

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
POSTGRADO EN AGRONOMÍA



**EVALUACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp. y
Bacillus spp. PARA EL CONTROL DE *Phytophthora capsici*
Leonian CAUSANTE DE LA MARCHITEZ DEL PIMENTÓN**

Ing. Agr. Georgette I. Santander P.

Maracay, Septiembre 2013

DEDICATORIA

A Dios, por mostrarme día a día, que con humildad, paciencia y sabiduría todo es posible.

A mis padres (Jorge y Adys), por su amor, trabajo y sacrificios en todos estos años, además, porque creyeron en mí, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta. Es un privilegio ser su hija, son los mejores padres.

A mi hermana (Adenis), que siempre ha estado junto a mí, brindándome su apoyo (moral - profesional) y comprensión incondicional.

A mi tío Nordy, por considerarme su hija y estar presente en todo momento, brindándome todo su amor y cariño.

A Tommy, mascota que alegra mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Central de Venezuela (UCV), por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), por el permiso académico otorgado para la ejecución y finalización de la investigación.

Al CDCH - UCV, por el financiamiento recibido para esta investigación.

A mi tutora Dra. Nelly Sanabria, por su orientación y preocupación durante la investigación.

Al Profesor Eutimio González, por su valiosa amistad y fomentar el deseo de superación profesional.

A los Profesores: Msc. Amado Rondón, Dra. Yonis Hernández, Msc. Hélen Pérez Pivat, Dra. Marleny Chavarri, Ing. Nohants Rumbos, por la revisión del manuscrito y apoyo técnico en el desarrollo de esta investigación.

Al personal de los laboratorios: Fitopatología, Bacteriología, Microtecnia, Fisiología Vegetal de la Facultad de Agronomía (UCV), por el apoyo en la realización de las actividades planteadas.

Al personal administrativo del Postgrado, por su eficiencia.

A toda mi familia y amigos, por el apoyo brindado.

A todos mil gracias!

RESUMEN

La marchitez del pimentón, provocada por *Phytophthora capsici* Leonian, es una enfermedad que puede presentarse en cualquier edad del cultivo y causa pérdidas en el rendimiento de hasta un 100 %. Con el objetivo de evaluar el uso de *Trichoderma harzianum* Rifai y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn para el control de este patógeno, en la Clínica de Enfermedades de Plantas en la Facultad Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, se realizaron dos ensayos con diseño completamente aleatorizados, uno *in vitro* en placas que contenían agar zanahoria (AZ), con el fin de evaluar, mediante el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) y el porcentaje de inhibición de esporulación (PIE), el comportamiento de 21 aislamientos de *Trichoderma* spp. y 20 de *Bacillus* spp. de diferentes localidades de Aragua, Guárico y Carabobo frente al aislamiento patogénico. Asimismo, bajo condiciones de umbráculo, se evaluó el efecto de los antagonistas (*Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp.) para inhibir la marchitez causada por *P. capsici* en plantas de pimentón, estableciéndose doce tratamientos con diez repeticiones cada uno y empleando un diseño completamente aleatorizado. Los 12 tratamientos fueron aplicaciones individuales y combinadas de los antagonistas en el semillero, trasplante y semanal en suelo con el patógeno y sin el patógeno. Se evaluó síntomas de marchitez y los parámetros de crecimiento de planta (altura, peso fresco, peso seco de la parte aérea como también el número de flores; peso fresco, peso seco y volumen de las raíces). Se seleccionaron los aislamientos Tr12 (*T. harzianum*) de Múcura II y B1 (*B. subtilis*) de Ruiz Pineda por presentar los mayores valores de PIC (76,80 y 67,22%) y PIE (88,17 y 87,67%), respectivamente. El tratamiento con la combinación de *T. harzianum* (10^6 con/mL) + *B. subtilis* (10^8 ufc/mL) en los tres momentos de aplicación, lograron una reducción de la incidencia de marchitez hasta un 70% e incrementos significativos en las variables vegetativas altura de la planta (50,50 cm), peso fresco (43,18 g) y seco (5,78 g) de la parte aérea, peso fresco (10,53 g), peso seco (2,33 g) y volumen de raíces (15,80 mL). Estos resultados muestran la factibilidad del uso combinado de estos agentes de control biológico como una de las estrategias a aplicar dentro de las prácticas de manejo del cultivo.

Palabras claves: tristeza del pimentón, manejo integrado, control biológico, antagonistas.

ABSTRACT

The pepper wilt caused by *Phytophthora capsici* Leonian, is a disease that can occur at any age and causes crop yield losses of up to 100 %. To evaluate the use of *Trichoderma harzianum* Rifai and *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn to control this pathogen, in the Plant Disease Clinic at the Agronomy Faculty of the Universidad Central de Venezuela, two trials were conducted with complete design randomized, one *in vitro* with the use of agar plates containing carrot (AZ), in order to evaluate, using the percent inhibition of growth (PIC) and the percent inhibition of sporulation (PIE), the behavior against the pathogen of 21 isolates of *Trichoderma* spp. and 20 of *Bacillus* spp. from different localities of Aragua, Guárico and Carabobo. Also, under greenhouse conditions, we assessed the effect of antagonists (*Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp.) to inhibit wilt caused by *P. capsici* in pepper plants, establishing twelve treatments with ten replicates each and using a completely randomized design. The 12 treatments were individual and combined applications of the antagonists in the nursery, transplant and weekly soil with the pathogen and without the pathogen. Wilt symptoms were evaluated and plant growth parameters (height, fresh weight, dry weight of aerial parts as well as the number of flowers, fresh weight, dry weight and root volume). The isolates Tr12 (*T. harzianum*) of Múcura II and B1 (*B. subtilis*) of Ruiz Pineda were selected to present the highest PIC values (76.80 and 67.22 %) and PIE (88.17 and 87.67%), respectively. Treatment with the combination of *T. harzianum* (10^6 conidia/mL) + *B. subtilis* (10^8 cfu/mL) in the three application times, achieved a reduction in the incidence of wilt to 70% and significant increases in vegetative variables plant height (50.50 cm), fresh weight (43.18 g) and dry (5.78 g) of the aerial parts, fresh weight (10.53 g), dry weight (2.33 g) and root volume (15.80 mL). These results show the feasibility of the combined use of these biological control agents as one of the strategies to apply within crop management practices.

Keywords: pepper wilt, integrated management, biological control, antagonists.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
Generalidades del cultivo	4
Limitantes del cultivo	4
Marchitez del pimentón	5
Descripción de <i>Phytophthora capsici</i> Leonian	6
Control de la marchitez del pimentón	8
El género <i>Trichoderma</i> spp.	12
El género <i>Bacillus</i> spp.	13
Hongos y bacterias antagonistas como biocontroladores	14
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Localización de la investigación	17
Obtención de los aislamientos	17
Aislamiento de <i>Phytophthora capsici</i> L.	17
Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.	18
Aislamiento de <i>Bacillus</i> spp.	18
Prueba de patogenicidad de <i>Phytophthora capsici</i> L. en plantas de pimentón	19
Descripción del aislamiento <i>Phytophthora capsici</i> L.	20
Descripción de los aislamientos antagonistas	21
Pruebas de enfrentamiento entre <i>Phytophthora capsici</i> L. y <i>Trichoderma</i> spp.	23
Prueba de confrontación entre <i>Phytophthora capsici</i> L. y <i>Bacillus</i> spp.	24
Evaluación de la capacidad biocontroladora de una cepa de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp. para el control de <i>Phytophthora capsici</i> en condiciones de umbráculo	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Aislamiento del patógeno y los antagonistas	30
Prueba de patogenicidad de <i>Phytophthora</i> sp.	31
Descripción e identificación de <i>Phytophthora</i> sp.	33
Descripción e identificación de <i>Trichoderma</i> sp.	34
Descripción e identificación de <i>Bacillus</i> sp.	35
Pruebas de enfrentamiento entre <i>Phytophthora capsici</i> L. y <i>Trichoderma</i> spp.	38
Prueba de confrontación entre <i>Phytophthora capsici</i> L. y <i>Bacillus</i> spp.	45
Evaluación de la capacidad biocontroladora de una cepa de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp. para el control de <i>Phytophthora capsici</i> en condiciones de umbráculo	51
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS CONSULTADAS	62
ANEXO	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°

1	Tratamientos para evaluar la capacidad biocontroladora de un aislamiento de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp. para el control de <i>Phytophthora capsici</i>	29
2	Aislamientos obtenidos del género <i>Trichoderma</i>	30
3	Aislamientos obtenidos del género <i>Bacillus</i>	31
4	Características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de la bacteria	37
5	Comparación de medias de PIC en los enfrentamientos de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>P. capsici</i>	41
6	Comparación de medias de PIE en los enfrentamientos de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>P. capsici</i>	43
7	Efecto inhibitorio de aislamientos de <i>Bacillus</i> spp. en el crecimiento de <i>P. capsici</i> enfrentados por el método de cultivos duales	47
8	Comparación de medias de PIE en los enfrentamientos de los aislamientos de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>P. capsici</i>	49
9	Porcentaje de incidencia y reducción de incidencia de la marchitez en plantas de pimentón	53
10	Efecto de la aplicación de los antagonistas (<i>T. harzianum</i> y <i>B. subtilis</i>) para el control de <i>Phytophthora capsici</i> sobre la parte aérea en plantas de pimentón variedad Cacique Gigante	58
11	Efecto de la aplicación de los antagonistas (<i>T. harzianum</i> y <i>B. subtilis</i>) para el control de <i>Phytophthora capsici</i> sobre raíz de plantas de pimentón variedad Cacique Gigante	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°

1	A) Plantas de pimentón inoculadas con <i>Phytophthora capsici</i> . B) Comparación de una planta sana y otra enferma. C y D) Plantas mostrando síntomas de marchitez, pudrición de tallo y raíz característicos de la enfermedad	33
2	A) Colonia de <i>P. capsici</i> de cinco días de edad en AZ. B) Micelio continuo y esporangios	34
3	<i>Trichoderma harzianum</i> . A) Colonia del hongo con formación de anillos concéntricos. B) Conidióforo con ramificación intrincada y conidios globosos a subglobosos	35
4	A) Colonia de la bacteria <i>B. subtilis</i> . B) Células bacterianas observadas con tinción de endosporas	36
5	A) Prueba de Hugh y Leifson para determinar tipo de respiración de <i>B. subtilis</i> . B) Utilización de citrato (+). C) Voges Proskeaur (+). D) Producción de ácido a partir: Manitol (+), Xylosa (+). E) Tolerancia a sales al 3, 5 y 7%. F) Hidrólisis de almidón (+)	38
6	Porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) de <i>P. capsici</i> enfrentado con aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	42
7	Porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) de <i>P. capsici</i> enfrentado con aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	44
8	Cultivo dual entre <i>T. harzianum</i> (A) y <i>P. capsici</i> (B)	44
9	Porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) de <i>P. capsici</i> enfrentado con aislamientos de <i>Bacillus</i> spp.	48
10	Porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) de <i>P. capsici</i> enfrentado con aislamientos de <i>Bacillus</i> spp.	50
11	Cultivo dual entre <i>P. capsici</i> (A) y <i>B. subtilis</i> (b)	50
12	Plantas con síntomas de marchitez por <i>P. capsici</i> (a) y plantas sanas (b)	51
13	Porcentaje de reducción de la incidencia de marchitez al aplicar diferentes tratamientos con <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	54

INTRODUCCIÓN

El pimentón (*Capsicum annuum* L.), es conocido como una de las especies de hortalizas que en términos de producción responde adecuadamente a la utilización intensiva de insumos y mano de obra. En Venezuela es un cultivo de consumo elevado, lo que de hecho lo convierte en un importante suplidor de vitaminas y minerales (Montaño y Cedeño, 2002).

De acuerdo a los datos de la FAO para el año 2011, los principales países productores de pimentón en el mundo eran China (15.545.683 t), México (2.131.740 t) y Turquía (1.975.270 t). Para el mismo año Venezuela alcanzó una producción de 100.531 t, 6.495 ha cosechadas y 15,47 t/ha de rendimiento (FAOSTAT, 2013).

El principal problema fitosanitario diagnosticado sobre pimentón es la marchitez, enfermedad que puede presentarse en cualquier edad del cultivo y causar pérdidas de hasta un 100 % en la cosecha (Pérez *et al.*, 2002), siendo uno de los agentes causales *Phytophthora capsici* Leonian, el cual provoca la enfermedad conocida como marchitez o tristeza del pimentón (Nuez *et al.*, 1996).

El control de la marchitez se ha realizado mediante diversas alternativas culturales, químicas, y más reciente empleando agentes biológicos. El control biológico ha sido identificado como un componente integral del manejo de plagas (MIP) y los agentes de control biológicos se ha encontrado asociado a muchos microorganismos de las plantas cultivadas. El biocontrol mediante organismos antagónicos representa una valiosa herramienta no química para la protección de los cultivos contra hongos fitopatógenos (Ait-Lahsen *et al.*, 2001; McSpadden y Fravel, 2002).

Se conocen numerosos grupos de bacterias y hongos con capacidad antagónica frente a otros microorganismos. Estas diferentes formas de antagonismo se han manifestado como inhibidores del desarrollo de los patógenos, y de hecho ya se utilizan algunas, para combatir enfermedades siempre que se pueda demostrar su inocuidad para la planta, el hombre y los animales (Ezziyyani *et al.*, 2006).

Dentro de los géneros clasificados como antagonistas se encuentran los microorganismos: *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Trichoderma*, capaces de controlar enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* (Ezziyyani *et al.*, 2007).

Considerando estos antecedentes, la presente investigación tuvo como objetivo, evaluar diferentes aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. para el control de *Phytophthora capsici* Leonian, *in vitro* y en umbráculo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., para el control de *Phytophthora capsici* Leonian causante de la marchitez del pimentón (*Capsicum annuum* L.)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar pruebas de patogenicidad para verificar la virulencia del agente causal de la marchitez del pimentón (*Phytophthora capsici* L.).
- Determinar *in vitro* la capacidad antagónica de aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. provenientes de diferentes localidades para inhibir el desarrollo de *Phytophthora capsici* L.
- Evaluar en umbráculo la capacidad biocontroladora de aislados de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp., para el control de *Phytophthora capsici* L. causante de la marchitez del pimentón.

REVISIÓN DE LITERATURA

GENERALIDADES DEL CULTIVO

El pimentón o pimienta (*Capsicum annuum* L.) pertenece a la familia Solanaceae, es originario de América tropical (Ecuador, Perú y norte de Chile) (Giacconi y Escaff, 1998). Se han encontrado formas silvestres de pimentón a lo largo del macizo Andino, desde México hasta el norte de Chile y noreste de la Argentina. Su centro de diversificación estaría ubicado en México y Brasil (Vallejo y Estrada, 2004). Todas las formas de pimienta, chile y ají, utilizadas por el hombre pertenecen al género *Capsicum*. El nombre científico del género deriva del griego, según unos autores, de *Kapso* (picar), según otros de *Kapsakes* (cápsula) (Nuez *et al.*, 1996).

Esta planta pertenece al reino vegetal, división Tracheophyta, clase Angiosperma, subclase Dicotiledónea, orden Tubifloral, familia de las solanaceae del género *Capsicum*, especie *Capsicum annuum* L., aunque existe una gran variedad de especies actualmente cultivadas por el hombre, dentro de las cuales cabe destacar: *C. pubescens*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. annuum*, la cual, es la más utilizada en nuestro país (Maroto, 1986). El pimentón, es un cultivo hortícola, con ciclo de cultivo anual, de porte variable entre los 0,5 metros (en variedades de cultivo al aire libre) y más de 2 metros (gran parte de los híbridos cultivados en invernaderos); los requerimientos edafoclimáticos óptimos para su desarrollo son de 21 - 24 °C, 50 - 70 % HR, suelos franco – arenosos, pH entre 6,5 y 7 (Nuez *et al.*, 1996).

En Venezuela, la producción de pimentón está localizada en la región centro-occidental (Lara, Falcón y Yaracuy) (INIA, 2005).

LIMITANTES DEL CULTIVO

Dentro de las limitaciones que enfrenta este cultivo, está la susceptibilidad a los ataques de plagas y enfermedades, lo que genera una reducción considerable de

la producción. El problema fitosanitario más frecuente en el estado Lara es la marchitez (Pineda *et al.* 2003). Según Palazón y Palazón (1989), esta enfermedad puede presentarse en cualquier edad del cultivo y causar pérdidas en la cosecha de hasta 80 %. Los hongos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp., se asocian con la marchitez del pimentón en otros países (Johnston, 1989; Pérez *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2003).

Escalona *et al.* (2006), señalan que en plantaciones de pimentón la parte baja del municipio Jiménez del estado Lara, la presencia de diversas enfermedades en ese cultivo y dentro de ellas, la marchitez.

