todos los tratamientos predominaron las bacterias pertenecientes al grupo Gram positivo. El tratamiento de solarización presentó un 100 % en bacterias Gram positiva, no se observó un cambio en la diversidad a los 60 días de remover el plástico (Cuadro 12).

3. Actividad quitinolítica bacteriana

El mayor número de cepas con actividad quitinolítica se observaron en los tratamientos de materia orgánica y solarización. En ambos tratamientos se aislaron cuatro cepas bacterianas con actividad positiva a quitina (13.3 %) (Cuadro 13).

Cuadro 11. Poblaciones bacterianas a los 60 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos bajo un programa de agricultura sustentable en la subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.^{1,2,3}

Tratamiento	Totales	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Maíz	4.95 a	4.58 abc	3.65 c
Haba de Terciopelo	4.97 a	4.57 bc	3.77 b
Materia Orgánica	4.87 ab	4.76 a	4.01 a
Solarización	4.90 ab	4.74 ab	3.67 bc
Control Químico	4.79 b	4.57 bc	3.91 a
Control Absoluto	4.88 ab	4.49 c	3.99 a
DMS (P ≤ 0.05)	0.12	0.18	0.1

¹Valores en cada columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) (P ≤ 0.05).

²Media de diez réplicas.

³Colonias expresadas como log₁₀ ufc/g de suelo seco

Cuadro 12. Diversidad bacteriana a 60 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos en durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.¹

Tratamientos	Bacterias Gram positivo	Bacterias Gram negativo
Maíz	23 (76.7) ²	7 (23.3)
Haba de Terciopelo	21 (70.0)	7 (30.0)
Materia orgánica	20 (66.7)	10 (33.3)
Solarización	30 (100.0)	0 (0)
Control Químico	28 (93.3)	2 (6.7)
Control Absoluto	24 (80.0)	5 (20.0)
Total	30 (100.0)	30 (100.0)

¹Valores representan el número de aislados de 30 analizados.

²Paréntesis = Valores en paréntesis representan porcentajes.

Cuadro 13. Bacterias con actividad quitinolítica a 60 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.¹

Tratamientos	Actividad quitinolítica positiva	Actividad quitinolítico negativa
Maíz	3 (10.0) ²	27 (90.0)
Haba de Terciopelo	3 (10.0)	3 (90.0)
Materia Orgánica	4 (13.3)	26 (86.7)
Solarización	4 (13.3)	26 (86.7)
Control Químico	2 (6.7)	30 (100.0)
Control Absoluto	2 (6.7)	30 (100.0)
Total	30 (100.0)	30 (100.0)

¹Valores representan el número de aislados de 30 analizados

²Paréntesis =Valores en paréntesis representan los porcentajes

VI. Bacterias a los 120 días del segundo ciclo

1. Nivel poblacional bacteriano

Las poblaciones bacterianas totales aumentaron en los tratamientos de rotación con maíz, materia orgánica, control químico y control absoluto. La población más alta se observó en el control químico con 5.16 ufc/ g de suelo seco, pero no fue significativamente diferente a los tratamientos de rotación con maíz con 5.11 ufc/ g de suelo seco y materia orgánica con 5.10 ufc/g de suelo seco. La población más baja se observó en el de solarización, con 4.69 ufc/ g de suelo seco.

Las poblaciones más altas de *Bacillus* se observaron en los tratamientos de rotación con maíz y control absoluto, ambos con 4.80 ufc/ g de suelo seco. No se observaron diferencias entre el tratamiento de solarización y ni el de control químico. Los niveles poblacionales de ambos tratamientos no fueron diferentes al compararse de forma estadística con los tratamientos de rotación con maíz y el control absoluto.

Se observó una población de 4.45 ufc/ g de suelo seco en el tratamiento de rotación con maíz, siendo ésta la población significativamente más alta. No se encontraron diferencias entre los niveles poblacionales, en los tratamientos de rotación con *Mucuna*, materia orgánica y el control absoluto (Cuadro 14).

2. Diversidad bacteriana

Luego del tratamiento con materia orgánica, se aislaron 11 cepas (36.7 %) Gram positivo y 19 cepas (63.3 %) Gram negativo. Los tratamientos de solarización, control químico y control absoluto estaban compuestos de cepas Gram positivo en un 100 %. El

Cuadro 14. Poblaciones bacteriales a 120 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR.^{1,2,3}

Tratamiento	Totales	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Maíz	5.11 ab	4.80 a	4.45 a
Haba de Terciopelo	4.74 c	4.66 abc	4.30 bc
Materia Orgánica	5.10 ab	4.53 c	4.33 b
Solarización	4.69 c	4.58 ab	3.86 d
Control Químico	5.16 a	4.73 ab	4.24 c
Control Absoluto	5.02 ab	4.80 a	4.32 bc
DMS	0.12	0.17	0.85

¹Valores en cada columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) ($P \leq 0.05$).

²Media de diez réplicas.

³Colonias expresadas como \log_{10} ufc/g de suelo seco

Cuadro 15. Diversidad bacteriana a 120 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR¹

Tratamientos	Bacterias Gram positivo	Bacterias Gram negativo
Maíz	22 (73.3) ²	8 (26.7)
Haba de terciopelo	17 (56.7)	13 (43.3)
Materia Orgánica	11 (36.7)	19 (63.3)
Solarización	30 (100.0)	0 (0)
Control Químico	30 (100.0)	20 (0)
Control Absoluto	30 (100.0)	0 (0)
Total	30 (100.0)	30 (100.0)

¹Valores representan el número de aislados de 30 analizados.

²Paréntesis = Valores en paréntesis representan porcentajes.

tratamiento de solarización fue constante en diversidad al presentar poblaciones bacterianas Gram positivas (Cuadro 15).

3. Actividad quitinolítica bacteriana

Los únicos tratamientos con cepas de bacterias positivas a quitina fueron el de rotación con maíz y el uso de materia orgánica con 6.7 %, representando por dos aislados en ambos tratamientos. La rotación con haba de terciopelo alcanzó un 3.3 %, con un sólo aislado (Cuadro 16).