La marchitez causada por *P. capsici* es el factor limitante más importante para la producción de pimentón en el mundo, causando importantes pérdidas, por lo cual muchas áreas de cultivo son abandonadas o se desplazan hacia nuevos sitios sin la presencia de este patógeno (Nuez *et al.*, 1996; Peldoza, 2005; Fernández, 1991).

En referencia al ataque de *P. capsici* en Venezuela, Malaguti y Pontis (1950) señalaron que con lluvias de cierta intensidad se generan ataques frecuentes sobre la parte aérea, mientras que con pluviosidad reducida los ataques se limitan a la zona del cuello.

MARCHITEZ DEL PIMENTÓN

La enfermedad se presenta en zonas con mucha precipitación y alta humedad relativa, y se caracteriza por la formación en las hojas de lesiones irregulares de color verde oscuro y aspecto húmedo; posteriormente se tornan de color marrón, produciéndose el secado y la caída de las mismas. En el tallo se presentan manchas oscuras de tamaño variable, rodeándolo y causando pudrición del tejido.

El patógeno puede destruir las raíces, afectar el cuello de la planta y ocasionar la posterior muerte de la misma. El agente causal de la enfermedad es el hongo *Phytophthora capsici* L. (INIA, 2005; Latorre, 1992).

Peldoza (2005), Ezziyyani *et al.*, (2004) señalan la presencia de síntomas en cultivos de pimentón, como marchitez de plántulas, manchas acuosas de color castaño rojizo que cubren el contorno del tallo produciendo finalmente la muerte de plántulas.

DESCRIPCIÓN DE *Phytophthora capsici* Leonian

Phytophthora capsici, pertenece al reino Straminipila, phylum Oomycota, clase Oomycetes, familia Pythiaceae (Kirk *et al.*, 2001; Arauz, 1998).

P. capsici produce esporangióforos en simpodio simple. Esporangios de forma ovoide, elongada, elipsoidal, fusiforme y piriforme, 60 x 36 μ promedio, aunque puede variar de 32.8 – 65.8 μ de largo por 17.4 - 38.7 μ de ancho, generalmente papilados, pero en ocasiones con semipapila. Ocasionalmente puede haber con 2 o 3 papilas por esporangio con un grosor que varía de 1.4 a 9.2 μ . Micelio heterotálico, anteridio anfígeno, oogonio esférico o subesférico de 23 – 50 μ de diámetro, oosporas pleróricas, semitransparentes de 25 – 35 μ , con pared gruesa de 2 – 6 μ . Micelio nudoso que puede llegar a ser densamente toluoso, 5 – 8 μ de ancho (Leonian, 1922).

El ciclo de vida de *Phytophthora* sp., involucra tanto el estado asexual como el sexual, los cuales presentan dependiendo de las condiciones ambientales, predomina el estado asexual, el cual inicia cuando la estructura vegetativa o esporangio germina, y en condiciones óptimas de humedad (agua libre) y temperatura (15°–38° C) libera las zoosporas. Éstas son estructuras móviles, de vida corta y poseen dos flagelos, uno anterior y otro posterior; el anterior es el responsable de movilizar la zoospora a través del agua (hasta 1,5 cm), mientras

que el flagelo posterior actúa como una hélice que le da la dirección a la célula. Las zoosporas cumplen dos papeles fundamentales para el ciclo de vida del patógeno: 1) transmisión del patógeno de un hospedero a otro y 2) dar la orientación del patógeno hacia el sitio de infección (hospedero) (Judelson y Blanco, 2005; Walker y Van West, 2007). Aunque las zoosporas son móviles, no son capaces de desplazarse grandes distancias a no ser que sean diseminados por el agua (Cerpa, 2001; Erwin y Ribeiro, 1996; Wilcox *et al.*, 1993; Tuset, 1977; Boccas *et al.*, 1976; Waterhouse, 1963).

P. capsici puede sobrevivir en el suelo por medio de estructuras de resistencias sobre restos vegetales o descompuestos, con los riegos sucesivos, produce esporangios y zoosporas que, distribuidas por el agua van difundiendo la enfermedad (Nuéz *et al.*, 1996).

CONDICIONES QUE FAVORECEN LA MARCHITEZ DEL PIMENTÓN

Dentro de los factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad se encuentran el manejo inadecuado del agua de riego, la lluvia, por lo que la aparición de la patología se presentan después del transplante, las infecciones en el cuello de la planta se debe a que las zoosporas del patógeno son llevadas por el agua e inician la infección por las heridas o las lenticelas. De esta forma, condiciones de alta humedad relativa, alta humedad en el suelo y temperaturas frescas favorecen el establecimiento del patógeno, es decir, son adecuadas para la germinación de las oosporas y desarrollo de los esporangios que contiene las zoosporas (liberación); otro factor, es el suelo que persiste adherido a los instrumentos de labranza, maquinarias y materiales de propagación contaminados (Peldoza, 2005).

La diseminación más habitual de este patógeno es a través del agua de riego contaminada que puede trasladar las zoosporas. Éstas últimas se desplazan a corta distancia alrededor de las raíces con las que entran en contacto, formando un quiste, que germina y penetra el tejido (Agrios, 2005; Wilcox y Latorre, 1994).

La severidad de la muerte de plántulas es proporcional a la humedad del suelo y aumenta cerca del punto de saturación (Paulitz y Baker, 1987).

CONTROL DE LA MARCHITEZ DEL PIMENTÓN

Los manejos más frecuentes e importantes que se realizan para una buena sanidad, incluye labores culturales (efectuando canales de drenaje para evitar la retención de agua, transplantar las plántulas a la parte alta del surco, eliminar las malezas que sean hospederas del patógeno), control químico, biológico y utilización de cultivares resistentes (Peldoza, 2005; Guzmán, 1997). En cuanto al uso de productos químicos se destacan fungicidas como Fenilamidas (Metalaxilo, benalaxilo, furalaxilo) y fosfonatos (Fosetil aluminio, ácido fosforoso), los que se caracterizan por presentar una alta especificidad sobre Oomycetes, alta solubilidad y bajo coeficiente de absorción en arcillas y materia orgánica (Latorre, 1992; Wilcox y Latorre, 1994), sin embargo, el mal uso o exceso de estos productos causaría daños perjudiciales al medio ambiente y la salud, además, se ha demostrado que los productos del grupo fenilamidas inducen resistencia del patógeno en el sitio.

En la búsqueda de controladores biológicos de este patógeno se han encontrado ciertos Ascomycetes, bacterias y hongos antagónicos a *P. capsici*, los cuales se encuentran en forma natural en los suelos en donde se cultivan las plantas de pimentón. Dentro de los géneros de bacterias y hongos antagonistas se pueden mencionar *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Trichoderma*, los cuales han demostrado, bajo condiciones de laboratorio, ser muy eficientes en el control de especies del género *Phytophthora*. Este tipo de control sobre el patógeno, sería en base a antibiosis y competencia (Hwarg, 1995 citado por Niedmann, 1998; Elad y Baker, 1985; Leeman *et al.*, 1995).

Mecanismos de acción de un antagonista frente a un fitopatógeno

Para que un antagonista ejerza el control efectivo contra el fitopatógeno debe presentar los siguientes mecanismos de acción:

Antibiosis

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a éstos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico (Vero y Mondino, 1999).

Competencia

Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de éste por uno de los organismos reduzca la cantidad y espacio disponible para los demás (Ahmad y Baker, 1987; Hjeljord y Tronsmo, 1998).

La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina y pectinas, entre otros (Stefanova *et al.*, 1999; Eveleigh *et al.*, 1986). La competencia por sustrato o espacio depende de si el mismo está libre de patógenos (sustratos estéril) o si hay una microbiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso la velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato (Infante *et al.*, 2009).

Hiperparasitismo

El hiperparasitismo, es cuando un organismo parasita a otro que a su vez, es parásito de otros organismos, generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas y celulasas, que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los organismos parasitados (Díaz, 1994; Lorito *et al.*, 1990; Melgarejo y Sagasta, 1989; Ulloa, 1996). Este es un proceso complejo que para su estudio se ha separado en cuatro etapas:

- a. **Crecimiento quimiotrófico:** El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia un estímulo químico (Chet e Inbar, 1994). En la etapa de localización del hospedante, se ha demostrado que *Trichoderma* puede detectarlo a distancia y sus hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico (Infante *et al.*, 2009).
- b. **Reconocimiento:** Las investigaciones realizadas a lo largo de muchos años con un número considerable de cepas de *Trichoderma* y de especies de hongos fitopatógenos, han demostrado que éstas son efectivas sólo contra patógenos específicos. El conocimiento de esta especificidad condujo a la idea de que el reconocimiento molecular entre *Trichoderma* y el hospedante es el evento esencial que precede al proceso antagonista. El reconocimiento se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan células y están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular (Chet y Benhamou, 1998).
- c. **Adhesión y enrollamiento:** Cuando la respuesta de reconocimiento es positiva, las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios, se enrollan alrededor de éstas; todo esto está determinado por procesos enzimáticos (Pérez, 2004).
- d. **Actividad lítica:** En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que

degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista (Haram *et al.*, 1996).

Resistencia inducida

Cuando *Trichoderma* sp. entra en contacto con la planta activa su sistema de defensa, fundamentalmente por inducción de su sistema enzimático oxidativo, preparando a la planta frente a los posibles ataques de patógenos, ya que favorece el desarrollo radicular, promoción del desarrollo vegetativo, facilitando la mayor solubilización y absorción de nutrientes (Frioni, 1999).

Según Toledo (2004), los mecanismos que intervienen en la interacción entre una bacteria antagonista y el patógeno sobre la planta o herida son: antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes e interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática y predación). Estos mecanismos de acción son los que suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, produciendo sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas o inducción de mecanismos de resistencia (Jiménez *et al.*, 2001).

Se pueden mencionar algunos como los sideróforos, los cuales son sustancias quelatantes de hierro y capacitan a la bacteria a sobrevivir en medios deficientes del mismo. La producción de bacteriocinas, sustancias constituidas por proteínas, que producen algunas bacterias que inhiben otros aislamientos de la misma especie u especies estrechamente relacionadas, son detectadas como antibióticos a través de halos de inhibición (Mariano *et al.*, 2005).

El género *Trichoderma* spp.

La clasificación taxonómica del género *Trichoderma* es la siguiente: Reino Mycetae (Fungi), División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocraceae y Género *Trichoderma* e *Hypocrea*. Generalmente forma colonias floculentas o compactas, de crecimiento rápido, micelio inicialmente hialino, conidióforos ramificados, fiálides en forma ampuliforme a lageniformes, conidios subglobosos a elipsoidales y clamidosporas globosas a subglobosas, intercalares o terminales (Rifai, 1969; Bissett, 1991; Samuels, 2005).

Estos hongos se caracterizan por predominar en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos (Zhang *et al.*, 2005). Algunas especies son de vida libre en el suelo, oportunistas, simbioses de plantas, y otras son micoparásitas. Además, pueden colonizar distintos ambientes, debido a su alta capacidad reproductiva (Bissett, 1991; Harman *et al.*, 2004). Los requerimientos nutrimentales de estos hongos filamentosos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, la humedad y temperatura óptimas de crecimiento se encuentran en un rango de 25 a 30 °C (Papavizas, 1985). Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden y Scattolin 1988; Jackson *et al.*, 1991).

Este género, tiene la capacidad de presentar un alto poder patogénico y una elevada capacidad de producir esporas que lo caracterizan como un buen biocontrolador; además, son los más utilizados para el control de un grupo importante de patógenos del suelo, por lo que su aplicación es de forma preventiva en los semilleros y en diferentes etapas del cultivo, logrando disminuir la incidencia de enfermedades fúngicas en cultivos como tomate, tabaco, pimentón, entre otros (Fernández – Larrea, 2002).

El género *Bacillus* spp.

El género *Bacillus*, incluye especies antagonistas de numerosos fitopatógenos. Las características propias de este grupo las hace resistentes a diversas condiciones del medio ambiente, lo que sugiere que puedan ser comercializadas como ingredientes de biopesticidas, ya que son formadoras de endosporas, las cuales pueden permanecer en latencia por largos períodos y resistir condiciones desfavorables; varias especies de *Bacillus* producen metabolitos antimicrobianos, algunos de los cuales son termoestables (Venegas *et al.*, 2005).

***Bacillus*.** Pertenece al reino Prokaryotae, familia *Bacillaceae* y género *Bacillus*. Algunas especies de este género tales como *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformes* y *B. cereus*. actúan como antagónicos frente a muchos microorganismos fitopatógenos (Buchanan y Gibbons, 1974).

Características generales del género *Bacillus*. Son bacterias que tienen forma de bacilos grandes, gram positivo, que miden desde 0.3 a 2.3 μ de ancho y 1.2 a 7.0 μ de largo. Son aeróbicos o anaeróbicos facultativos, forman endosporas (una por célula). Son cilíndricos, generalmente flagelados, crecen en cadenas y forman colonias grandes e irregulares en los medios sólidos (agar nutritivo), se encuentran en los suelos y en los vegetales en putrefacción, interviniendo activamente en la descomposición de la materia orgánica.

Características de *B. subtilis*:

- Presenta células en forma de bastón recto de 0,5 – 2,5 x 1,2 – 1,0 μ , dispuestas en pares o cadenas, con los extremos redondeados, móviles con flagelos peritricos. Son tipo gram positivo, catalasa positiva, tiene la habilidad para formar endosporas de ovals a cilíndricas, permitiéndole tolerar condiciones ambientales extremas. Son organismos aeróbicos facultativos (Schaad *et al.*, 2001; Bergey, 2000; Buchanan y Gibbons, 1974).

- Producción de sideróforos, que son compuestos extracelulares de bajo peso molecular con una elevada afinidad por el ión hierro con lo que previene la germinación de las esporas de los patógenos.
- Compiten por sustrato en la rizósfera y filósfera con los patógenos de las plantas.
- Produce antibiótico del tipo Bacilysin e iturin que son altamente fungo tóxico.
- Promotor de crecimiento: la bacteria al establecerse en el sistema radical lo protege y estimula la absorción de nutrientes.
- Inducción a resistencia: al instalarse en las raíces y hojas induce a la planta a producir fitoalexinas, que le dan resistencia a las plantas al ataque de hongos, bacterias y nemátodos patógenos (Angeloni, 2004).
- Se ha demostrado que cepas de *B. subtilis* no solo producen antibióticos antibacteriales, sino también antibióticos antifúngicos (Fernández – Larrea, 2006).

HONGOS Y BACTERIAS ANTAGONISTAS COMO BIOCONTROLADORES

Ezziyyani *et al.* (2007), estudiaron la capacidad antagónica del hongo *Trichoderma harzianum* y de las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Streptomyces rochei* para controlar la enfermedad que *Phytophthora capsici* causa en las hojas de plantas de pimentón. Las mayores reducciones se observaron al tratar las hojas con el aislado *S. rochei*, obteniéndose 0,266 lesiones por hoja (73,4%), seguido de *B. cepacia* 0,444 (55,6%) por hoja y con *T. harzianum* 0,938 (6,2%) por hoja.

En ensayos de control biológico en pimentón con *Trichoderma harzianum* (*T.h.*) y *Phytophthora capsici* (*P.c.*), las pruebas de antagonismo *in vitro* en medio patata dextrosa - agar (PDA) enriquecido con Laminarina - glucosa (3:1, v/v), mostró que *T. h.* aumentó los niveles de enzimas hidrolíticas β -1,3- glucanasa (lisis enzimática), ejerció una mayor competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con el patógeno (micoparasitismo), lo cual juega un papel importante en la reducción y destrucción de la colonia del patógeno. El

filtrado del medio PDB donde se había cultivado *T.h.* afectó el crecimiento de las radículas de las semillas *in vitro*. En ensayos *in vivo* las plantas crecidas a partir de semillas tratadas obtuvieron un peso seco superior a las testigos. En definitiva, el tratamiento con *T.h.* fue capaz de reducir hasta un 65% la «tristeza» causada por el patógeno *P.c.* en plantas de pimentón (Ezziyyani *et al.*, 2004c).

Ezziyyani *et al.* (2004a), obtuvieron un aislado antagonista del *Phytophthora capsici* de plantas de pimentón identificado como *Streptomyces rochei* y fue utilizado en ensayos *in vitro* e *in vivo* para observar el efecto. Este micoparasitismo causó la lisis y desintegración de las hifas del patógeno. La adición del aislado a plantas de pimentón redujo el marchitamiento hasta un 65%. Las plantas presentaron un color verde más intenso, aunque no hubo cambios en el peso seco ni en la longitud de las plántulas frente al control. El aislado se cultiva en vermiculita + caldo nutritivo lo que permite su viabilidad en el tiempo y su adición directamente a las plantas. La concentración de 1.9×10^3 ufc/mL del aislado bacteriano fue la que permitió mayor reducción de los síntomas de la tristeza.