Cuadro 16. Bacterias con actividad quitinolítica a 120 días del segundo ciclo bajo diferentes tratamientos durante un programa de agricultura sustentable en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela, PR¹

Tratamientos	Actividad quitinolítica positivo	Actividad quitinolítica negativa
Maíz	2 (6.6) ²	28 (93.3)
Haba de terciopelo	1 (3.3)	29 (96.7)
Materia Orgánica	2 (6.7)	28 (93.3)
Solarización	0 (0)	30 (100.0)
Control Químico	0 (0)	30 (100.0)
Control Absoluto	0 (0)	30 (100.0)
Total	30 (100.0)	30 (100.0)

¹Valores representan el número de aislados de 30 analizados.

²Paréntesis = Valores en paréntesis representan porcentajes.

Discusión

I. Rotación de cultivos

Al analizar las poblaciones microbianas asociadas a los tratamientos de rotación con maíz y el haba de terciopelo, se encontró un aumento en las poblaciones y un cambio en diversidad particular a cada planta. Según, Wander et al. (1995), la rotación de cultivos como práctica agrícola dentro de un programa de agricultura sustentable, sirve de herramienta para incrementar el tamaño, la actividad y la diversidad de la comunidad microbiana de la rizósfera del suelo. Gomes et al. (2001), informaron un incremento en las poblaciones bacterianas de la rizósfera al final del ciclo del maíz. En el año 2003, Marcial Gomes et al., informaron que en los suelos tropicales ciertas poblaciones de hongos asociadas al maíz se incrementan. Dichos informes están de acuerdo al incremento en las poblaciones de *C. elegans* y *Penicillium* spp. encontrados durante el primer ciclo y anteriormente informados en estudios preliminares. El maíz tiene un efecto positivo sobre las poblaciones de hongos promoviendo su aumento (Buyer et al., 2002). Esto se debe a la liberación de una gran biomasa de compuestos de carbono. Las poblaciones bacterianas también responden al incremento en compuestos de carbono, aumentando su densidad en la rizósfera del suelo (Quian et al., 1997). Las diferencias en las poblaciones microbianas de la rizósfera están influenciadas por la cantidad y tipo de material orgánico liberado por las raíces de las plantas (Lynch, 1990). Según Gollany et al. (1991), las leguminosas tienen una relación estrecha de C/N favoreciendo la actividad de hongos. Según Kloepper et al. (1991

y 1992), el haba de terciopelo tiene propiedades antagonistas contra los nematodos debido a los componentes microbianos liberados en la rizósfera. Estos resultados son consistentes con los encontrados en este estudio, ya que se identificaron un número considerable de hongos y bacterias quitinolíticos. La mayoría de los hongos quitinolíticos aislados durante la investigación pertenecen al género *Trichoderma* spp. Según Haran y colaboradores (1996), *Trichoderma* spp. es un agente de control biológico efectivo por la producción de enzimas como las glucanasas, proteínasas y quitinasas, las cuales son importantes en los procesos micoparásitos. La actividad proteolítica de este hongo es importante en el control biológico de los nematodos (Sharon et al., 2001). El haba de terciopelo reduce las poblaciones bacterianas ya que libera compuestos que pueden ser tóxicos para ciertos organismos, convirtiendo así la rizósfera del suelo en una más selectiva (Vargas Ayala, 1995). Los resultados encontrados en el haba de terciopelo son consistentes con los informes previos, ya que las poblaciones bacterianas fueron menores al compararse con la de los otros tratamientos. En este tratamiento se encontró una flora microbiana diferente al tratamiento control, lo cual indica su efecto selectivo e inhibidor. Lupwayi y colaboradores (1998), proponen que la rotación de cultivos, cuando se utiliza leguminosas, mantiene una comunidad microbiana funcional diversa. Kloepper et al. (1992), informaron en sus estudios que las rizobacterias encontradas en la raíces del haba de terciopelo, son fisiológicamente diferentes a bacterias presentes en la rizósfera de otras plantas antagonistas. Al éstas estar adaptadas pueden degradar ciertos compuestos orgánicos, como los fenoles, que pueden estar presentes en los exudados del haba de terciopelo (Vargas Ayala, 1995).

La predominancia de las bacterias Gram positivas en la rizósfera del haba de terciopelo durante la investigación están de acuerdo a los informes de Chavarría Carvajal en 1992. En trabajos previamente publicados se ha observado la importancia de la influencia de las plantas sobre las bacterias presentes en su rizósfera (Miller et al., 1989). Se observaron niveles poblacionales particulares de forma detallada como resultado de la influencia del maíz y el haba de terciopelo sobre la rizósfera. Esto indica los efectos beneficiosos de la rotación de cultivos sobre las tierras agrícolas, debido a que los microorganismos son estimulados por los exudados de las raíces. Cada planta tiene una flora microbiana única asociada a su rizósfera la cual puede ser útil en el control biológico, si es manejada adecuadamente.

En resumen las poblaciones microbianas monitoreadas durante los dos ciclos de estudio fueron afectadas por las plantas a las que se encontraron asociadas. En las investigaciones realizadas por Hedmuld en el año 2000, se encontró un resultado similar donde se informó que la comunidad microbiana responde a los cambios en la vegetación. Las rizobacterias son influenciadas por especies de plantas específicas. El tamaño y composición de la microflora de la rizósfera depende en gran parte de la planta a la cuál esta asociada (Miller, 1989).

II. Materia Orgánica

El aumento en el nivel poblacional de hongos y bacterias se observó de forma más evidente a los 60 días luego de la gallinaza incorporarse al suelo. Según Fontaine et al.

(2003), el aumento en las poblaciones microbianas se debe a una alta disponibilidad de energía liberada de la materia orgánica fresca al descomponerse. Los altos niveles de actividad microbiana son el factor principal en el control de las enfermedades. Boulter et al., (2002), concluyeron que el control de las enfermedades está relacionado con una combinación de mecanismos físico-químicos y biológicos.

Según Chavarría Carvajal (2001), algunas enmiendas orgánicas han sido asociadas con un incremento en las poblaciones de hongos con propiedades antagonistas a los nematodos. La gallinaza posee un alto contenido de nitrógeno que es transformado a amonio al decomponerse por las poblaciones microbianas. El amonio por ser un compuesto tóxico, ejerce control sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos (Kaplan y Noe, 1993). Los hongos como *Penicillium* spp. (Pitt, 1986) y *Aspergillus* spp. (Raper, 1949) son capaces de manejar compuestos ricos en nitrógeno. Debido a la disposición metabólica de estos hongos de manejar compuestos altos en nitrógeno, como lo es la gallinaza, se encontró un gran número de aislados pertenecientes a esos géneros. La selección de enmiendas con composición específica facilita la selección de ciertos microorganismos antagonistas de patógenos del suelo (Rodríguez Kabana et al., 1987). El amonio es un compuesto estable que hace disponible el nitrógeno para la planta y ciertos microorganismos (Burger y Jackson, 2003). El uso de enmiendas orgánicas con alta concentración en nitrógeno es útil en la reducción de enfermedades causadas por patógenos del suelo.

El uso de enmiendas orgánicas aumenta la biodiversidad de la flora y fauna del suelo (Kimpinski et al, 2003). Durante este estudio se observó un cambio en la diversidad con

propiedades de control biológico. Se aislaron hongos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Humicola* spp. con el potencial de ser agentes biocontroladores. Durante todos los periodos de muestreo y en un mayor número en el tratamiento de materia orgánica se aisló *Cunninghamella elegans*. Según Domesh (1980), *C. elegans* es un zigomiceto común de la rizósfera del suelo en zonas subtropicales. Este hongo tiene la capacidad de descomponer distintas formas de celulosa para obtener carbono y utiliza peptona como recurso de nitrógeno.

La cantidad de biomasa microbiana ésta relacionada con el contenido de materia orgánica (Li et al., 2004). El aumento en el nivel poblacional microbiana depende de la calidad y composición de la materia orgánica. Los microorganismos no responden de la misma forma a todos los compuestos orgánicos.

III. Solarización

La exposición del suelo a la solarización cambia las poblaciones de hongos al disminuir sus niveles y afectar su diversidad. Según Katan (1981), el efecto que crea la capa de polietileno sobre el suelo, elevando su temperatura por varias horas al día, es el causante de cambiar las poblaciones microbianas, la composición física y química del suelo. Estudios en California realizados por Stapleton y De Vay (1984), demostraron una reducción de un 90 a 85 % en las poblaciones de hongos al utilizar la solarización por 4.5 semanas. Estos resultados concuerdan con lo observado durante esta investigación, donde hubo una reducción en población de hongos encontrada.

La solarización afectó las poblaciones de hongos pertenecientes al género *Fusarium* spp., ya que éste no se encontró al finalizar el tratamiento y permaneció su efecto aún a los 120 días del segundo ciclo. Sin embargo, siguió siendo abundante en los demás tratamientos experimentales. En Israel, Katan y sus colaboradores (1976), han informado una reducción en las poblaciones de *Fusarium oxysporum* f.sp. *licopersici*, de un 67 a 100 % durante un período de 30 días de solarización en el verano. Chellemi et al. (1994), encontraron resultados similares al utilizar un tiempo de solarización de 32 - 49 días y han reportado en diferentes estudios en donde se reducen las poblaciones de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. La solarización afecta la viabilidad de los microorganismos debido a que se excede la temperatura máxima de crecimiento. La razón de muerte termal de una población de organismos depende del nivel de temperatura y el tiempo de exposición, las cuales están inversamente relacionadas (Katan, 1980). Stapleton y De Vay (1982), en sus estudios sugieren que *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. son los hongos que se han aislado con más frecuencia en suelos solarizados. Según Katan (1980), *Trichoderma* spp. puede incrementar su población y sobrevivir a altas temperaturas. La diversidad de hongos en este tratamiento es consistente con los reportes previos, ya que, se encontró un 3.9 % de hongos pertenecientes al género *Aspergillus* spp., un 2.2 % perteneciente al género *Penicillium* spp. y un 0.6 % perteneciente al género *Trichoderma* spp. El aumento en las poblaciones de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* spp. se debe a un efecto de activación de sus propágulos creado por la solarización. Según Katan (1980), las poblaciones de hongos termofílicos/termotolerantes permanecen relativamente altas después de aplicar la

solarización (Katan, 1980). Según Klich (2002), *A. flavus* y *A. terreus* son las especies de *Aspergillus* más abundantes en los suelos agrícolas.

Bacillus spp. ha sido reportada como la bacteria Gram positiva predominante en suelos solarizados, según Stapleton y De Vay (1982). En sus estudios de 1984 reportaron datos similares y demostraron los efectos beneficiosos de las bacteria termotolerantes hacia las plantas. Estos reportaron un aumento en las poblaciones de *Bacillus*, indicando que proliferan en suelos solarizados al igual que otros organismos termotolerantes. Los resultados encontrados en este estudio son consistentes con los reportes previos, ya que se encontró una población 100 % Gram positiva a través de todos los ciclos. McGovern y McSorley (2002), han reportado el aumento en las poblaciones de rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta. Los hallazgos a los 60 días del segundo ciclo, indicaron un aumento en las poblaciones bacterianas totales, lo cual es consistente con los resultados previamente reportados. La solarización promueve diversos grupos de rizobacterias que componen las bacterias promotoras del crecimiento de la planta como lo son las *Pseudomonas* spp., las cuales pueden actuar como biofertilizantes al ayudar a la planta de forma directa en la adquisición de nutrientes o de forma indirecta a través de relaciones simbióticas (Vessey, 2003). Durante el periodo de solarización se estimularon las poblaciones de *Pseudomonas* spp. y en un mayor nivel las poblaciones de *Bacillus* spp., las cuales pueden tener diversos representantes dentro del grupo de las bacterias promotoras del crecimiento de la planta. El incremento en las poblaciones de *Pseudomonas fluorescens*

colonizadoras de suelos solarizados ha sido reportado en estudios realizados por Gamliel y Katan (1993).

Según Katan (1980), los patógenos son menos resistentes al calor que muchos saprófitos y antagonistas como *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis*. En estudios realizados por Katan y sus colaboradores (1976), la solarización ha demostrado ser letal para patógenos del suelo y tiene un efecto de control biológico a largo plazo. Los propágulos de los hongos entran a una etapa de resistencia pasiva casi nula y los propágulos de microorganismos quitinolíticos reaccionan al calor ejerciendo un efecto antagonista. Los hongos termotolerantes como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Trichoderma* spp. pueden actuar como biocontroladores de nematodos a través de su acción quitinolítica.