Ezziyyani *et al.* (2004b), estudiaron la capacidad antagónica de la bacteria *Burkholderia cepacia*, para controlar la marchitez causada por el patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de pimentón. Las evaluaciones se realizaron *in vitro* mediante confrontaciones de la bacteria y *P. capsici*. Analizaron su incidencia sobre semillas, hojas y raíces, midiendo la reducción de las «manchas foliares» y la «pudrición de la raíz» causada por el patógeno y su repercusión en la germinación y el crecimiento de las plántulas, demostrando la inocuidad de la bacteria al adicionarse a semillas y plántulas de pimiento *in vivo*. La adición del preparado de la bacteria a plantas inoculadas con el patógeno, redujo la podredumbre causada por *P. capsici* en un 37% en condiciones de campo y en un 55,6% en pimientos cultivados en condiciones controladas en macetas mantenidas en invernaderos. Los resultados favorables obtenidos permitieron considerar a la bacteria *B. cepacia*, como uno de los microorganismos utilizables en el biocontrol de patógenos del pimentón.

Las podredumbres radicales causadas por *Phytophthora cinnamomi* y por *Rosellinia necatrix* son las enfermedades más importantes en el cultivo del aguacate en el sur de España. En presencia de *Trichoderma* la densidad de inóculo de *P. cinnamomi* se redujo entre un 86 y 91% y su porcentaje de aislamiento en las raíces de las plantas inoculadas entre un 40 y 60%. Para *R. necatrix*, el aislado de *Trichoderma* TB1.2 fue el único que resultó efectivo reduciendo el porcentaje de aislamiento del patógeno en las raíces de las plantas inoculadas un 37% (López *et al.*, 1999).

Guigón y González (2004), aislaron seis cepas de *Trichoderma* spp.: TC74 de chile jalapeño, TvVA y TbVA de nogal, TvB y TbB de menta y TS01 de durazno, en el sur del estado de Chihuahua, México. La cepa TC74 a una concentración de 26×10^7 con/mL, produjo plantas 30 % más altas, 20 % más de hojas, área foliar 30 % más abundante, tallos 15 % más robustos, y 60 % y 38 % más biomasa de la raíz y aérea, respectivamente. TS01 produjo plantas con 15 a 35 % más follaje e incrementó 40 % la materia seca aérea. El número de yemas y flores aumentó de 40 a 60 % empleando las cepas de *Trichoderma* spp.

Guillén *et al.* (2006), investigaron el potencial de biocontrol en campo de cuatro aislados de *Bacillus* y la mezcla de éstos (B1, B3, B9 y B13) sobre los patógenos causantes de pudriciones de raíz, así como su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile. La aplicación de las bacterias incrementó la altura de la planta en 20%. También se redujo la incidencia en 80 % y la severidad de pudrición de raíz en 39 % respecto al testigo.

MATERIALES Y METODOS

Localización de la investigación

La investigación se llevó a cabo en La Clínica de Enfermedades de Plantas de la Cátedra de Fitopatología, Departamento e Instituto de Botánica Agrícola de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, estado Aragua bajo condiciones de laboratorio y umbráculo.

Obtención de los aislamientos

Se visitaron diferentes localidades productoras de hortalizas de los estados: Aragua (10), Guárico (1) y Carabobo (1), para coleccionar plantas con síntomas de marchitez y muestras de suelo en el área de cultivo, con el objetivo de aislar tanto al patógeno (*Phytophthora capsici* L.) como los antagonistas (*Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp.). Las muestras fueron trasladadas debidamente identificadas hasta La Clínica de Enfermedades de Plantas, para su procesamiento.

Aislamiento de *Phytophthora capsici* L.

Muestras de plantas de pimentón con síntomas de la enfermedad, provenientes de diferentes localidades, fueron recolectadas y seccionados los tallos que presentaron necrosis. En cámara de flujo laminar, las secciones de tallos se lavaron con agua corriente y posteriormente con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % por un minuto; transcurrido este tiempo, se enjuagaron con agua destilada estéril (ADE) y fueron secados con papel absorbente, se cortaron en el margen de la lesión trozos de 2 a 3 mm, sembrando 5 por placas Petri con agar zanahoria (AZ) de forma equidistantes. Estas placas se identificaron y colocaron en condiciones de laboratorio (27 ± 2 °C y luz fluorescente continua) durante 5 días hasta observar el desarrollo completo de la colonia, obteniendo cultivos puros del patógeno que fueron replicados a tubos de ensayo con AZ y conservados a 5 °C,

para ser empleados en las pruebas posteriores.

Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Las muestras de suelo fueron procesadas por la técnica de dilución seriada en placas de agar. De cada muestra se pesaron 10 gramos y se mezclaron con 90 mL de ADE produciendo la solución madre. Posteriormente, en cámara de flujo laminar, se tomó 1 mL de la solución madre y se agregó a un tubo de ensayo con 9 mL de ADE, obteniendo una dilución a 10^{-1} y esta operación se repitió hasta llegar a 10^{-4} . De las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} se tomó 1 mL y se vació en placas Petri previamente esterilizadas, incorporando luego medio de cultivo líquido papa-dextrosa-agar-acidificado (PDAA), agitando suavemente sobre el mesón de la cámara de aislamiento para facilitar una buena distribución dentro de la placa.

Las placas se incubaron a 27 ± 2 °C en oscuridad continua, realizando observaciones cada 24 horas por tres días y marcando las colonias del antagonista, las cuales se purificaron repicándolas a tubos de ensayo con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y conservándolos a 5 °C, para continuar la investigación.

Aislamiento de *Bacillus* spp.

Se colocó en un frasco Erlenmeyer de 125 mL una mezcla de suelo y solución salina al 85 % (relación 1:9). La suspensión madre obtenida de suelo se sometió a baño maría (80 °C durante 20 min). A partir de dicha suspensión, se hizo diluciones seriadas hasta 10^{-4} en tubos de ensayos. Se tomó 0,1 mL de la dilución 10^{-3} y 10^{-4} , se colocó sobre placas Petri con medio de cultivo en Agar Nutritivo (AN) y se diseminó por extensión en superficie con una varilla metálica. Las muestras se hicieron por duplicado y fueron identificadas con el tipo de muestra y la dilución a usar. Las placas se guardaron en bolsas plásticas y se colocaron en condiciones del laboratorio, observando a partir de 48 horas el crecimiento de colonias bacterianas en las mismas. A las 48 y 72 horas de

incubación se seleccionaron colonias bacterianas presentes en la muestra de suelo. Los criterios tomados en cuenta para la selección de las colonias y aislamiento de las placas fueron aquellas que formaron colonias grandes e irregulares en AN y las que crecieron en mayor abundancia o aquellas que presentaron algún halo de inhibición o antagonismo con otras colonias. Para obtener el cultivo puro, se tomó con un ansa de platino las colonias seleccionadas en forma individual y se realizó un estriado sencillo (zig-zag), en placas Petri, con AN, por duplicado (Schaad *et al.*, 2001). Para mantener la viabilidad de los aislamientos bacterianos, las placas se almacenaron en condiciones de laboratorio durante máximo 72 horas y se replicaron periódicamente en AN durante la ejecución de los ensayos.

Prueba de patogenicidad de *Phytophthora capsici* L. en plantas de pimentón

Preparación del inóculo del patógeno

El aislamiento obtenido, se repicó en placas Petri con AZ, y se incubó a 27 ± 2 °C, durante 5 días. A cada placa se le añadió 10 mL de ADE y con la ayuda de un bisturí se removió el micelio de la superficie de la colonia del agar, filtrando la suspensión a través de una gasa estéril en un envase previamente esterilizado. Mediante el uso del hematocímetro se determinó la concentración de inóculo inicial de la suspensión, ajustando la misma a 1×10^4 esporangios/mL.

Preparación del semillero

Semillas de pimentón variedad Cacique Gigante, fueron sembradas en semillero o bandejas con un sustrato constituido por fibra de coco y humus de lombriz (2:1) esterilizado, regadas diariamente y luego de observar la primera hoja se fertilizó diariamente con 0,5 g/L de una fórmula (11-40-11) y solución nutritiva.

Aplicación del inóculo y transplante

Transcurrido 18 - 20 días después de la siembra, se seleccionaron plántulas sanas que se dejaron a raíz desnuda y se transplantaron en bolsas negras de 2 ½ Kg de capacidad, que contenían suelo previamente esterilizado con calor húmedo. En la base del tallo de cada plántula se colocó 100 g de suelo previamente inoculado con suspensión de *P. capsici* (1×10^4 esporangios/mL) se ubicaron en cámara húmeda durante 48 horas, contando con un testigo que consistió en plántulas cuyas raíces se sumergieron en ADE e igualmente fueron transplantadas a suelo estéril.

Las plantas se conservaron en umbráculo durante 60 días, regándolas diariamente y a los siete días del transplante fueron fertilizadas con 10 g/l de una formula completa (15:15:15). Para controlar la presencia de gusanos cortadores foliares, se preparó un cebo tóxico a base de arroz, melaza y *Beauveria bassiana*, los cual fueron colocados en los alrededores de las plantas tratadas. El ensayo se montó en período fresco, lluvioso, por lo que, se hicieron mediciones diarias de temperatura y humedad relativa en el sitio.

Las observaciones se realizaron cada 48 horas, para detectar y determinar el porcentaje de plantas con síntomas de la enfermedad, además, se realizó el reaislamiento con la finalidad de comprobar de esta manera la patogenicidad del aislamiento.

El tratamiento tuvo 10 repeticiones y la unidad experimental fue una planta.

Descripción del aislamiento *Phytophthora capsici* L.

La descripción se basó tanto en características macroscópicas como microscópicas. Para la caracterización macroscópica, del aislamiento seleccionado y almacenado en tubos de ensayo, se repicó a placas Petri con AZ. Éstas placas se conservaron bajo condiciones de laboratorio (27 ± 2 °C y luz fluorescente) durante 5 días, describiéndose color, aspecto y forma de crecimiento de la colonia.

Las características microscópicas se determinaron mediante preparados a partir de colonias obtenidas en AZ de cinco días de crecimiento, describiendo tipo de micelio, esporangióforo, tamaño y forma de los esporangios y sus dimensiones. Estas descripciones se emplearon para confirmar la identificación de los aislamientos con la ayuda de material bibliográfico sobre el género *Phytophthora* sp. (Kirk *et al.*, 2001; Arauz, 1998; Erwin y Ribeiro, 1996; Wilcox *et al.*, 1993; Tuset, 1977; Boccas *et al.*, 1976; Waterhouse, 1963; Leonian, 1922).

Descripción de los aislamientos antagonistas

***Trichoderma* spp.**

Los aislamientos se repicaron en PDA y conservaron a 27 ± 2 °C en oscuridad por tres a ocho días. En las observaciones macroscópicas se tomó en cuenta color, aspecto y forma de crecimiento de la colonia y pigmentación del medio de cultivo. Las características microscópicas se observaron realizando preparados a partir de colonias con tres días de crecimiento; describiendo tipo de ramificación de los conidióforos, formas y medidas de las fiálides y los conidios. Para determinar la presencia o ausencia de las clamidosporas y sus características, se emplearon preparados microscópicos de colonias de ocho o más días de crecimiento. Con estas descripciones y teniendo como base información bibliográfica para *Trichoderma* spp., se identificaron los diferentes aislamientos obtenidos (Samuels, 2005; Bisett, 1991; Barnett y Hunter, 1987; Rifai, 1969).

***Bacillus* spp.**

Se identificó el género o especie, a través de pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas (Schaad, 2001; Bergey, 2000; Buchanan y Gibbons, 1974).

Prueba morfológicas:

- Se realizó un estriado por agotamiento de los aislamientos sobre medio de cultivo AN, para obtener colonias aisladas y se observó bajo la lupa

estereoscópica, forma, superficie, borde y relieve de la colonia, así como también el color de la misma (Rudolph, *et al.*, 1990).

Pruebas fisiológicas y bioquímicas:

Las pruebas bioquímicas y fisiológicas, de acuerdo al manual de Schaad (2001), fueron las siguientes:

- Tinción de rojo congo; para determinar forma de la célula bacteriana.
- KOH al 3%, para determinar si eran bacterias Gram + ó Gram - (Schaad, 2001).
- Determinación de requerimientos de oxígeno, a través de las pruebas Hugh y Leifson permite diferenciar si las bacterias son de crecimiento aeróbico o anaerobico facultativo (Schaad, 2001).
- Prueba de Oxidasa, para determinar la presencia de la enzima oxidasa debido a un sistema de citocromo de la cadena respiratoria que poseen ciertas bacterias (Braun y Sands, 2001).
- Prueba de Catalasa, para determinar la presencia de la enzima catalasa en aquellas bacterias que formaron gas en presencia de peróxido de hidrógeno (Schaad, 2001).
- Crecimiento bacterial a 45 y 65 °C sobre medio AN (Braun y Sands, 2001).
- Producción de ácido a partir de azúcares como L-arabinosa, xylosa y manitol (Chun y Jones, 2001).
- Tolerancia al NaCl al 2, 5 y 7%, para determinar si hay crecimiento de la bacteria a esas concentraciones de sales (Schaad, 2001).
- Prueba de utilización de Citrato: determina si el microorganismo fue capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono (Holt *et al.*, 1994).
- Hidrólisis de almidón: permite determinar la presencia de enzimas extracelulares que degradan el almidón (Chun y Jones, 2001).
- Tinción de endospora, para observar la disposición y morfología de la misma (Schaad, 2001).

Pruebas de enfrentamiento entre *Phytophthora capsici* L. y *Trichoderma* spp.

Una vez obtenidos los aislamientos se prepararon placas Petri con AZ, y se aplicaron los diferentes tratamientos que consistieron en colocar en un extremo de la placa un disco de 5 mm de la colonia del patógeno *Phytophthora capsici* L. de cinco días de crecimiento y en el otro extremo un disco de 5 mm con micelio del antagonista *Trichoderma* spp. de tres días de crecimiento de la misma y diferentes localidades; colocando como testigo en una placa Petri solamente un disco de 5 mm de la colonia del patógeno. Cada enfrentamiento se hizo con 4 repeticiones cada uno, donde una placa Petri fue la unidad experimental y el diseño completamente aleatorizado.

Estas placas Petri se identificaron debidamente y se incubaron a 27 ± 2 °C, realizando las siguientes observaciones:

a) Cada 24 horas se midió el radio de crecimiento del patógeno en milímetros tanto de los tratamientos, como de los testigos, determinando el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) mediante la fórmula de Menten *et al.* (1976):

$$\text{PIC} = \frac{\text{Crecimiento del testigo} - \text{Crecimiento del tratamiento}}{\text{Crecimiento del testigo}} \times 100$$

b) A las 96 horas, con el uso del hematocímetro, se realizó el conteo del número de esporangios del patógeno por mL de solución en los tratamientos y testigos, calculando el porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) aplicando la fórmula de Menten *et al.* (1976):

$$\text{PIE} = \frac{\text{Esporulación del testigo} - \text{Esporulación del tratamiento}}{\text{Esporulación del testigo}} \times 100$$

Los datos del porcentaje de inhibición de crecimiento e inhibición de esporulación fueron tabulados utilizando la hoja de cálculo electrónica MS Excel y

posteriormente procesados con el Software estadístico InfoStat v 1.1, (Software 2002), vía paramétrica, ya que se cumplieron los supuestos del análisis de la varianza.

Prueba de confrontación entre *Phytophthora capsici* L. y *Bacillus* spp.

El proceso de confrontación se llevó a cabo en placas Petri con medio de cultivo AZ. Se extrajeron discos de aproximadamente 5 mm del patógeno y se colocaron en el centro de cada una de las placas. Alrededor del patógeno, equidistantes entre sí, se colocaron 2 discos de papel filtro, previamente impregnados con 20 µL de la suspensión bacteriana.

El tratamiento testigo consistió en colocar un disco del patógeno en el centro de la placa Petri, rodeado por 2 discos impregnados con ADE. Todas las placas se incubaron durante seis días a 28 – 30 °C. Se realizaron mediciones diarias del crecimiento radial desde el borde del disco hasta el borde del halo de inhibición de la bacteria, determinándose el PIC y PIE. Las confrontaciones se hicieron con 4 repeticiones cada una, donde una placa Petri fue la unidad experimental y el diseño experimental un completamente aleatorizado.

Los datos del porcentaje de inhibición de crecimiento e inhibición de esporulación fueron tabulados utilizando la hoja de cálculo electrónica MS Excel y posteriormente procesados con el programa estadístico InfoStat v 1.1, (Software 2002), vía paramétrica, ya que se cumplieron los supuestos del análisis de la varianza.