La solarización es un método efectivo para eliminar patógenos del suelo bajo condiciones climatológicas adecuadas especialmente en áreas tropicales. De acuerdo a Gamliel y Stapleton (1993), bajo condiciones climatológicas sostenibles, este proceso es útil en el control de una amplia gama de microorganismos patógenos del suelo (bacterias, hongos, nematodos), y control de malezas y otras plagas en diversos sistemas agrícolas.

En resumen, analizar la diversidad de organismos es importante cuando se considera la habilidad de los ecosistemas a responder a cambios en las condiciones ambientales (Prosser, 1995). La diversidad microbiana es importante en la agricultura sustentable, porque los microorganismos median muchos procesos que dan soporte a la producción agrícola (Lupwayi, 1998). Según Kennedy y Smith (1995), los microorganismos son la clave en el flujo de energía en los ecosistemas. Los microorganismos tienen un rol principal

en la descomposición de compuestos complejos a moléculas más sencillas de rápida utilización. Los ecosistemas agrícolas necesitan de los microorganismos para su sostenibilidad. La calidad del suelo no sólo depende de sus propiedades físicas y químicas, si no también de las biológicas. Especies particulares de microorganismos son indicadores de las condiciones de un ecosistema (Kennedy y Smith, 1995).

La aplicación de compuestos químicos para el control de los patógenos del suelo puede alterar poblaciones nativas de microorganismos beneficiosos (Alexander, 1980). Por lo tanto, el uso de prácticas no convencionales en la agricultura ayuda a conservar la microflora autóctona del ecosistema agrícola. Además, el uso de prácticas de agricultura sustentable puede influenciar poblaciones de microorganismos que degraden ciertos químicos.

La rotación de cultivos, las enmiendas orgánicas y la solarización son herramientas con un impacto positivo en la agricultura debido a que incrementan el tamaño, actividad y diversidad de los microorganismos de una comunidad (Wander et al., 1995). Dicho señalamiento es consistente con lo encontrado durante esta investigación, ya que se encontraron cambios beneficiosos en las poblaciones microbianas y en su diversidad.

Conclusiones

1. Las prácticas de agricultura sustentable utilizadas cambian la flora microbiana de la rizósfera del suelo al diversificarla y aumentar su nivel poblacional.
2. La gallinaza como enmienda orgánica estimula ciertos microorganismos específicos tolerantes al amonio. Es una solución al manejo de material que puede contaminar los cuerpos de agua. Se reduce el uso de fertilizantes sintéticos y fungicidas de origen químicos.
3. La solarización es una técnica efectiva para el control de patógenos del suelo al reducir las poblaciones de hongos y aumentar las poblaciones de bacterias beneficiosas. *Bacillus* spp. es la bacteria más predominante en suelos solarizados y por lo tanto es útil en los procesos de control biológico debido a su producción de antibióticos.
4. *Cunninghamella elegans* es un zigomiceto estimulado por la incorporación de materia orgánica.
5. *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. son hongos termotolerantes al sobrevivir su propágulo a las altas temperaturas producidas por la solarización. Son hongos con potencial de control biológico.
6. Las prácticas para una agricultura sustentable son eficientes en el control de patógenos del suelo, por lo tanto se reduce el uso de plaguicidas y se producen alimentos más saludables.

Recomendaciones

1. Realizar una combinación de materia orgánica y solarización para observar su efecto sobre las poblaciones de microorganismos.
2. Reducir el tiempo de solarización a un promedio de 30-60 días dependiendo de la época.
3. Estudiar la solarización en otros lugares de la isla con otros cultivos agrícolas y en diferentes series de suelo.
4. Realizar pruebas de antibiosis con los hongos y bacterias quitinolíticos aislados para observar en detalle su efecto de control biológico.
5. Identificar hasta nivel de especie los microorganismos de mayor interés y hacer pruebas moleculares para su descripción.
6. Continuar el trabajo utilizando otros cultivos para comparar y estudiar la microflora del suelo. Esta es una ciencia compleja debido a que no se puede aislar todo los microorganismos presentes en la rizósfera y debemos considerar que algunos microorganismos pueden estar presente en alguna época en particular del año.

Literatura Citada

- Abbasi, P.A., S.F. Dalhmani, H.A. Höitink y S.A. Miller. 2002. Effects of compost amendments on disease severity and yield of tomato in conventional and organic productions systems. *Plant Disease*. 86: 156-161.
- Acosta, N., O. Román, N.E. Vicente y L.A. Sánchez. 1991. Sistema de rotación de cosechas y los niveles poblacionales de nematodos. *Journal de la Universidad de Puerto Rico*. 7:399-405.
- Akhtar, M. 2000. Effect of organic and urea amendments in soil on nematode communities and plant growth. *Soil Biology and Biochemistry*. 32:573-575.
- Alexander, M. 1980. *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, INC. Canada 467 pp.
- Barbercheck, M.E. y S.L. Broemsen. 1986. Effects of soil solarization on plants-parasitic nematodes and *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Plant Disease*. 70: 945-950.
- Barnett, H. L. & B. B. Hunter. 1998. *Illustrated genera of imperfect Fungi*. The American Phytopathological Society, Minnesota, 218 pp.
- Barratto C., M. Vanusa da Silva, L. Santi, L. Assaglia, Irene Silvera, M. Henning, y A. Schrank. 2003. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*. 49: 723 - 726.
- Barron, G. L. 1983. *The Genera of Hyphomycetes from Soil*. John Wiley & Sons, U.S.A. 364 pp.
- Blaine M., F. Jr. 1992. Structure and Physiological Ecology of Soil Microbial Communities. En: F.B. Metting (Ed) *Soil Microbiology Ecology*, 3-26 pp. Marcel Dekker, New York.
- Block, W.J., J.G. Lamers, A.J. Termorshuizen y G.J. Bollen. 2000. Control of soilborne pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarpering. *Phytopathology*. 90: 253-259.
- Boulter, J. I., G.J. Boland y J.T. Trevors. 2002. Evaluation of compost for suppression of dollar spot (*Sclerotinia homoeocarpa*) of Turgrass. *Plant Disease*. 86: 405-410.

Bolton, H., J. K. Frederickson y L.F. Elliott. 1992. Microbial ecology of the rhizosphere. En: F.B. Metting (Ed) Soil Microbiology Ecology, pp. 27-63. Marcel Dekker, New York.

Burger M. y L.E. Jackson. 2003. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. Soil Biology and Biochemistry. 35: 29-36.

Buyer, S. J., D. P. Roberts y E. R. Russek-Cohen. 2002. Soil and plant effect on microbial community structure. Canadian Journal of Microbiology. 48: 955-964.

Campbell, R. 1985. Plant Microbiology. Edward Arnold, New York, 191 pp.

Campbell, R. y M. Greaves. 1990. Anatomy and community structure of the rhizosphere. En: Lynch, J.M. (ed.). The Rhizosphere, pp 11-34. Wiley-Interscience Publication.

Chavarría Carvajal, J. A. 1997. Use of organic amendments and naturally occurring aromatic compounds for control of plant-parasitic nematodes: Effects on microbial activity and soil enzymes. Ph.D. Thesis. Auburn University, AL. U.S.A.

Chavarría Carvajal, J. A., R. Rodríguez Kabana, J. W. Klopper y G. Morgan Jones. 2001. Changes in populations of microorganism associated with organic amendments and benzaldehyde to control plant-parasitic nematodes. Nematropica. 31: 165-180.

Chellemi, D.O. 2002. Nonchemical management of soilborne pests in fresh market vegetable production systems. Phytopathology. 92: 1367-1372.

Chellemi, D.O., S.M. Olson y D.J. Mitchell. 1994. Effects of solarization and fumigation on survival of soilborne pathogens of tomato in Northern Florida. Plant Disease. 78: 1167-1172.

Chen, Y. y J. Katan. 1980. Effects of solar heating of soils by transparent polyethylene on their chemical properties. Soil Science. 130:271-276.

Coelho, L., D.O. Chellemi y D.J. Mitchell. 1999. Efficacy of solarization and cabbage amendment for the control of *Phytophthora* spp. in North Florida. Plant Disease. 83: 293-299.

Conjunto Tecnológico para la Producción de Calabaza. 1998. Estación Experimental Agrícola. Río Piedras, Puerto Rico. Pub. 155. 33 pp.

Departamento de Agricultura de Puerto Rico (DAPR). 2004. Ingreso bruto de calabazas 2002/03. Departamento de Agricultura, Gobierno de Puerto Rico. 37 p.

Dissanayake, N. y J.W. Hoy. 1999. Organic material soil amendment on root rot and sugarcane growth and characterization of the materials. *Plant Disease*. 83:1039-1046.

Domesh, K. H. and W. Gams. 1970. *Fungi in Agricultural Soils*. Halsted Press Division, Nex York, 290 pp.

Domesh, K. H., W. Gams y A. Trate-Heidi. 1980. *Compedium of Soil Fungi*. Academic Press, New york, 859 pp.

Drury, C.F., J.A. Stone y W.I. Findlay. Microbial biomass and soil structure with corn, grasses, and legumes. 1991. *Soil Science Society America Journal*. 55: 805-811.

Edwards, Clive; R Lai, P. Madden, R. Miller y G. House. 1990. *Sustainable Agriculture Systems*. Soil and Water Conservation Society, Ioxa, 695 pp.

Egamberdiyeva, D. y G. Höflich. 2003. Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. *Soil biology and Biochemistry*. 35:973-978.

Eshel, D., A. Gamliel, A. Grinstein, P. Di Primo y J. Katan. 2000. Combined soil treatments and sequence of application in improving the control of soilborne pathogens. *Phytopathology*. 90: 751-757.

Ferreira, L.H.P.L., J.C. Molina, C. Brasil y G. Andrade. 2003. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticidal proteins effects on soil microorganisms. *Plant and Soil*. 256: 161-168.

Fontaine, S., A. Mariotti y L. Abbadie. 2003. The effect of organic matter: A question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry*. 35: 837-843.

Gamliel, A. y J. Katan. 1993. Supression of major and minor pathogens by fluorescent *Pseudomnas* in solarized and nonsolarized soils. *Phytophatology*. 83: 68-75.

Gamliel, A. y J.J. Stapleton. 1993. Effect of chicken compost or ammonium phosphate and solarization for pathogen control, rhizosphere microorganisms, lettuce growth. *Plant Disease*. 77: 886-891.

Gamliel, A. y J.J. Stapleton. 1997. Improvement of soil solarization with volatile compounds generated from organic amendments. *Phytoparasitica*. 25: (suppl.) 31s-38s.

Giambattista, R. F. Federici, M. Petruccioli y M. Fenice. 2001. The chitinolytic activity of *Penicillium janthinellum* Pg; purification, partial characterization and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 498-505.

Godoy, G., R. Rodríguez Kabana y G. Morgan Jones. 1982. Parasitisms of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* by fungi isolated from cysts of *H. glycines*. *Nematropica*. 12:111- 116.

Gomes N.C., H. Schonfeld, R. Costa, L. Mendoca-Hagler y K. Smalla. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*. 232: 167-180.

Gray, T.R.G. y S.T. Williams. 1971. *Soil Microorganisms*. Oliver & Boyd, Gran Bretaña 240 Pp.

Grayston, S., S. Wang, C. Campbell y A. Edwards. 1998. Selective influence of plants species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology Biochemistry*. 30: 369-378.

Han, D. Y., D.L. Coplin, W.D. Bauer y H.A. Höitink. 2000. A rapid bioassay for screening rhizosphere microorganisms for their ability to induce systematic resistance. *Phytopathology*. 90: 327-332.

Höitink, H.A.J. y M.J. Boehm. 1999. Biocontrol within context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37:427-446.

Hedlund, K. 2002. Soil microbial community structure in relation to vegetation management on former agricultural land. *Soil Biology and Biochemistry*. 34: 1299- 1307.