Evaluación de la capacidad biocontroladora de una cepa de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. para el control de *Phytophthora capsici* en condiciones de umbráculo

Obtención de la suspensión de inóculo de los antagonistas

Se prepararon suspensiones madres tanto de *Trichoderma* sp. como de *Bacillus*

sp., que resultaron más efectivos en inhibir el crecimiento y la esporulación del patógeno y conociendo la concentración inicial de cada uno, se prepararon las concentraciones deseadas de *Trichoderma* sp. (10^6 con/mL) y *Bacillus* sp. (10^8 ufc/mL).

Preparación de las semillas y siembra en semillero

Se emplearon 240 semillas de pimentón variedad Cacique Gigante, dividiéndolas en cuatro grupos:

- Un primer grupo (60 semillas), denominado semillas protegidas *Trichoderma* se sumergieron durante 15 minutos en una suspensión de *Trichoderma*, a una concentración de 10^6 con/mL.
- Un segundo grupo (60 semillas), denominado semillas protegidas *Bacillus* se sumergieron durante 15 minutos en una suspensión de *Bacillus*, a una concentración de 10^8 ufc/mL.
- Un tercer grupo (60 semillas), denominado semillas protegidas (*Trichoderma* + *Bacillus*) se sumergieron durante 15 minutos en una suspensión de *Trichoderma* + *Bacillus* de concentración 10^6 con/mL + 10^8 ufc/mL, respectivamente.
- Un cuarto grupo (60 semillas) no protegidas.

Cada grupo de semillas se sembró en un germinador que contenían un sustrato a base de fibra de coco y humus de lombriz sólido (2:1) previamente esterilizado a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $1,2\text{ Kg/cm}^2$ de presión por 30 minutos. Ya establecido el germinador, las plantas fueron regadas diariamente y semanalmente se les aplicó 5 mL / plántula de solución nutritiva como fertilizante.

Obtención del sustrato para el transplante

Cinco días antes del transplante, se inoculó con la suspensión de *Phytophthora capsici* (10^4 esporangios/mL) suelo previamente esterilizado con calor húmedo.

Luego se llenaron con suelo estéril 180 bolsas negras de dos kilogramos y medio de capacidad y al momento del transplante, en la base del tallo de las plántulas, se aplicó 100 g de suelo previamente inoculado. De igual forma se contaron con 60 bolsas negras de polietileno con una mezcla de suelo-arena estéril, a las que sólo se les aplicó ADE.

Transplante

Transcurridos 20 días desde el momento de la siembra, se extrajeron plántulas sanas de los germinadores, se dejaron a raíz desnuda y se manejaron bajo las siguientes condiciones:

T1. Plántulas provenientes de semillas protegidas con *Trichoderma*, se sumergieron durante 15 minutos en suspensión de *Trichoderma* a la concentración 10^6 con/mL y se transplantaron en suelo con el patógeno. Luego, se aplicó ésta misma concentración de *Trichoderma* semanalmente.

T2. Plántulas provenientes de semillas protegidas con *Bacillus*, se sumergieron durante 15 minutos en suspensión de *Bacillus* a la concentración 10^8 ufc/mL y se transplantaron en suelo con el patógeno. Luego, se aplicó ésta misma concentración de *Bacillus* semanalmente.

T3. Plántulas provenientes de semillas protegidas con *Trichoderma*, se transplantaron en suelo con el patógeno.

T4. Plántulas provenientes de semillas protegidas con *Bacillus*, se transplantaron en suelo con el patógeno.

T5. Plántulas provenientes de semillas protegidas con *Trichoderma*, se sumergieron durante 15 minutos en suspensión de *Trichoderma* + *Bacillus* de concentración 10^6 con/mL + 10^8 ufc/mL, respectivamente y se transplantaron en suelo con el patógeno. Luego, se aplicó ésta misma concentración de *Trichoderma* + *Bacillus* semanalmente.

T6. Plántulas provenientes de semillas protegidas con *Bacillus*, se sumergieron durante 15 minutos en suspensión de *Trichoderma* + *Bacillus* de concentración 10^6 con/mL + 10^8 ufc/mL, respectivamente y se transplantaron en suelo con el

patógeno. Luego, se aplicó ésta misma concentración de *Trichoderma* + *Bacillus* semanalmente.

T7. Plántulas provenientes de semillas protegidas con *Trichoderma*, se sumergieron durante 15 minutos en ADE y se transplantaron a suelo sin el patógeno (Testigo *Trichoderma* sin patógeno).

T8. Plántulas provenientes de semillas protegidas con *Bacillus*, se sumergieron durante 15 minutos en ADE y se transplantaron a suelo sin el patógeno (Testigo *Bacillus* sin patógeno).

T9. Plántulas obtenidas de semilla sin protección fueron sumergidas durante 15 minutos en ADE y transplantadas a suelo con el patógeno (Testigo con el patógeno).

T10. Plántulas obtenidas de semilla sin protección fueron sumergidas durante 15 minutos en ADE y transplantadas a suelo sin el patógeno (Testigo absoluto).

T11. Plántulas obtenidas de semilla protegidas con (*Trichoderma* + *Bacillus*), se sumergieron durante 15 minutos en suspensión de *Trichoderma* + *Bacillus* de concentración 10^6 con/mL + 10^8 ufc/mL, respectivamente y se transplantaron en suelo con el patógeno. Luego, se aplicó ésta misma concentración de *Trichoderma* + *Bacillus* semanalmente.

T12. Plántulas obtenidas de semilla protegidas con (*Trichoderma* + *Bacillus*), se sumergieron durante 15 minutos en suspensión de *Trichoderma* + *Bacillus* de concentración 10^6 con/mL + 10^8 ufc/mL, respectivamente y se transplantaron en suelo sin el patógeno. Luego, se aplicó ésta misma concentración de *Trichoderma* + *Bacillus* semanalmente (Cuadro 1).

Las aplicaciones semanales fueron 20 mL de la suspensión de los diferentes antagonistas a la base de la planta por un periodo de 7 semanas.

Todas estas plantas se ubicaron en cámara húmeda durante 48 horas dentro del umbráculo y posteriormente fueron dejadas allí hasta su evaluación final. Las plantas se regaron diariamente. El ensayo se montó en período fresco, lluvioso, por lo que, se hicieron mediciones diarias de temperatura y humedad relativa en el sitio. Siete días después del transplante fueron fertilizadas con 10 g/l de una

formula completa (15:15:15). Observaciones diarias permitieron determinar la aparición de los síntomas y hacer los respectivos reaislamientos.

Finalmente a los 60 días se evaluó el ensayo, realizando el conteo del número total de plantas con síntomas de marchitez, información que permitió calcular la incidencia de la enfermedad en cada tratamiento, así como la medición de los parámetros de crecimiento de planta (altura, peso fresco, peso seco de la parte aérea como también el número de flores; peso fresco, peso seco y volumen de las raíces).

Los datos fueron tabulados utilizando la hoja de cálculo electrónica MS Excel y procesados con el programa estadístico InfoStat v 1.1 (Software 2002), vía paramétrica, ya que se cumplieron los supuestos del análisis de la varianza, el experimento se instaló en un diseño completamente aleatorizado y se contó con un total de doce tratamientos, con diez repeticiones cada uno y una planta por unidad experimental.

Cuadro 1. Tratamientos para evaluar la capacidad biocontroladora de un aislamiento de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. para el control de *Phytophthora capsici*

Tratamiento	Descripción
1	Semillas protegidas con <i>T. sp</i> + <i>T. sp</i> en transplante + suelo/ <i>Phy</i> +s
2	Semillas protegidas con <i>B. sp</i> + <i>B. sp</i> en transplante + suelo/ <i>Phy</i> +s
3	Semillas protegidas con <i>T. sp</i> + ADE en transplante + suelo/ <i>Phy</i>
4	Semillas protegidas con <i>B. sp</i> + ADE en transplante + suelo/ <i>Phy</i>
5	Semillas protegidas con <i>T. sp</i> + (<i>T. sp</i> + <i>B. sp</i>) en transplante + suelo/ <i>Phy</i> +s
6	Semillas protegidas con <i>B. sp</i> + (<i>T. sp</i> + <i>B. sp</i>) en transplante + suelo/ <i>Phy</i> +s
7	Semillas protegidas con <i>T. sp</i> + ADE en transplante + suelo
8	Semillas protegidas con <i>B. sp</i> + ADE en transplante + suelo
9	Semillas no protegidas + ADE en transplante + suelo/ <i>Phy</i>
10	Semillas no protegidas + ADE en transplante + suelo
11	Semillas protegidas con (<i>T. sp</i> + <i>B. sp</i>) + (<i>T. sp</i> + <i>B. sp</i>) en transplante + suelo/ <i>Phy</i> +s
12	Semillas protegidas con (<i>T. sp</i> + <i>B. sp</i>) + (<i>T. sp</i> + <i>B. sp</i>) en transplante + suelo +s

s= Aplicaciones semanales del antagonista según el tratamiento, después del transplante

T. sp = *Trichoderma* sp. a 10^6 con/mL

B. sp = *Bacillus* sp. a 10^8 ufc/mL

Phy = *Phytophthora capsici*

Resultados y Discusión

Aislamiento del patógeno y los antagonistas

Se logró aislar *Phytophthora* sp., en muestras vegetales de pimentón de la localidad Múcura II, estado Aragua, mientras que en el caso de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. se obtuvieron 21 y 20 aislamientos respectivamente, de diferentes localidades de los estados Aragua y Carabobo (Cuadro 2 y 3).

Cuadro 2. Aislamientos obtenidos del género *Trichoderma*.

Aislamiento	Procedencia	Cultivo presente
Tr1	La Majada – Edo. Aragua	Tomate
Tr2	Valles de Tucutunemo – Edo. Aragua	Tomate
Tr3	Santa María – Edo. Aragua	Berenjena
Tr4	Palo Negro – Edo. Aragua	Tomate Shanty
Tr5	Valles de Tucutunemo – Edo. Aragua	Cebolla
Tr6	Múcura II – Edo. Aragua	Remolacha
Tr7	Múcura II – Edo. Aragua	Pimentón
Tr8	Múcura II – Edo. Aragua	Berenjena
Tr9	Múcura II – Edo. Aragua	Auyama
Tr10	Múcura II - Edo. Aragua	Yuca
Tr11	Santa María – Edo. Aragua	Tomate
Tr12	Múcura II – Edo. Aragua	Pimentón
Tr13	Palo Negro – Edo. Aragua	Tomate
Tr14	Barbacoas - Edo. Aragua	Pimentón
Tr15	Barbacoas – Edo. Aragua	Pimentón
Tr16	Tasajera – Edo. Aragua	Tomate
Tr17	Tacarigua Dos – Edo. Carabobo	Tomate
Tr18	Ruiz Pineda – Edo. Aragua	Pimentón
Tr19	Múcura II – Edo. Aragua	Berenjena
Tr20	Las Delicias – Edo. Aragua	Pimentón
Tr21	Valles de Tucutunemo – Edo. Aragua	Pimentón

Cuadro 3. Aislamientos obtenidos del género *Bacillus*.

Aislamiento	Procedencia	Cultivo presente
B1	Ruiz Pineda – Edo. Aragua	Pimentón
B2	La Parcela – Edo. Guárico	Pimentón
B3	Las Delicias – Edo. Aragua	Pimentón
B4	Valles de Tucutunemo – Edo. Aragua	Remolacha
B5	Valles de Tucutunemo – Edo. Aragua	Maíz
B6	Tacarigua Dos – Edo. Carabobo	Pimentón
B7	Múcura II – Edo. Aragua	Berenjena
B8	El Milagro – Edo. Aragua	Pimentón
B9	Múcura II – Edo. Aragua	Yuca
B10	Palo Negro – Edo. Aragua	Tomate
B11	Palo Negro – Edo. Aragua	Tomate
B12	Barbacoas – Edo. Aragua	Pimentón
B13	Barbacoas – Edo. Aragua	Pimentón
B14	Santa María – Edo. Aragua	Tomate
B15	Múcura II – Edo. Aragua	Remolacha
B16	Valles de Tucutunemo – Edo. Aragua	Tomate
B17	Barbacoas – Edo. Aragua	Pimentón
B18	Valles de Tucutunemo – Edo. Aragua	Remolacha
B19	Barbacoas – Edo. Aragua	Pimentón
B20	Múcura II – Edo. Aragua	Remolacha

Prueba de patogenicidad de *Phytophthora* sp.

La prueba de patogenicidad resultó positiva al ser inoculado *Phytophthora* sp. en plantas de pimentón variedad Cacique Gigante, las cuales manifestaron los síntomas característicos de la enfermedad en las primeras semanas hasta provocarles la muerte (Figura 1). A los 5 días después de la inoculación, las plantas tratadas con el oomiceto mostraron síntomas de marchitez como resultado de la infección y en el tallo se observó una necrosis. Las hojas perdieron su turgencia y permanecieron adheridas a las ramas conservando su color verde natural. Al realizar el corte de la zona afectada y hacer el reaislamiento, en medio de cultivo, se logró obtener el patógeno, responsable de la marchitez *Phytophthora capsici* Leonian, resultado comparable al encontrado por los autores (Ezziyyani, 2004a; Erwin y Ribeiro, 1996; Tuset, 1977; Boccas *et al.*, 1976; Waterhouse, 1963).

Pineda *et al.*, 2003 y Guillén *et al.*, 2006 afirmaron que *Phytophthora capsici*, es uno de los agentes causales de la pudrición en tallos y raíces en hortalizas.

El aislamiento produjo el 90% de plantas con síntomas de la enfermedad, siendo evidente la agresividad de la cepa y comparable con los resultados obtenidos por Pichardo (2009) al obtener los mismos síntomas cuando inoculó plantas sanas de pimentón con *P. capsici* proveniente del Campo Experimental Experta, ubicado en Maracay, Edo. Aragua. De igual manera, Escalona *et al.* (2006), corroboraron síntomas de la enfermedad en plantas de pimentón ubicadas en la parte baja del municipio Jiménez, Edo. Lara. De acuerdo a las temperaturas (22 °C – 45 °C) y humedades relativas (40 % - 100 %) obtenidas en el umbráculo durante el ensayo y con la humedad en el suelo debido al riego frecuente (diarios), favoreció el establecimiento y desarrollo *P. capsici*, eso explica el número de plantas muertas obtenidas a causa de la enfermedad ocasionada por este patógeno.



Figura 1. A) Plantas de pimentón inoculadas con *Phytophthora capsici*. B) Comparación de una planta sana y otra enferma. C y D) Plantas mostrando síntomas de marchitez, pudrición de tallo y raíz característicos de la enfermedad.

Descripción e identificación de *Phytophthora* sp.

Una vez desarrolladas las colonias en el medio de cultivo AZ, a los 6 – 7 días, el oomiceto reaislado de las plantas que manifestaron marchitez, presentó colonia blanca, algodonosa con patrón estrellado, bordes bien definidos, micelio continuo hialino, muy ramificado, esporangios abundantes, de forma elipsoidal (30 - 45 x 25 - 30) μ , monopapilados, caducos, con pedicelo cortos. Las características anteriormente descritas (culturales y morfométricas) corresponden a lo señalado por diversos autores (Kirk *et al.*, 2001; Arauz, 1998; Erwin y Ribeiro, 1996; Wilcox *et al.*, 1993; Tuset, 1977; Boccas *et al.*, 1976; Waterhouse, 1963; Leonian, 1922) para la especie *Phytophthora capsici* Leonian (Figura 2).

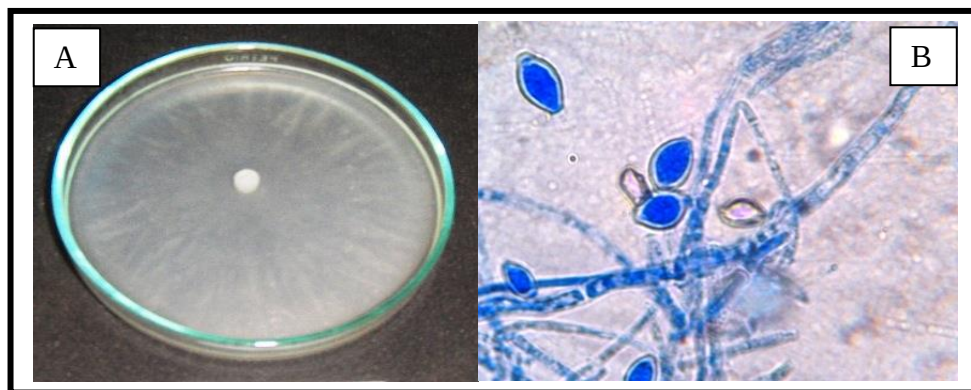


Figura 2. A) Colonia de *P. capsici* de cinco días de edad en AZ. B) Micelio continuo y esporangios.