Jaffee, B., H. Ferris y K.M. Scow. 1998. Nematode trapping fungi in organic and conventional cropping systems. *Phytopathology*. 8:344-350.

Kalbe C., Marten P. y G. Berg. 1996. Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiological Research*. 151:433-439.

Kaplan, M. y J.P. Noe. 1993. Effects of chicken-excrement amendements on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*. 25: 71-77.

Katan, J., A. Greenberger, H. Alon y A. Grinstein. 1976. Solar heating mulching for the control of disease caused by soil-borne pathogens. *Phytopathology*. 66: 683-688.

Katan, J. 1981. Solar heating (Solarization) of the soil for control of soilborne pests. *Annual Review of Phytopathology*. 19: 211-236.

Kennedy, A.C. y K.L. Smith. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*. 170:75-86.

Kerry, B.R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. 38:423-441.

Khalid, A., M. Arshad y Z.A. Zahir. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 473-480.

Khan, M.R. y M. Akham. 2000. Effects of certain antagonistic fungi and rhizobacteria on wilt disease complex of tomato caused by *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Nematologia Mediterranea*. 28:139-144.

Kiminski, J. C.E. Gallant, R. Henry, J.A. Macleo, J.B. Sanderson y A.V. Strurz. 2003. Effect of compost and manure soil amendments on nematodes and on yields of potato and barley: A 7-year study. *Journal of Nematology*. 35: 289-293.

Kloepper, J.W., R. Rodríguez Kabana, J.A. McInroy y D.J. Collins. 1991. Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in rhizospheres of plants with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. *Plant and Soil*. 136: 95-102.

Kloepper, J.W., R. Rodríguez-Kabana, J.A. McInroy y R. W. Young. 1992. Rhizosphere bacteria antagonist to soybean cyst (*Heterodea glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification and characterization by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. *Plant and Soil*. 139: 75-84.

Kluepfel, D. A. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology*. 31:441-472.

Larkin, R. P. 2003. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial populations dynamics, substrate utilization, and fatty acids profile. *Soil Biology and Biochemistry*. 35:1451-1466.

Li, Q., H. Lee Allen y A. Wollum. 2004. Microbial biomass and bacteria functional

diversity in forest soil: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control. *Soil Biology and Biochemistry*. 36:571-579.

Liu, M., Q.X. Cai, H.Z. Liu, B.H. Zhang, J.P. Yan y Z.M. Yuan. 2002. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergist effects on larvicidal activity. *Journal of Applied Microbiology*. 93:374-379.

Lopez Escudero, F. J. y M.A. Blanco-Lopez. 2001. Effects of a single or double solarization to control *Verticillium* Wilt in establish olive orchads in Spain. *Plant Disease*. 85: 489-496.

Lupwayi, N.Z., W.A. Rice y G. W. Clayton. 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influence by tillage and crop rotation. *Soil Biology and Biochemistry*. 30:1733-1741.

Lynch, J.M. 1990. Introduction: Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. En: Lynch, J.M. (ed.) *The Rhizosphere*, pp 1-10. Wiley-Interscience Publication.

Mankau, R. 1980. Biocontrol: Fungi as nematode control agents. *Journal of Nematology* 12: 244-252.

Marcial Gomes, N.C., O. Fagbola, R. Costa, N. Gouvea Rumjanek, A. Bucher, L. Mendona-Hagler y K. Smalla. 2003. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:3758-3766.

Martin, F.N. 2003. Development of alternative strategies for manegement of soilborne pathogens currently controls with methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology*. 41:325-350.

McGovern, R. J., R. McSorley y M.L. Bell. 2002. Reduction of landscape pathogens in Florida by solarization. *Plant Disease*. 86: 1388-1395.

Mcsorley, R. y D.L. Porazinska. 2001. Elements of Sustainable Agriculture. *Nematropica*. 31: 1-9

Miller, H. J., G. Henken y J.A. Van Veen. 1989. Variation and composition of bacterial in rhizosphere of maize, wheat, and grass cultivars. *Canadian Journal of Microbiology*. 35: 656-660.

Nolling, J. W. y J.O. Becker. 1994. The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. *Supplement to Journal of Nematology*. 26 (4s): 573-586.

Ordentlich, A., Y. Eland y I. Chet. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 78:84-88

Ott, L. R. y M. Longnecker. 2001. *Statistical Methods and Data Analysis*. Pacific Grove, California (5^{ta} ed.). 1152 pp.

Parr, J. R.I. Papendick, I.G. Youngberg y R.E. Meyer. 1990. Sustainable Agriculture Systems (Clive A. Edwards, Rattan Lal, Patrick Madden, Robert H. Miller y Gar House) Soil and water conservation society, Iowa, pp.50-77.

Pinkerton, J. N., K.L. Ivors, P.W. Reeser, P.R. Bristow, y G.E. Windom. 2002. The use of solarization for the management of soilborne plants pathogens in strawberry and red raspberry production. *Plant Disease*. 86: 645-651.

Pitt, J. 1986. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth scientific and industrial research organization division of food research, North Ryde, N.S. W. 184 pp.

Podile, A.R y A.P. Prakash. 1996. Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF 1. *Canadian Journal of Microbiology*. 42: 533-538.

Prosser, James I. 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organism. *Plant and Soil*. 244: 9-17.

Quián, J. H., J. W. Doran y D. T. Walters. 1997. Maize contributors to root zone available carbon and microbial transformation of nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry*. 29: 1451-1462.

Raper, Kenneth, B. 1949. *The Genus Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company, USA 686 pp.

Rodríguez-Kabana, R., J.W. Kloepper, D.G. Robertson y L.W. Wells. 1992. Velvetbean for the management of root-knot and southern blight in peanut. *Nematropica*. 22:75-80.

Rodríguez Kabana, R. y G. Morgan Jones. 1987. Biological control of Nematodes: Soil amendments and microbial antagonist. *Plant and Soil*. 100: 237-247.

Rodríguez Kabana, R., J. Pinochet, D.G. Robertson y L.Wells. 1992. Crop rotation studies with velvetbean (*Mucuna deeringiana*) for the management of *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology*. 24 (4S):662-668.

Sayre, R.M. 1980. Biocontrol: *Bacillus penetrans* and related parasites of nematodes. *Journal of Nematology*. 12: 261-270.

Schippers, B., A.W. Bakker y P.A. Bakker. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*. 25: 339-358.

Sharman, A., B.N. Johri, A.K. Sharma y B.R. Glick. 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP₃ influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry*. 35: 887-894.

Sharon, E., M. Bar Eyal, A. Herrera Estrella, O. Kleifeld y Y. Spiegel. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 91: 687-693.

Siddiqui, I. A. y S. Shahid Shaukat. 2003. Effects of *Pseudomonas aueriososa* on the diversity of culturable microfungi and nematode associated with tomato: impact on root-knot disease and plant growth. *Soil Biology and Biochemistry*. 35: 1359-1368.

Siddiqui, I. A. y S. Shahid Shaukat, G. Habib Khan y N. Iman Ali. 2003. Suppression of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas aeruginosa* IE-6S⁺ in tomato: the influence of NaCl, oxygen and iron levels. *Soil Biology and Biochemistry*. 35: 1625-1634.

Skipper, H.D., y J.G. Mueller, V.L. Ward, y S.C. Wagner. 1986. Microbial degradation of herbicides. En: N.D. Camper (ed.). *Research Methods in Weeds Science*, pp. 457-475. Southern Weed Science Society, Campaign, IL, USA.

Spdding, T.A., C. Hamel, G.R. Mehuys, C.A. Madramootoo. 2004. Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems. *Soil Biology and Biochemistry*. 36:499-512.

Stevens, C., V.A. Khan, R. Rodríguez-Kabana, L.D. Ploper, P.A. Backman, D.J. Collins, J.E. Brown, M.A. Wilson y E.C. Igwegbe. 2003. Integration of soil solarization with chemicals, biological, control for the management of soilborne disease of vegetables. *Plant and Soil* 253: 493-506.

Stapleton, J.J. y J.E. De Vay. 1982. Effect of solarization on populations of selected soilborne microorganisms and growth of deciduous fruit tree seedling. *Phytopathology*. 72: 323-326.

Stapleton, J.J. y J.E. De Vay. 1984. Thermal components of soil solarization as related to changes in soil and root microflora and increased plant growth response. *Phytopathology*. 74: 255-259.

Stapleton, J.J., B. Lear y J.E. De Vay. 1987. Effect of combining soil solarization with certain nematicides on target and non target organisms and plant growth. *Annals of Applied Nematology*. 1:107-112.

Vargas Ayala, R. 1995. Nematode population dynamics and microbial ecology in a rotation program with *Mucuna deeringiana*, and others crops; a biological control approach. Ph.D. Thesis. Auburn University, AL. U.S.A.

Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.

Wander, M.M., D.S. Hedrick, D. Kaufman, S.J. Traina, B.R. Stinner, S.R. Kheirmeyer y D.C. White. 1995. The functional significance of microbial biomass in organic and convectional managed soil. *Plant and Soil*. 170:87-97.

Weller, M.W. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 26: 379-407.

Weller, M.W., J. M. Rajinmakers, B.B. McSpadden y L.S. Thomashow. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 40:309-348.

Apéndice 1. Diversidad de hongos durante el muestro preliminar¹

Clasificación	Número de aislados
<i>Alternaria</i> spp.	4 (13.3) ²
<i>Aspergillus flavus</i>	2 (6.7)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3 (10.0)
<i>Aspergillus niger</i>	2 (6.7)
<i>Aspergillus</i> spp.	1 (3.3)
<i>Aspergillus</i> spp. (total)	8 (20.0)
<i>Curvularia</i> spp.	2 (6.7)
<i>Fusarium</i> spp.	5 (16.7)
<i>Penicillium oxalicum</i>	2 (6.7)
<i>Penicillium</i> spp.	3 (10.0)
<i>Penicillium</i> spp. (Total)	5 (16.7)
<i>Rhizosphaera</i> spp.	1 (3.3)
<i>Trichoderma</i> spp.	2 (6.7)
<i>Stemphylium</i> spp	1 (3.3)
<i>Torula</i> spp.	1 (3.3)
Desconocidos ³	1 (3.3)
Total	30 (100.0)

¹Valores representan el número total de 30 aislados.

²Paréntesis = valores en paréntesis representan el porcentaje.

³Hongos sin la presencia de estructuras reproductivas para su identificación.

Aspergillus spp. total incluye: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Aspergillus* spp.

Penicillium spp total incluye; *P. oxalicum*, *Penicillium* spp.

Apéndice 2. Diversidad de bacterias durante el muestro preliminar¹

Gram positivo	Gram negativo
15 (50.0) ²	15 (50.0)
Total	30 (100.0)

¹valores representan el número de aislados de 30 analizados

²Paréntesis - valores en paréntesis representan porcentajes.

Apéndice 3. Análisis estadístico de la población de hongos y bacterias durante un programa de agricultura sustentable

I. Hongos 120 días 1^{er} ciclo

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC	60	0.98	0.98	2.37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	19.09	5	3.82	575.58	<0.0001
Tratamiento	19.09	5	3.82	575.58	<0.0001
Error	0.36	54	0.01		
Total	19.45	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.07302

Error: 0.0066 gl: 54

Tratamiento	Medias	n			
Solar.	2.19	10	A		
C. Absoluto	3.55	10		B	
Maíz	3.65	10			C
C.Químico	3.74	10			D
M. Orgánica	3.74	10			D
<i>Mucuna</i>	3.77	10			D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

¹solar = solarización

II. Bacterias 120 días 1^{er} ciclo

Análisis de la varianza

Bacterias	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
<i>Bacillus</i>	UFC	60	0.73	0.71	2.49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	1.94	5	0.39	29.92	<0.0001
Tratamiento	1.94	5	0.39	29.92	<0.0001
Error	0.70	54	0.01		
Total	2.64	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.10200

Error: 0.0129 gl: 54

Tratamiento	Medias	n			
C. Absoluto	4.30	10	A		
C. Químico	4.34	10	A		
M. Orgánica	4.61	10		B	
Maíz	4.64	10		B	
Mucuna	4.70	10		B	C
Solar.	4.78	10			C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Bacterias	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
<i>Pseudomonas</i>	UFC	60	0.95	0.95	1.62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	4.85	5	0.97	218.98	<0.0001
Tratamiento	4.85	5	0.97	218.98	<0.0001
Error	0.24	54	0.00		
Total	5.09	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.05966