Selección de los antagonistas

De *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., se seleccionaron los aislados Tr12 y B1, para la identificación y ensayos en umbráculo, los cuales produjeron mayores PIC y PIE, así como por el mecanismo de acción sobre el patógeno observado (antibiosis, competencia, hiperparasitismo e inducción de resistencia).

Descripción e identificación de *Trichoderma* sp.

El aislado Tr12 (Múcura II), presentó una colonia de crecimiento rápido, inicialmente de color blanco, a las 72 horas empezó a desarrollar anillos concéntricos, hifas septadas, hialinas, conidióforo intrincado, midiendo (50,0 – 60,0 x 2,0 – 3,0) μ , verticilos formado por cinco fiálides, de forma ampuliforme, midiendo (10,5 x 3,3) μ y 2,2 μ en la base, no se observaron fiálides intercalares, conidios con pared lisa, globosos a subglobosos, de color verde oliva, sus medidas son (3,5 x 3,1) μ , presenta clamidosporas terminales e intercalares, globosas a subglobosas, midiendo (9,5 x 9,0 μ) (Figura 3A y 3B). Las características del aislamiento corresponden a la descripción dada por Rifai (1969), Barnett y Hunter (1987), Bisett (1991), Samuels (2005), para la especie *Trichoderma harzianum*.

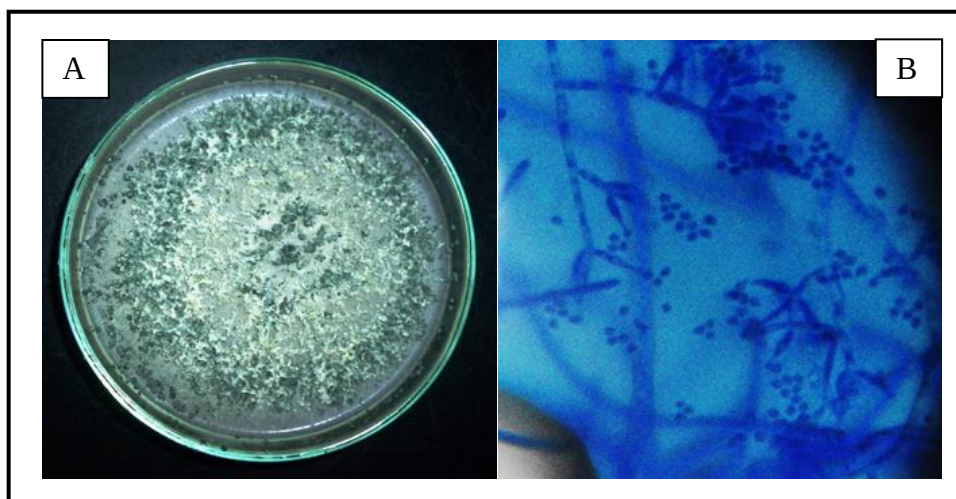


Figura 3. *Trichoderma harzianum*. A) Colonia del hongo con formación de anillos concéntricos. B) Conidióforo con ramificación intrincada y conidios globosos a subglobosos.

Descripción e identificación de *Bacillus* sp.

El aislado B1 (Ruiz Pineda), se caracterizó por formar colonias de color crema opaco, de aspecto rugoso y bordes ondulados; corresponde a una bacteria Gram positivo, forma de bastón, con endospora en la parte central, aeróbico facultativo, oxidasa negativo, catalasa, crecimiento a 45 y 65 °C, motilidad, hidrólisis de almidón, prueba de Voges Proskeaur positivos; las características del aislado (Cuadro 4, Figura 4 y 5) corresponden a lo señalado por diversos autores (Schaad, 2001; Bergey, 2000; Buchanan y Gibbons, 1974) para la especie *Bacillus subtilis*.

Varios investigadores consideran que entre los microorganismos más importante para el control de enfermedades se encuentran las bacterias del géneros *Bacillus*, debido a que tienen la facilidad de digerir la quitina, además, de la producción de antibióticos como: bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina, entre otros, además, de la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas en *Bacillus subtilis* (Podile y Laxmi, 1998; Cazorla y Romero, 2007; Bernal *et al.*, 2002; Fernández-Larrea, 2006). En Cuba, demostraron la efectividad del Biobac® obtenido a partir

de *B. subtilis* (cepa INIFAT-101) como biocontrolador de enfermedades y estimulador del crecimiento vegetal (Tejeda *et al.*, 2006). La aplicación del bioproducto fue viable en condiciones controladas y no controladas para diferentes cultivos como cebolla, tomate, trigo, remolacha y otros.

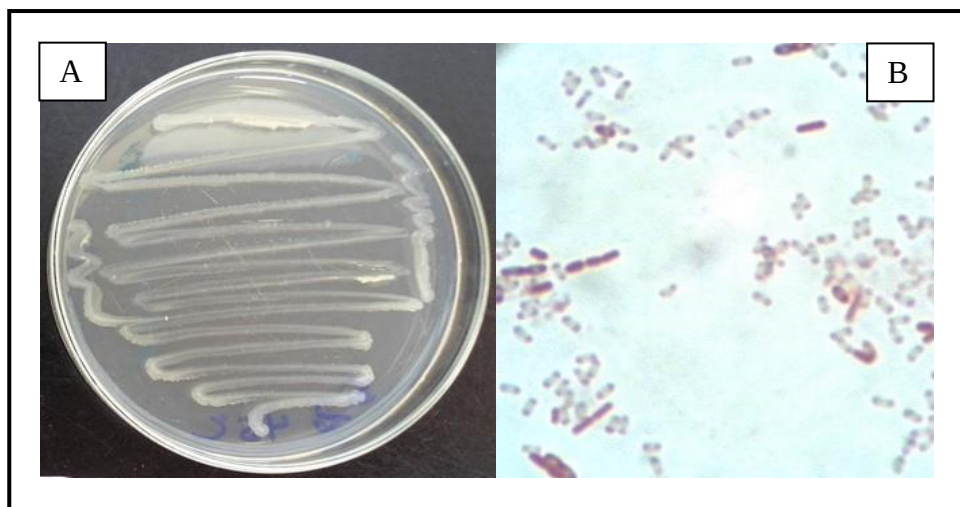


Figura 4. A) Colonia de la bacteria *B. subtilis*. B) Células bacterianas observadas con tinción de endosporas.

Cuadro 4. Características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de la bacteria.

Prueba	Reacción	
Morfología de la colonia	Aspecto rugoso y bordes ondulados	
Color de la colonia	Crema opaco	
Forma - Tinción Rojo Congo	Bastones	
Tinción de endospora	+ (Central)	
Tamaño	2-4 μm de diámetro	
Catalasa	+	
Oxidasa	-	
Tolerancia a sales	3%	Igual que el testigo
	5%	Afectó el crecimiento
	7%	Poco crecimiento
Requerimiento de oxígeno	Aérobico facultativo	
Temperatura crecimiento óptimo	45 °C	+
	65 °C	+
Hidrólisis de almidón	+	
Reacción de Gram (KOH al 3%)	Gram +	
Utilización de Citrato	+	
Producción de ácido a partir:	Manitol	+
	Xylosa	+
Motilidad	+	
Voges Proskeaur	+	

Todas las pruebas fueron realizadas con colonias de 24 – 48 horas de crecimiento (+): Reacción positiva; (-): Reacción negativa; ND: No determinado

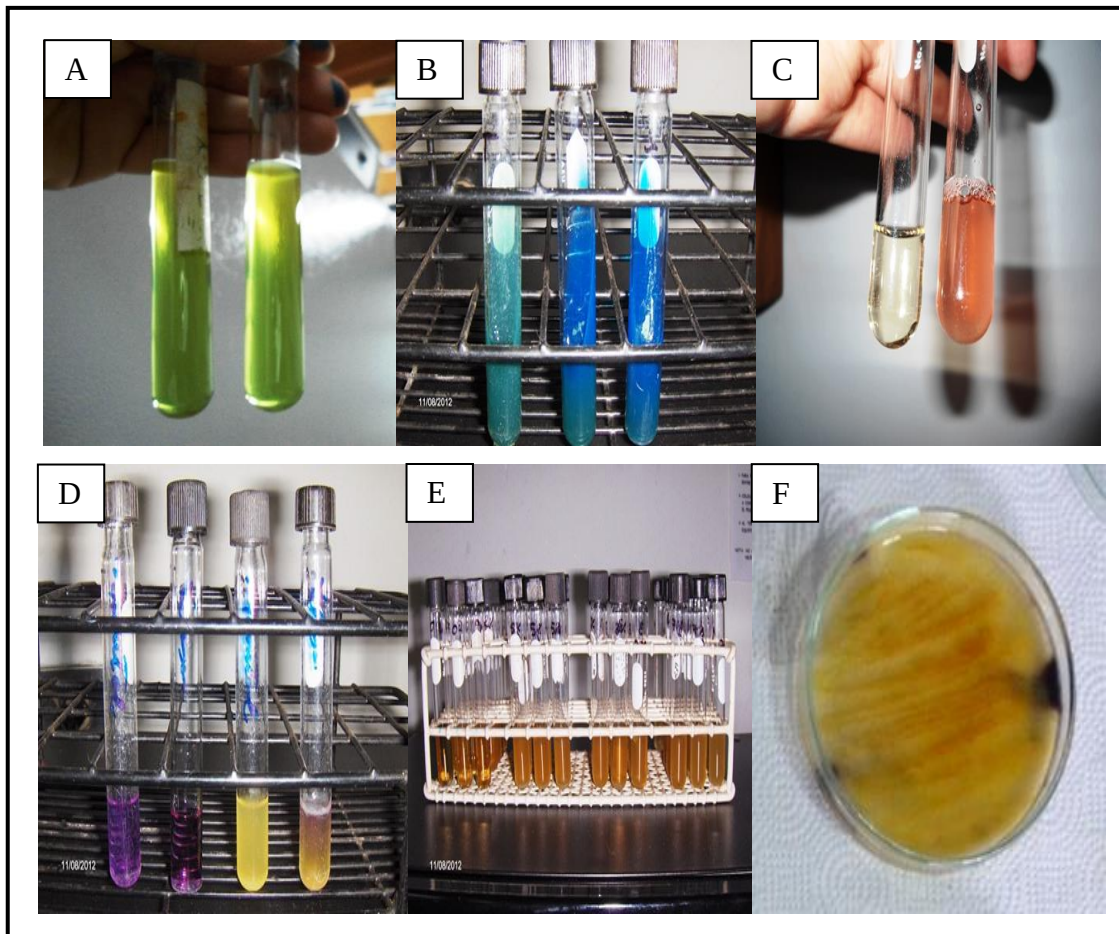


Figura 5. A) Prueba de Hugh y Leifson para determinar tipo de respiración de *B. subtilis*. B) Utilización de citrato (+). C) Voges Proskeaur (+). D) Producción de ácido a partir: Manitol (+), Xylosa (+). E) Tolerancia a sales al 3, 5 y 7%. F) Hidrólisis de almidón (+).

Pruebas de enfrentamiento entre *Phytophthora capsici* L. y *Trichoderma* spp.

Como se aprecia en los cuadro 5 y 6 todos los aislamientos de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento y la esporulación de *P. capsici* notándose diferencias significativas entre los tratamientos.

En la última evaluación a las 96 horas el aislamiento que presentó el mayor PIC del patógeno fue Tr12 (76,80%) y el menor PIC lo obtuvo el Tr17 (45,32%) (Cuadro 5 y Figura 6). Éstos valores fueron superiores a los obtenidos por Sid *et al.* (1999), quienes observaron *in vitro* inhibición del crecimiento de *P. capsici* con

T. harzianum en 38 – 53%. La tendencia de esta capacidad de inhibición de crecimiento se observó a las 24, 48 y 72 horas en la mayoría de los aislamientos. Por otra parte, Guzmán (2011), obtuvo un 59,42% como el mejor en inhibir el crecimiento de *P. palmivora* por *T. crassum*, valor que contrasta con los publicados por Labrador (2011) enfrentando los mismos microorganismo y obteniendo 26,2%, éstas diferencias podrían atribuirse a la producción de metabolitos volátiles y no volátiles con la propiedad de reducir el crecimiento *in vitro* del patógeno (Flores, 2008).

Se pudo observar que el aislamiento Tr12 (*T. harzianum*) tuvo una actividad antifúngica por encima del control, sobrecreciendo y reduciendo la colonia del patógeno. Es decir *T. harzianum* no sólo inhibió la expansión de *P. capsici* creciendo en su campo de acción, sino que a los cuatro días la colonia del patógeno *P. capsici* quedó totalmente reducida en comparación con el control (Figura 8), coincidiendo estos resultados con los encontrados por (Ezziyyani *et al.*, 2004c; Elad *et al.*, 1982; Malajczuk, 1983; Bara *et al.*, 2003) quienes demostraron que el proceso se lleva a cabo mediante metabolitos volátiles o solubles, los cuales reducen el crecimiento del patógeno, seguido de una vacuolación del contenido celular que eventualmente resulta en lisis de las hifas; *Trichoderma* eventualmente sobrecrece a *Phytophthora* y parasita sus hifas; la producción de antibióticos pueden influir fuertemente el proceso de antagonismo.

En ensayos *in vitro* realizados por Ezziyyani *et al.* (2004c), demostraron que *T. harzianum* tuvo un claro efecto antagónico sobre *P. capsici* en medio de cultivo PDA y PDA enriquecido con laminarina-glucosa, obteniendo el 55 y 67% de inhibición del patógeno, respectivamente, es decir, la intensidad de inhibición de *P. capsici* por *T. harzianum in vitro* varió según el medio de cultivo, la temperatura y pH.

Se observó una reducción superior al 45% en la producción de esporangios (PIE), destacándose el aislamiento Tr12 (Múcura II) con 88,17% (Figura 7), similar, a los valores obtenidos por Guzmán (2011) y Labrador (2011) de 72,72 y 77,24% respectivamente, al enfrentar *T. crassum* con *P. palmivora*. Por otra parte, el aislamiento que resultó menos efectivo en la evaluación de este parámetro fue

T17 (Tacarigua Dos) reportando un PIE de 45,10%. Los resultados obtenidos en la evaluación estadística ($p \leq 0,05$) mostraron diferencias significativas entre los distintos aislamientos donde se pudo detectar variaciones en el efecto inhibitorio que ejerció *Trichoderma* sobre la esporulación del patógeno.

En ésta investigación se observó mediante preparados microscópicos, la degradación y destrucción del micelio de *P. capsici* cuando se enfrentó al aislamiento Tr12, es decir, el micelio de *Trichoderma* penetró los esporangios de *Phytophthora* destruyéndolo por completo mediante lisis, Esto ha sido observado también por otros investigadores, quienes han descrito que el proceso de infección se lleva cabo mediante la excreción de enzimas líticas que incluyen β -1-3-glucanasas, proteinasas y quitinasas, las cuales degradan la pared celular del *P. capsici*; a nivel celular causan vacuolación, granulación, coagulación, desintegración y lisis. En el caso de Oomycetes, cuya pared celular contiene β -1-3-glucano y celulosa, se infiere que la β -1-3-glucanasas como la enzima principal en la lisis de la pared celular durante la acción micoparasítica (De la Cruz *et al.*, 1995; Stefanova *et al.*, 1999; Sid *et al.*, 1999).