Error: 0.0044 gl: 54

Tratamiento	Medias	n			
<i>Mucuna</i>	3.66	10	A		
Maíz	4.00	10		B	
Solar.	4.04	10		B	
C. Absoluto	4.04	10		B	
C. Químico	4.45	10			C
M. Orgánica	4.49	10			C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Bacterias	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Total	UFC	60	0.57	0.53	2.58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	1.10	5	0.22	14.35	<0.0001
Tratamiento	1.10	5	0.22	14.35	<0.0001
Error	0.83	54	0.02		
Total	1.93	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.11108

Error: 0.0153 gl: 54

Tratamiento	Medias	n			
<i>Mucuna</i>	4.57	10	A		
Maíz	4.72	10		B	
C. Absoluto	4.83	10		B	C
M. Organica	4.84	10			C
Solar.	4.89	10			C D
C. Químico	5.00	10			D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

¹solar = solarización

III. Hongos 2^{do} ciclo 60 días

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC	60	0.69	0.67	2.17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.90	5	0.18	24.47	<0.0001
Tratamiento	0.90	5	0.18	24.47	<0.0001
Error	0.40	54	0.01		
Total	1.30	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.07701

Error: 0.0074 gl: 54

Tratamiento	Medias	n			
<i>Mucuna</i>	3.83	10	A		
C. Absoluto	3.84	10	A	B	
C. Químico	3.91	10		B	C
Solar.	3.94	10			C
M. Orgánica	4.03	10			D
Maíz	4.18	10			E

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)¹solar = solarización**IV. Bacterias 2^{do} ciclo 60 días****Análisis de la varianza**

Bacteria	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
<i>Bacillus</i>	UFC	60	0.20	0.12	4.44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.55	5	0.11	2.64	0.0333
Tratamiento	0.55	5	0.11	2.64	0.0333
Error	2.27	54	0.04		
Total	2.83	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.18397

Error: 0.0421 gl: 54

Tratamiento	Medias	n			
C. Absoluto	4.49	10	A		
<i>Mucuna</i>	4.57	10	A	B	
C. Químico	4.57	10	A	B	
Maíz	4.58	10	A	B	C
Solar.	4.74	10		B	C
M. Orgánica	4.76	10			C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Bacteria	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
<i>Pseudomonas</i>	UFC	60	0.65	0.62	2.98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	1.31	5	0.26	20.00	<0.0001
Tratamiento	1.31	5	0.26	20.00	<0.0001
Error	0.71	54	0.01		
Total	2.01	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.10251

Error: 0.0131 gl: 54

Tratamiento	Medias	n			
Maíz	3.64	10	A		
Solar.	3.67	10	A	B	
<i>Mucuna</i>	3.77	10		B	
C. Químico	3.91	10			C
C. Absoluto	3.99	10			C
M. Orgánica	4.01	10			C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Bacteria	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Total	UFC	60	0.16	0.08	2.93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.21	5	0.04	2.00	0.0934
Tratamiento	0.21	5	0.04	2.00	0.0934
Error	1.11	54	0.02		
Total	1.31	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.12852

Error: 0.0205 gl: 54

Tratamiento	Medias	n		
C. Químico	4.79	10	A	
M. Orgánica	4.87	10	A	B
C. Absoluto	4.88	10	A	B
Solar.	4.90	10	A	B
Maíz	4.95	10		B
<i>Mucuna</i>	4.97	10		B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)¹solar = solarización**V. Hongos 2^{do} ciclo 120 días****Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC	60	0.69	0.66	3.19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	1.96	5	0.39	23.54	<0.0001
Tratamiento	1.96	5	0.39	23.54	<0.0001
Error	0.90	54	0.02		
Total	2.87	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.11583

Error: 0.0167 gl: 54

Tratamiento	Medias	n			
<i>Mucuna</i>	3.88	10	A		
C. Químico	3.94	10	A	B	
C. Absoluto	4.00	10		B	C
M. Orgánica	4.02	10		B	C
Maíz	4.05	10			C
Solar.	4.44	10			D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

¹solar = solarización

VI. Bacterias 2^{do} ciclo 120 días

Análisis de la varianza

Bacteria	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
<i>Bacillus</i>	UFC	60	0.24	0.17	4.15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.64	5	0.13	3.35	0.0104
Tratamiento	0.64	5	0.13	3.35	0.0104
Error	2.05	54	0.04		
Total	2.68	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.17450

Error: 0.0379 gl: 54

Tratamiento	Medias	n			
M. Organica	4.53	10	A		
Solar.	4.58	10	A	B	
<i>Mucuna</i>	4.66	10	A	B	C
C. Químico	4.73	10		B	C
Maíz	4.80	10			C
C. Absoluto	4.80	10			C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Bacteria	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
<i>Pseudomonas</i>	UFC	60	0.80	0.79	2.25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	2.01	5	0.40	44.25	<0.0001
Tratamiento	2.01	5	0.40	44.25	<0.0001
Error	0.49	54	0.01		
Total	2.51	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.08555

Error: 0.0091 gl: 54

Tratamiento	Medias	n			
Solar.	3.86	10	A		
C. Químico	4.24	10		B	
<i>Mucuna</i>	4.28	10		B	C
C. Absoluto	4.32	10		B	C
M. Orgánica	4.33	10			C
Maíz	4.45	10			D

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0.05$)

Bacteria	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Total	UFC	60	0.68	0.65	2.70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	2.06	5	0.41	22.86	<0.0001
Tratamiento	2.06	5	0.41	22.86	<0.0001
Error	0.97	54	0.02		
Total	3.03	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.12040

Error: 0.0180 gl: 54

Tratamiento	Medias	n			
Solar.	4.69	10	A		
<i>Mucuna</i>	4.74	10	A		
C. Absoluto	5.02	10		B	
M. Orgánica	5.10	10		B	C
Maíz	5.11	10		B	C
C. Químico	5.16	10			C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0.05$)¹solar = solarización