Cuadro 5. Comparación de medias de PIC en los enfrentamientos de los aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *P. capsici*

Tratamiento	Aislamiento	PIC			
		Horas			
		24	48	72	96
1	Tr1	22,62 ab	28,53 bc	34,93 ghi	57,44 f
2	Tr2	22,03 ab	32,04 ab	37,00 fgh	58,79 ef
3	Tr3	7,14 ab	24,92 bcd	52,34 b	68,49 b
4	Tr4	29,77 ab	24,79 bcd	49,15 bc	66,40 bc
5	Tr5	22,03 ab	5,20 fgh	26,92 i	49,82 gh
6	Tr6	30,95 ab	12,51 defgh	42,86 cdefg	62,27 cde
7	Tr7	33,93 ab	12,48 defgh	42,86 cdefg	62,63 cde
8	Tr8	22,62 ab	13,34 defg	43,35 cdef	62,25 cde
9	Tr9	19,05 ab	8,04 efgh	41,29 cdefgh	60,91 def
10	Tr10	14,88 ab	21,32 bcde	33,82 hi	56,37 f
11	Tr11	30,95 ab	21,47 bcde	39,17 defgh	57,45 f
12	Tr12	6,55 ab	45,47 a	64,52 a	76,80 a
13	Tr13	14,88 ab	2,68 gh	37,02 fgh	58,81 ef
14	Tr14	30,95 ab	14,30 defg	45,50 bcde	64,36 bcd
15	Tr15	26,79 ab	16,85 cdef	46,50 bcd	65,00 bcd
16	Tr16	26,19 ab	30,28 bc	52,91 b	68,16 b
17	Tr17	19,05 ab	20,59 bcde	16,40 j	45,32 h
18	Tr18	41,67 a	22,27 bcd	38,08 efgh	49,48 gh
19	Tr19	41,67 a	24,09 bcd	35,94 fgh	50,14 g
20	Tr20	26,19 ab	11,55 defgh	35,45 fgh	57,44 f
21	Tr21	30,36 ab	28,50 bc	38,05 efgh	59,14 ef

Medias con una letra común no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey

($p \leq 0,05$)

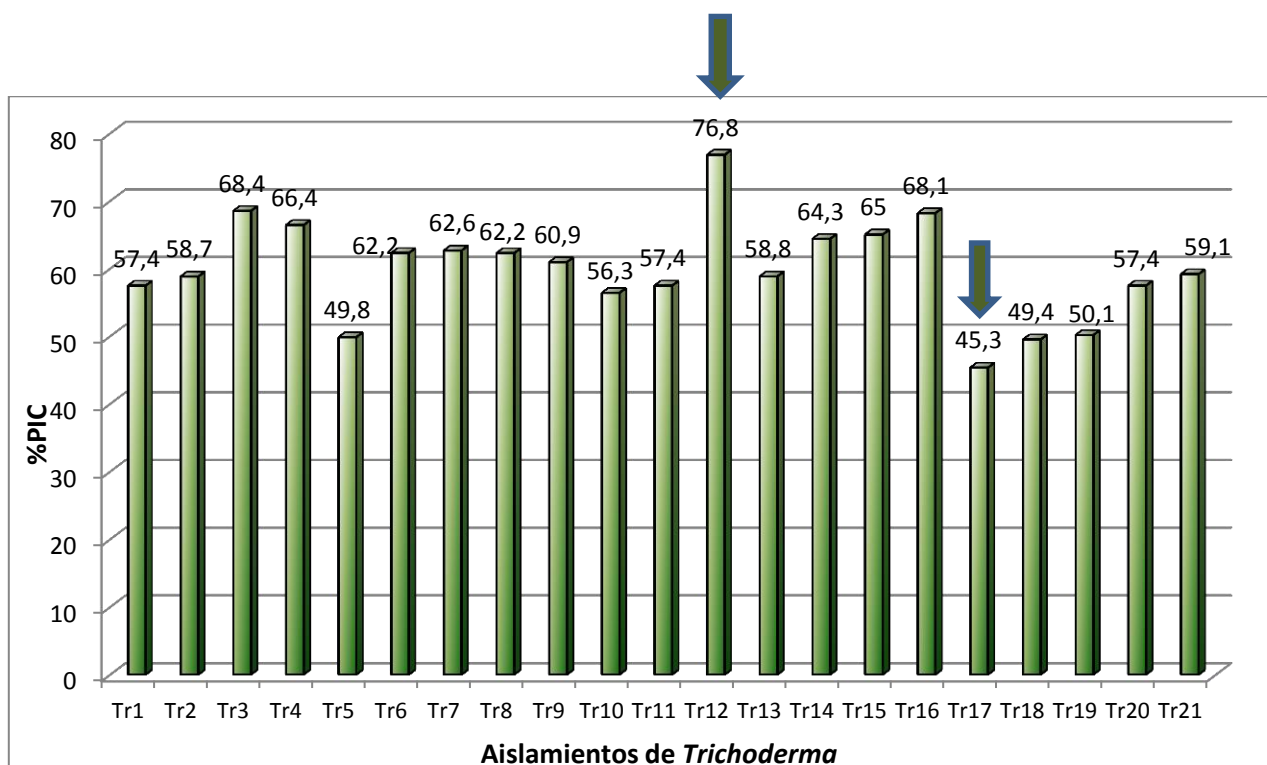


Figura 6. Porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) de *P. capsici* enfrentado con aislamientos de *Trichoderma* spp. al día 4 de la evaluación.

Cuadro 6. Comparación de medias de PIE en los enfrentamientos de los aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *P. capsici*

Tratamiento	Aislamiento	Esporangios	PIE (%)
1	Tr1	8800	67,45 bcd
2	Tr2	8400	69,04 abcd
3	Tr3	4800	82,25 ab
4	Tr4	7600	71,42 abc
5	Tr5	12800	53,04 cde
6	Tr6	8800	67,09 bcd
7	Tr7	8400	68,96 abcd
8	Tr8	8000	70,43 abc
9	Tr9	7600	71,98 abc
10	Tr10	8400	68,96 abcd
11	Tr11	8000	70,43 abc
12	Tr12	3200	88,17 a
13	Tr13	9200	66,46 bcd
14	Tr14	7200	73,09 abc
15	Tr15	6000	78,09 ab
16	Tr16	5200	80,79 ab
17	Tr17	14800	45,10 e
18	Tr18	13600	49,90 de
19	Tr19	11600	56,77 cde
20	Tr20	10000	62,73 bcde
21	Tr21	8800	67,09 bcd

Medias con una letra común no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)

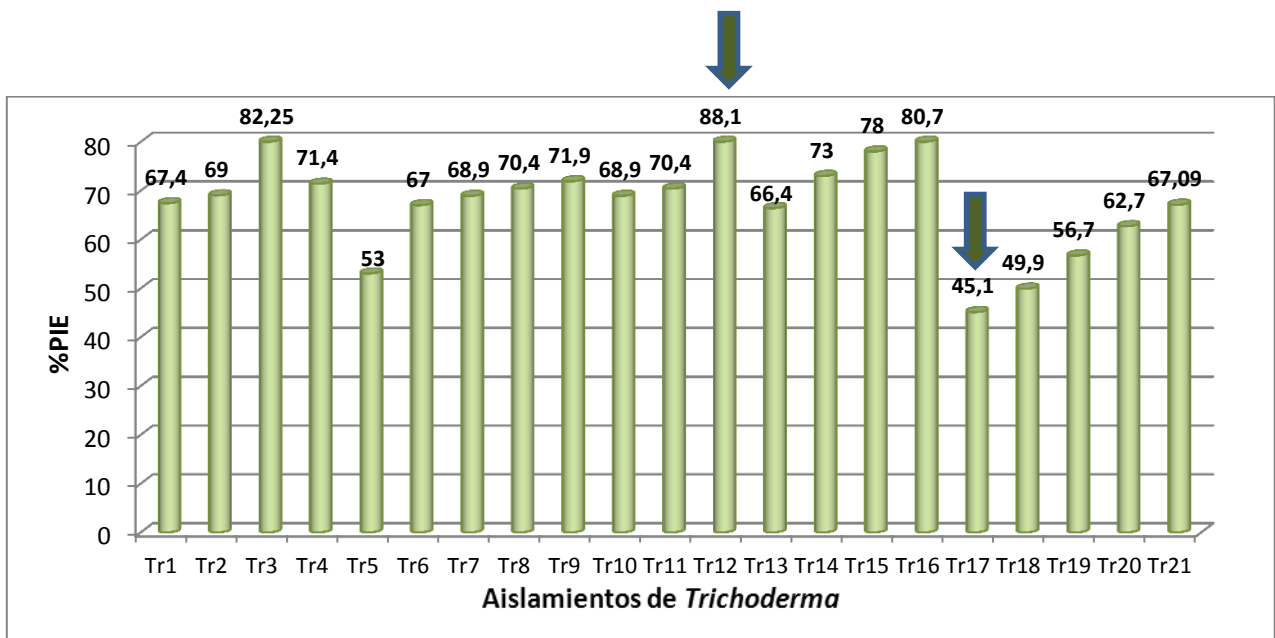


Figura 7. Porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) de *P. capsici* enfrentado con aislamientos de *Trichoderma* spp. al día 4 de la evaluación.

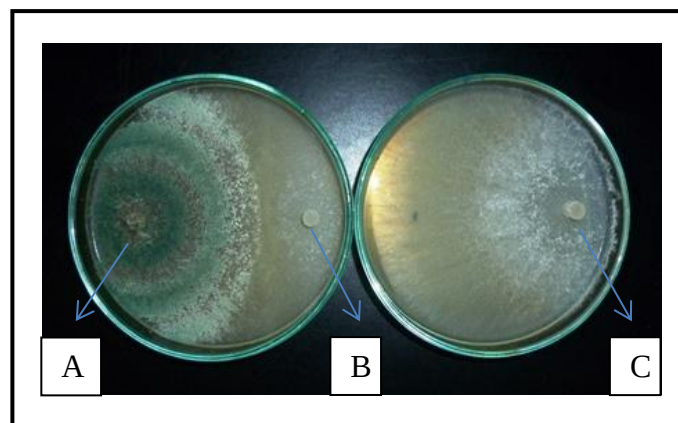


Figura 8. Cultivo dual entre *T. harzianum* (A) y *P. capsici* (B); Testigo= *P. capsici* (C).

Prueba de confrontación entre *Phytophthora capsici* L. y *Bacillus* spp.

Como se aprecia en los cuadros 7 y 8 todos los aislamientos de *Bacillus* inhibieron el crecimiento y esporulación de *P. capsici* notándose diferencias significativas entre los tratamientos.

Se registró el mayor y menor PIC ($p \leq 0,05$) en los tratamientos. El aislamiento que produjo el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno fue B1 (67,22%) y menor B7 (33,88%) a las 96 horas respectivamente (Figura 9), siendo éstos valores muy superiores o similares a los reportados por otros investigadores. Lagunas *et al.* (2001) demostraron que tres cepas de *Bacillus*, redujeron significativamente ($p = 0.05$) el crecimiento micelial de *P. capsici in vitro*, es decir, *Bacillus* inhibió de 33,8 – 41% el crecimiento del patógeno. Por otro lado, Labrador (2011) al enfrentar *Bacillus subtilis* ante *P. palmivora* reportó un PIC de 17,2%, valor que contrasta con los obtenidos por Ros *et al.* (2008), al obtener un aislado del género *Bacillus* (C4) capaz de inhibir el crecimiento micelial en un 90.4 % enfrentadas *in vitro* ante *Phytophthora nicotianae*. La tendencia de esta capacidad de inhibición de crecimiento se observó a las 24, 48 y 72 horas en la mayoría de los aislamientos.

De 64 cepas de *B. thuringiensis* probadas por Mojica *et al.* (2009), 19 cepas resultaron ser buenas antagonistas contra *P. capsici*, produciendo porcentajes de inhibición del 15,14 al 27,80% (para las cepas HD-193 y GM-66, respectivamente), y una reducción en la tasa de crecimiento de entre 2,86 a 1,26 cm/día.

Akgül y Mirik (2008), evaluaron *in vitro* cepas de *B. megaterium* contra *P. capsici*, resultando tres las más efectivas en inhibir al patógeno de 2 – 12,3 mm respectivamente en las zonas de inhibición.

Constanza *et al.* (2011), evaluaron mediante pruebas de antagonismo *in vitro* diferentes aislamientos del género *Bacillus* frente a *Fusarium* spp., donde B1 (*B. liqueniformis*) y B2 (*B. subtilis*) presentaron entre el 70-100% de inhibición del crecimiento del patógeno y B14 (*B. megaterium*) y E2 (*B. brevis*) entre 40-69%.

Hernández *et al.* (2006), analizaron la bioeficacia de cinco cepas de *Bacillus* spp. contra el hongo *Alternaria dauci* en el cultivo de zanahoria y en pruebas *in vitro*,

revelaron que las cepas de *Bacillus* presentaron un efecto inhibitorio significativo ($P = 0,05$) en el crecimiento micelial de *A. dauci*. El mayor efecto inhibitor (53.44%) fue observado con la cepa B1 (*B. subtilis*), la cual resultó estadísticamente superior que las demás.

Investigadores como Talavera *et al.* (1998), plantean que el proceso de selección de bacterias antagonistas *in vitro* se considera el paso más difícil en el desarrollo de un candidato promisorio para el control biológico de enfermedades. García (2005), plantea una escala que solamente se considera como tóxica, las cepas que inhiban el 100% del crecimiento del patógeno. De esta manera el resto de las cepas se consideran ligeramente tóxicas (79 -30%).

En cuanto a la inhibición de la esporulación, en esta investigación se observó una reducción superior al 30% en la producción de esporangios (PIE), destacándose el aislamiento del B1 (Ruiz Pineda) con 87,67% (Figura 10), éste valor supera al obtenido por Labrador (2011) de 70,65%, al enfrentar *B. subtilis* con *P. palmivora*.

Los resultados obtenidos en la evaluación estadística ($p \leq 0,05$) mostraron diferencias significativas entre los distintos aislamientos donde se puede detectar variaciones en el efecto inhibitorio que ejerció *Bacillus* sobre la esporulación del patógeno (Cuadro 8).

Se pudo observar el halo de inhibición producido por el aislamiento B1 (Ruiz Pineda), siendo éste mayor en comparación a los demás (Figura 11). Según señala Fernández – Larrea (2001), es posible que el mecanismo ejercido por la bacteria B1, fue el de antibiosis, debido a la producción de metabolitos secundarios, los cuales pueden ser volátiles o difusibles, pero que en cualquiera de los casos, sin entrar en contacto físico con el patógeno, pueden inhibir o restringir su crecimiento. Los mismos autores documentaron que en especies de *B. subtilis*, se ha registrado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. También, se logró observar al microscopio que *B. subtilis* afectó las estructuras de *P. capsici* produciendo lisis en sus hifas, por lo que, éste efecto puede deberse a varios mecanismos como inducción de resistencia pero fundamentalmente en la

antibiosis y competencia por el espacio o los nutrientes (Ezziyyani *et al.*, 2011).

Es bien conocido que el género *Bacillus* se encuentra integrado por bacterias endosporadas con alto potencial biocontrolador contra patógenos foliares, incluso contra *Phytophthora capsici*, agente causal de la mazorca negra del cacao, entre otras enfermedades en diferentes cultivos (Melnick *et al.*, 2008).

Cuadro 7. Efecto inhibitorio de aislamientos de *Bacillus* spp. en el crecimiento de *P. capsici* enfrentados por el método de cultivos duales

Tratamiento	Aislamiento	PIC			
		Horas			
		24	48	72	96
1	B1	23,89 ab	34,27 ab	55,81 a	67,22 a
2	B2	16,92 abcd	13,90 efghi	26,51 efg	44,02 fgh
3	B3	12,39 abcd	11,64 ghij	32,05 de	49,27 def
4	B4	8,24 bcd	24,36 bcde	49,15 ab	62,26 ab
5	B5	5,48 cd	22,06 cdefg	45,30 bc	59,41 bc
6	B6	8,47 bcd	8,11 hijk	21,85 fgh	42,01 ghi
7	B7	9,26 bcd	17,42 defgh	10,93 i	33,88 j
8	B8	15,95 abcd	41,18 a	44,49 bc	58,75 bc
9	B9	13,96 abcd	12,13 ghi	33,52 de	50,66 de
10	B10	16,10 abcd	4,06 ijk	30,41 def	48,35 defg
11	B11	28,71 a	29,05 bc	52,29 ab	64,63 ab
12	B12	17,08 abcd	1,15 jk	17,88 ghi	39,11 hij
13	B13	18,99 abc	26,13 bcd	47,57 abc	61,14 ab
14	B14	17,07 abcd	28,46 bc	51,91 ab	64,33 ab
15	B15	20,98 abc	26,74 bcd	50,79 ab	63,48 ab
16	B16	17,29 abcd	6,41 ijk	26,13 efg	45,22 efgh
17	B17	25,60 ab	17,42 ijk	31,58 de	49,22 def
18	B18	18,18 abcd	28,50 bc	38,68 cd	54,48 cd
19	B19	19,13 abc	23,85 bcdef	22,19 fgh	42,31 ghi
20	B20	25,74 ab	13,38 fghi	15,17 hi	37,11 ij

Medias con una letra común no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (p<= 0,05)

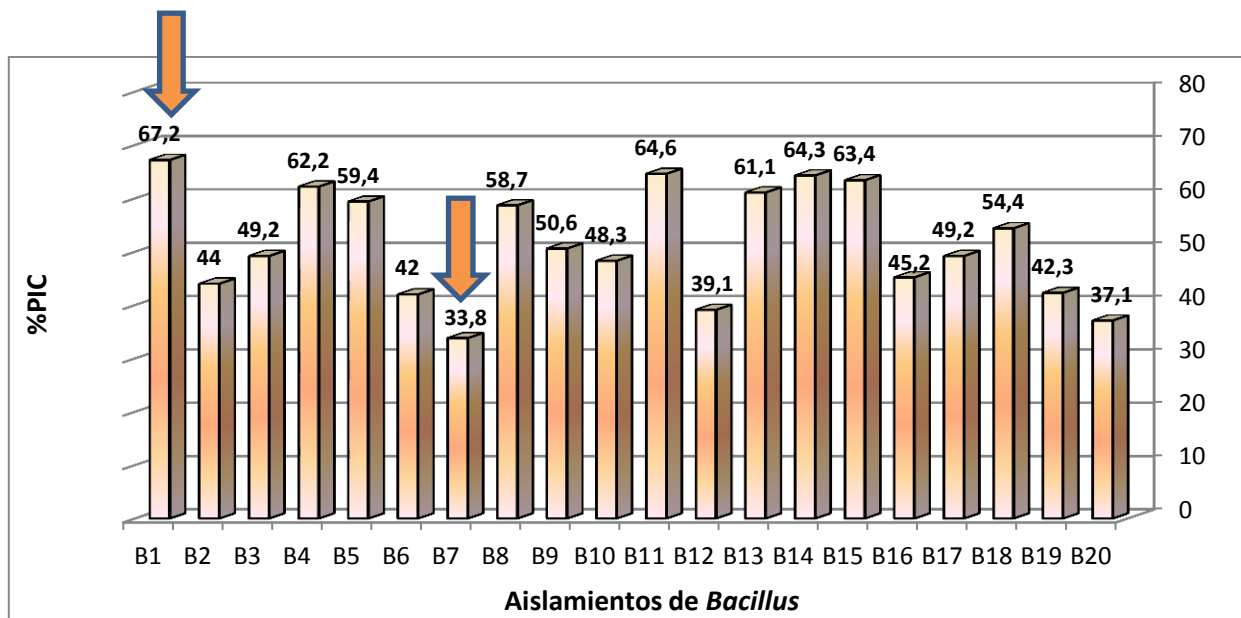


Figura 9. Porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) de *P. capsici* enfrentado con aislamientos de *Bacillus* spp. al día 4 de la evaluación.

Cuadro 8. Comparación de medias de PIE en los enfrentamientos de los aislamientos de *Bacillus* spp. contra *P. capsici*

Tratamiento	Aislamiento	Esporangios	PIE (%)
1	B1	2800	87,67 a
2	B2	14400	35,03 bcde
3	B3	12000	46,15 bcde
4	B4	9200	58,40 b
5	B5	11200	49,64 bcde
6	B6	15600	29,98 e
7	B7	15600	30,20 e
8	B8	11600	47,72 bcde
9	B9	12800	41,95 bcde
10	B10	13200	40,39 bcde
11	B11	10000	55,27 bcd
12	B12	14800	32,6 de
13	B13	10400	53,49 bcde
14	B14	9600	56,97 bc
15	B15	10000	54,69 bcd
16	B16	14800	33,1 cde
17	B17	11600	47,85 bcde
18	B18	11200	49,64 bcde
19	B19	15200	31,7 de
20	B20	15600	29,98 e

Medias con una letra común no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)

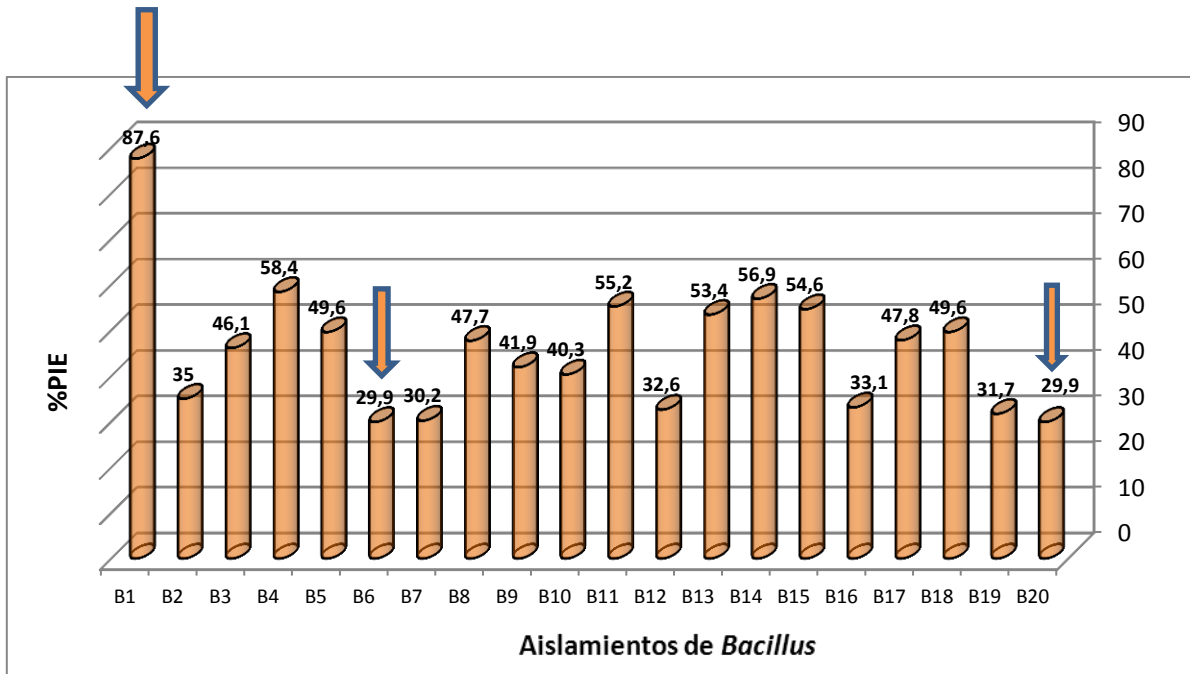


Figura 10. Porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) de *P. capsici* enfrentado con aislamientos de *Bacillus* spp. al día 4 de la evaluación.

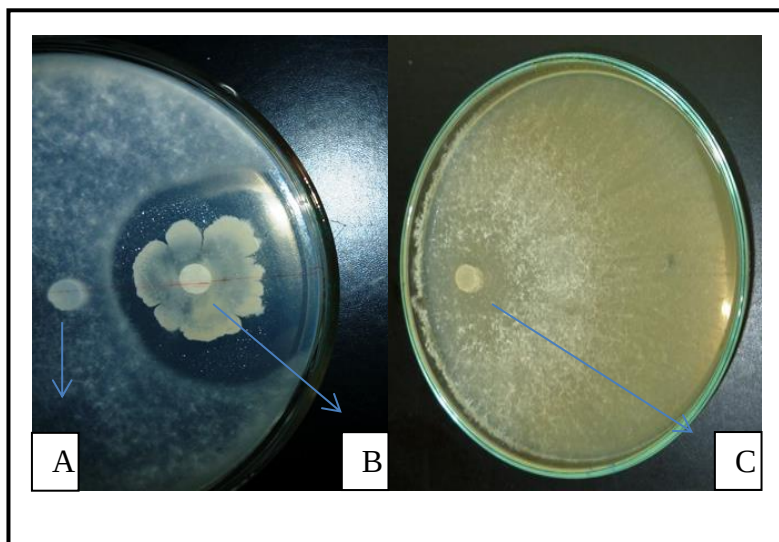


Figura 11. Cultivo dual entre *P. capsici* (A) y *B. subtilis* (B); Testigo= *P. capsici* (C).

Para continuar con la investigación se seleccionaron los aislamientos *T. harzianum* proveniente de Múcura II (Tr12) y *B. subtilis* proveniente de Ruiz Pineda (B1), ya

que presentaron los mayores porcentajes de inhibición de crecimiento (PIC) y de esporulación (PIE) del patógeno.

Evaluación de la capacidad biocontroladora de un aislamiento de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* para el control de *Phytophthora capsici* en condiciones de umbráculo.

Una vez realizado el transplante se efectuaron observaciones diarias que permitieron determinar el establecimiento del cultivo y el descarte de aquellas plantas muertas por efecto del estrés producido durante el transplante, en todos los tratamientos.

Porcentaje de Incidencia de la enfermedad

Transcurridos 7 días después del transplante, en plantas de los diferentes tratamientos inoculadas con el patógeno y antagonistas se observaron síntomas de la enfermedad como marchitez y sobre el tallo se observó una necrosis, causando en algunos casos la muerte de la planta (Figura 12), realizando los respectivos aislamientos para confirmar la presencia del patógeno *Phytophthora capsici* Leonian.



Figura 12. Plantas con síntomas de marchitez por *P. capsici* (a) y plantas sanas (b)

Los resultados de incidencia y reducción de la marchitez en plantas de pimentón se muestran en el Cuadro 9. Los tratamientos por cada antagonista y con la combinación de *T. harzianum* y *B. subtilis* fueron eficientes frente a *P. capsici*, bajo condiciones de umbráculo comparado con el control positivo (T9), donde las plantas sin protección inoculadas con *P. capsici* produjo el 90% de la enfermedad. La máxima reducción de la enfermedad, se logró cuando las raíces fueron tratadas con la combinación de los antagonistas seleccionados (*T. harzianum* + *B. subtilis*) y aplicación semanal de los mismos, consiguiendo una reducción de 60 y 70% en los tratamientos T5, T6 Y T11 (Figura 13), en investigaciones realizadas con otros géneros de bacterias antagonistas encontraron resultados favorables, como Ezziyyani, *et al.* (2011), quienes demostraron *in vivo* que el tratamiento con la combinación *Burkholderia cepacia* + *T. harzianum* + suelo de plantación, fue capaz de reducir hasta un 84% la marchitez causada por *P. capsici* en plantas de pimentón; también, Akgül y Mirik (2008), obtuvieron como mejor tratamiento la triple combinación de cepas de *B. megaterium* para el control del patógeno en el cultivo estudiado, con un 73,2% en reducción de la enfermedad. En invernadero y campo, la presencia de diferentes asociaciones de antagonistas disminuyó la incidencia de la marchitez del pimentón, en comparación con el testigo (Bautista, *et al.*, 2010), por ello, la relación que se establece entre los antagonistas en estudio: *T. harzianum* y *B. subtilis* puede ser definido como una simbiosis antagónica, por lo que son compatibles para ser usados juntos frente al patógeno *P. capsici*, tal como fue demostrado *in vitro* e *in vivo* por Santander (2012) para la reducción de *Colletotrichum gloeosporioides* en mango. La aplicación semanal de antagonistas correspondiente a cada tratamiento tuvo un efecto positivo en el % de reducción de la enfermedad en T1 (45,56%), T2 (50%), T5 (60%), T6 (70%) y T11 (70%), lo cual difiere a lo reportado por Lagunas *et al.* (2001), donde la aplicación semanal de *Bacillus* a tratamientos inoculados con *P. capsici* en suelo esterilizado y no esterilizado, no tuvo ningún efecto en la severidad y número de plantas muertas.

De acuerdo a las temperaturas (22 °C – 45 °C) y humedades relativas (40 % - 100 %) obtenidas en el umbráculo durante el ensayo y con la humedad en el suelo debido al riego frecuente (diarios), favoreció el establecimiento y desarrollo *P. capsici*, eso explica la incidencia de la enfermedad ocasionada por este patógeno, datos comparables a los obtenidos por Saldarriaga (2007), en donde problemas de acumulación de humedad causó la muerte de alrededor de 1300 plantas de pimentón por pudrición del tallo (*Phytophthora* spp.), en cierta zona del invernadero ubicado en el Asentamiento Campesino Santa María, estado Aragua. La temperatura óptima de desarrollo del oomiceto oscila entre 21 y 31 °C, con una disminución drástica a partir de esa temperatura (Alfaro y Vegh, 1971). En tal sentido coincide Schlub (1983), al afirmar que el mayor número de infecciones se obtienen a 23 °C, siendo éstas muy reducidas a 15 y 31 °C. Ahondando en estos parámetros, Malaguti y Pontis (1950) señalan como la gama de temperaturas más favorables a *P. capsici*, la comprendida entre 22 y 29 °C. Newhook *et al.*, (1978) establecen como característica importante en su clave de diferenciación de las especies de *Phytophthora* el buen crecimiento de *P. capsici* a temperaturas superiores a 35 °C.

Cuadro 9. Porcentaje de incidencia y de reducción de incidencia de la marchitez en plantas de pimentón.

Tratamiento	% de incidencia	% de reducción de incidencia
T1 (S.p con Tr12)+Tr12+Phy+s	44,44	45,56
T2 (S.p con B1)+B1+Phy+s	40	50
T3 (S.p con Tr12)+Phy	55,56	34,44
T4 (S.p con B1)+Phy	60	30
T5 (S.p con Tr12)+Tr12+B1+Phy+s	30	60
T6 (S.p con B1)+Tr12+B1+Phy+s	20	70
T7 (S.p con Tr12)+ADE	0	
T8 (S.p con B1)+ADE	0	
T9 ADE+Phy	90	-
T10 ADE+ADE	0	
T11 (S.p con Tr12+B1)+Tr12+B1+Phy+s	20	70
T12 (S.p con Tr12+B1)+Tr12+B1+s	0	

% de reducción de incidencia = % de incidencia del testigo (T9= ADE+Phy) - % de incidencia del respectivo tratamiento.; S.p.: Semilla protegida; Tr12 = *T. harzianum*; B1 = *B. subtilis*; Phy = *P. capsici*; s=Aplicaciones semanales

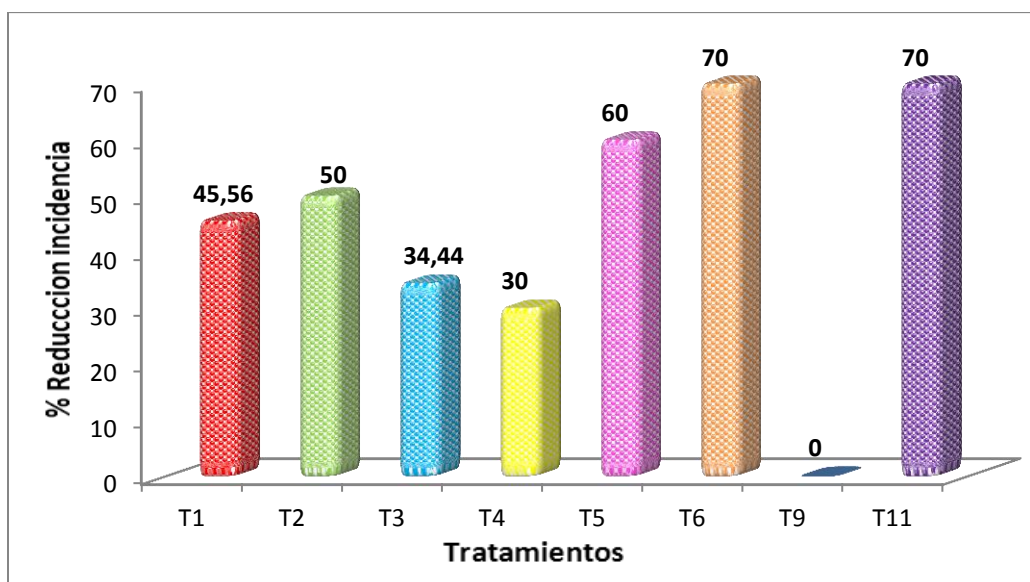


Figura 13. Porcentaje de reducci3n de la incidencia de marchitez al aplicar diferentes tratamientos con *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*

Respuesta de la planta a la aplicaci3n de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* para el control de *Phytophthora capsici* en condiciones de umbr3culo.

Al realizar el an3lisis estad3stico se encontr3 que los resultados de las variables de la parte a3rea (altura, peso fresco, peso seco, n3mero de flores) y radical de la planta (peso fresco, peso seco, volumen), cumplieron con los supuestos del an3lisis de varianza, observando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) y realizando la comparaci3n de sus medias mediante la prueba de Tukey (Cuadro 10 y 11).

El an3lisis de varianza para las variables altura y peso fresco de la parte a3rea de las plantas inoculadas, mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, obteni3ndose el mejor resultado al aplicar la combinaci3n de *T. harzianum* + *B. subtilis* en el semillero, en el transplante y semanalmente en presencia de *P. capsici* (T11), seguido del tratamiento donde se aplic3 la combinaci3n de *T.*

harzianum + *B. subtilis* en el semillero, transplante, y semanalmente pero sin presencia de *P. capsici* (T12), con valores de 50,50 cm y 50,40 cm, respectivamente, en relación con el testigo donde sólo se aplicó el patógeno (T9) que alcanzó una altura de 20,90 cm, mientras que para la variable peso fresco, los mejores tratamientos fueron los mismos, con valores de 43,18 g y 41,13 g respectivamente, en comparación con el testigo de 7,44 g; igualmente, hubo diferencias significativas entre los tratamientos para peso seco y número de flores, conservando la tendencia, es decir: T11 (5,78 g), T12 (5,51g) respecto a T9 (0,60 g) y T11 (13,60), T12 (13,00), en comparación al testigo (1,50), respectivamente.

Se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos para peso fresco de la raíz, observando los mayores incrementos en T2 (12,15 g), T5 (11,02 g), T11 (10,53 g) y T12 (10,00 g) con relación a T9 (4,09 g). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para peso seco de la raíz, sin embargo, las plantas obtenidas de semillas protegidas con *B. subtilis*, en el momento del transplante y semanalmente, en presencia del patógeno (T2), como también, las plantas obtenidas de semillas protegidas con la combinación de *T. harzianum* + *B. subtilis*, en el momento del transplante y semanalmente, en presencia de *P. capsici* (T11), presentaron los mayores incrementos de 2,38 g y 2,33 g, respectivamente, observando un valor inferior de 0,97 g en el tratamiento donde sólo se aplicó el patógeno (T9). Se encontraron diferencias significativas para el volumen de raíces entre los tratamientos T12 (16,17 mL) y T11 (15,80 mL) respecto a T9 (3,25 mL).

Dentro de este contexto, además se observó que todos los tratamientos a los cuales se aplicaron los antagonistas bajo diferentes modalidades presentaron una mejor respuesta, en relación a los tratamientos que no recibieron ninguna aplicación.

En cuanto a las variables de la parte aérea de la planta (Cuadro 10) como altura, peso fresco, peso seco y número de flores, el mayor incremento fue observado en los tratamientos T11 y T12 cuando se empleó semilla protegida con la combinación de *T. harzianum* + *B. subtilis*, aplicación de *T. harzianum* + *B. subtilis* en el momento y después del transplante (semanal) a concentraciones de 10^6

con/mL + 10^8 ufc/mL, respectivamente, en suelo con el patógeno (T11), seguido del tratamiento donde se aplicó la misma metodología pero en suelo sin el patógeno (T12). Resultados comparable con los reportados por Izzeddin y Medina (2011), quienes observaron que plántulas de semillas de pimentón tratadas con microorganismos antagonistas posterior a la infección del patógeno, presentaron una longitud mayor que aquellas que fueron infectadas y no tratadas, favoreciendo la germinación y crecimiento de las plántulas. Igualmente, Hernández *et al.* (2006), obtuvieron mayores alturas en plantas de zanahorias cuando aplicaron cepas del género *Bacillus*, para el control de *Alternaria dauci*, B9 (33,53 cm) seguido por la mezcla de cinco cepas (33,05 cm). Los efectos estimuladores de algunas cepas bacterianas sugieren que posiblemente existe un sinergismo entre el hospedante y los simbioses, lo que permite una mejor absorción de elementos esenciales como N y P, los cuales al interactuar con las fitohormonas que excretan las raíces tienen una acción potenciadora sobre el desarrollo aéreo del cultivo.

Trichoderma spp. ha demostrado ser uno de los antagonistas más eficientes tanto para el control de patógenos del suelo y en cultivos, así como para la estimulación de la planta por el mecanismo responsable de la actividad antagónica en la parte subterránea de la misma, *T. harzianum* induce a una reacción de resistencia sistémica frente a patógenos, lo cual se traduce en reducción de la necrosis causada por algunos microorganismos como: *P. capsici* y *A. alternata* (Sid *et al.*, 1999). Por otra parte, Fernández *et al.* (2007), realizaron un manejo biológico de *P. capsici* y señalaron que el hecho que las plantas de tomate de los tratamientos Bio (*Bacillus subtilis*) y End (hongos micorrícicos arbusculares) hayan tenido un ligero incremento en altura y biomasa seca total, estadísticamente no significativo, con respecto a cuándo éstos se inocularon en combinación con otro bioproducto [Bio + End, End + T22 (*Trichoderma harzianum*), End + 343 (Bacterias benéficas)], quizás pueda deberse a una posible competencia entre ambos microorganismos por las fuentes de carbonos exudados por las raíces, o bien, por el espacio en la rizósfera de las planta.

Para las variables de la raíz (Cuadro 11) el mejor tratamiento en cuanto al peso fresco y peso seco se logró con el tratamiento T2 (semilla protegida con *Bacillus* y

aplicación del antagonista en el momento y después del transplante, en suelo con el patógeno), esto se puede atribuir al hecho que las bacterias promotoras de crecimiento en las plantas pueden ejercer su efecto estimulante mediante la producción de sideróforos extracelulares que secuestran óxidos férricos para convertirlos en forma disponibles para las raíces, lo cual incrementa el volumen radical (Dudgale *et al.*, 1993). También se menciona que las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son las más destacadas en la conversión de compuestos inorgánicos insolubles de fósforo $[\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2]$ que no están totalmente disponibles en el suelo para las plantas, en fosfatos di y monobásicos siendo esto las formas asimilables por las raíces (Bautista *et al.*, 2003; Strandberg, 1992). Cabe señalar, que los tratamientos T5, T11 y T12 (semillas protegidas y aplicación de la combinación de *T. harzianum* + *B. subtilis* en el momento y después del transplante en suelo con el patógeno) mostraron un efecto estimulador respecto al volumen de las raíces por la acción de los antagonistas, resultados comparable con lo señalado por otros autores, los cuales reportan incrementos en longitud de la raíz, en tratamientos donde aplicaron 5 cepas de *Bacillus* spp. por separado y la combinación de las mismas en plantas de zanahoria (Hernández *et al.*, 2006), éste efecto de la combinación de cepas es posible por cuanto *T. harzianum* y *B. subtilis* son compatibles entre sí y estos antagonistas interfieren en la supervivencia y el desarrollo del patógeno *P. capsici*. Asimismo, *B. subtilis* produce antibiosis y *T. harzianum* ejerce competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y lisis enzimática (Ezziyyani *et al.*, 2011). También, Harman *et al.* (2004) señalan la existencia de diversos mecanismos de acción, donde se producen una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en la planta inducidos por los microorganismos que interactúan en la misma y que van a depender de una serie de factores. Igualmente, Lagunas *et al.* (2001), señalaron que el tratamiento de semillas de tomate cv Río Grande con *Bacillus* estimuló la germinación en un 35%, el volumen de raíz y peso seco del follaje se incrementaron en 87 y 84% respectivamente, en comparación con el testigo. La combinación del tratamiento a la semilla con adición de bacterias endofíticas en hojas de plantas y al suelo, puede incrementar la colonización por estas bacterias

y potenciar sus beneficios (Hallmann *et al.*, 1997). Weste *et al.* (1976) observaron que en suelos con mayores cantidades de microorganismos, el porcentaje de enfermedad causado por *Phytophthora* disminuía. Las aplicaciones semanales de los antagonistas por separado y combinados pudieron haber asegurado la presencia continua de los microorganismos en la rizósfera del pimentón.

Se ha sugerido que para desarrollar un control biológico eficaz, se debe seleccionar y utilizar una mezcla de varios antagonistas con un amplio espectro de actividad de biocontrol, cada uno de ellos con diferentes estrategias de colonización, mecanismos de supresión, temperaturas óptimas de crecimiento, pH óptimos, condiciones de humedad y con capacidad para suprimir a diferentes patógenos (Duffy y Weller, 1995; Leeman *et al.*, 1997; Mathre *et al.*, 1999). Así mismo, el control biológico de *P. capsici* puede realizarse utilizando una mezcla de diferentes antagonistas, a los cuales deberá proveérseles las condiciones idóneas para que sus poblaciones se incrementen y aumenten su potencial antagónico, a través de incorporación de materia orgánica, humedades relativas óptimas, labores culturales y riegos adecuados (Lagunas *et al.*, 2001).

Cuadro 10. Efecto de la aplicación de los antagonistas (*T. harzianum* y *B. subtilis*) para el control de *Phytophthora capsici* sobre la parte aérea en plantas de pimentón variedad Cacique Gigante.

Tratamiento	Atura de la planta (cm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	N° flores
T1	39,50 b	36,14 abc	5,13 abc	11,67 ab
T2	38,10 bc	39,71 ab	5,12 abc	11,30 ab
T3	34,67 bc	23,13 cd	3,90 bcd	8,78 ab
T4	33,60 bc	23,98 cd	4,09 abcd	8,40 b
T5	40,10 b	33,37 abcd	4,13 abcd	10,50 ab
T6	39,90 b	32,46 abcd	4,84 abc	9,80 ab
T7	32,22 c	22,10 d	2,80 d	9,78 ab
T8	34,95 bc	22,04 d	2,86 d	8,70 ab
T9	20,90 d	7,44 e	0,60 e	1,50 c
T10	34,56 bc	26,76 bcd	3,40 cd	10,67 ab
T11	50,50 a	43,18 a	5,78 a	13,60 a
T12	50,40 a	41,13 a	5,51 ab	13,00 ab

Medias con una letra común no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (p<= 0,05)

Cuadro 11. Efecto de la aplicación de los antagonistas (*T. harzianum* y *B. subtilis*) para el control de *Phytophthora capsici* sobre raíz de plantas de pimentón variedad Cacique Gigante.

Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Volumen de la raíz (mL)
T1	9,48 abc	2,22 a	10,44 bcde
T2	12,15 a	2,38 a	12,55 abc
T3	7,24 abcd	2,26 a	7,70 def
T4	6,53 bcd	1,06 a	6,83 def
T5	11,02 ab	1,78 a	14,10 ab
T6	7,33 abcd	1,95 a	10,88 bcd
T7	3,82 d	0,99 a	6,06 ef
T8	3,85 d	1,11 a	7,35 def
T9	4,05 d	0,97 a	3,25 f
T10	4,48 cd	1,46 a	7,94 cdef
T11	10,53 ab	2,33 a	15,80 a
T12	10,00 ab	1,82 a	16,17 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)

La utilidad de estos resultados constituye la base para el empleo de una combinación de antagonistas, que se han seleccionado con diferentes potencialidades biológicas. Ello facilitará el diseño de las estrategias futuras de un eficaz control biológico de *P. capsici* en el suelo y posiblemente su difusión para ser usado en el control de otros patógenos.

CONCLUSIONES

- El oomiceto aislado a partir de plantas de pimentón con síntomas de marchitez en plantas muertas provenientes de Múcura II, estado Aragua corresponde a la especie *Phytophthora capsici* Leonian, confirmándose su patogenicidad.
- Se seleccionó Tr12 (*Trichoderma harzianum*) de Múcura II y B1 (*Bacillus subtilis*) de Ruiz Pineda por presentar los mayores valores de PIC (76,80 y 67,22%) y PIE (88,17 y 87,67%), respectivamente, para realizar diferentes pruebas en umbráculo.
- Tanto en la aplicación individual como combinada de los antagonistas, estos fueron eficientes para el control de *P. capsici* en condiciones de umbráculo comparado con el testigo inoculado.
- El mejor tratamiento fue con la combinación de *T. harzianum* (10^6 con/mL) + *B. subtilis* (10^8 ufc/mL) en los tres momentos de aplicación, logrando reducir la incidencia de marchitez un 70% y alcanzando incrementos significativos en las variables vegetativas: altura de planta (50,50 cm), peso fresco (43,18 g) y seco (5,78 g) de la parte aérea, así como peso fresco (10,53 g), peso seco (2,33 g) y volumen (15,80 mL) de la porción radicular.

RECOMENDACIONES

- Evaluar a nivel *in vitro* la interacción y compatibilidad de la combinación de dos o más antagonistas para el control de fitopatógenos.
- Debido al excelente comportamiento de los antagonistas (*Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*) en el control de *Phytophthora capsici* en pimentón, es recomendable su uso en plantaciones comerciales e inclusión en futuros programas de manejo integrado del cultivo.

REFERENCIAS CONSULTADAS

- AGRIOS G. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. London, UK. 922 p.
- AHMAD L. S. and R. BAKER. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology. 77: 182 – 189.
- AIT-LAHSEN H., A. SOLER, M. J. REY, J. DE LA CRUZ, E. MONTE and A. LLOBELL. 2001. An antifungal Exo- α -1, 3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 67: 5833 – 5839.
- ALFARO A. y I. VEGA. 1971. La “Tristeza” o “Seca” del pimiento producida por *Phytophthora capsici* Leonian. Ann. INIA. Ser. Prot. Vegetal. 1: 9 – 42.
- ANGELONI M. 2004. “Bacterias *Bacillus subtilis* nativas del departamento Comandante Fernández como factor de control biológico frente al hongo patógeno *Rhizoctonia solani* en el cultivo del algodón”. [Http://www.inta.ar/saenzpe/fitopatologia/tesis_de_licenciatura.pdf](http://www.inta.ar/saenzpe/fitopatologia/tesis_de_licenciatura.pdf) (Julio, 2011).
- AKGÜL D. and M. MIRIK. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. Journal of Plant Pathology. 90: (1) 29 – 34.
- ARAUZ, L. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. 1 ed. San José C. R. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 472 p.
- BARA F., A. LLIMA, L. ULHOA and J. CIRANO. 2003. Purification and characterization of an exo – α 1, 3 – glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. FEMS Microbiology Letters 219: 81 – 85.
- BARNETT I. and B. HUNTER. 1987. Illustrated Genera of Imperfect fungi. Fourth Edition. Macmillan Publishing Company, New York. 218 p.
- BAUTISTA S., E. GARCIA, L. BARRERA, T. REYES and C. WILSON. 2003. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts

of huamuchil (*Pithecellobium dulce*) on *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. Post Biol Technol. p. 29 – 81.

BAUTISTA J., R. GARCIA, E. ZAVALA, J. PEREZ, R. MONTES y M. HUERTA. 2010. Disminución de la marchitez del chile (*Phytophthora capsici* Leo.) con complejidad ascendente de antagonistas en el sustrato de germinación del chile (*Capsicum annuum* L.). Interciencia. 35 (8): 613 – 618.

BERGEY'S D. 2000. Manual of Determinative Bacteriology. Night Edition. Philadelphia. p. 540 – 589.

BERNAL G., A. ILLANES and L. CIAMPI. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. With antibiotic activity against plant pathogenic agents. J Biotechnol. 5: 7- 8.

BISSETT J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot. 69: 2373 - 2417.

BOCCAS B. and E. LAVILLE. 1976. Les maladies a *Phytophthora* des agrumes. IRFA. Francia. Editions SETCO. 162 p.

BRAUN – KIEWNICK A. and D. C. SANDS. 2001. *Pseudomonas*, In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Eds. N. Schaad, J. B. JONES and W. CHUN) 84 – 117. APS PRESS, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

BUCHANAN R. E. and N. E. GIBBONS. 1974. Endospore forming rods and cocci. Part 15. Eight Edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. p. 529 – 549.

CAZORLA F. and D. ROMERO. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. J Appl Microbiol 103 (5): 1950 – 1959.

CERPA S. 2001. Evaluación de abonos orgánicos en el control de *Phytophthora capsici* causante de marchitez en pimentón. Memoria Talca, Universidad de Talca. Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Agronomía. 41 p.

CHET I. and J. INBAR. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 48: 37 - 43.

CHET I. and S. H. BENHAMOU. 1998. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds.). Taylor & Francis Ltd., London. 2: 152-153.

CHUN W. and J. JONES. 2001. II. Gram – negative. Bacteria. *Burkholderia*. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition. (Schaad N. W., J. B. JONES, W. CHUM), APS PRESS, St. Paul, MN, USA, 139 – 150.

CONSTANZA L., L. SANCHEZ, J. CUERVO, D. BAUTISTA, L. GONZALEZ y M. GUEVARA. 2011. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. NOVA – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 8 (13): 63 – 75.

DE LA CRUZ, J., J. PINTOR, T. BENITEZ and A. LLOBEL. 1995. Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *Journal de Bacteriology*. 177: 1864 – 1971.

DÍAZ J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana. p. 18-20.

DUFFY B. and D. WELLER. 1995. Use of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* alone and in combination with fluorescent *Pseudomonas* spp. to suppress take all of wheat. *Plant Disease*. 79: 907 – 911.

DUGDALE L., H. COLLIN, S. ISACC y J. GILL. 1993. Leaf blight resistance in carrot somaclones. *Acta Horticultural*. p. 336 – 399.

ELAD Y. and R. BAKER. 1995. The role of competition for iron and carbón in suppression of clamidospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 75: 1053.

ELAD Y., I. CHET and Y. HENIS. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 28: 719 – 725.

ERWIN D. and O. RIBEIRO. 1996. *Phytophthora* Disease Worldwide. Estados Unidos Minnesota. APS PRESS. The American Phytopathological Society. 562 p.

ESCALONA Y., D. RODRIGUEZ, N. CONTRERAS y N. JIMENEZ. 2006. Patógenos del suelo en el cultivo de pimentón en la zona baja del municipio Jiménez, estado Lara, Venezuela. *Bioagro*. 18(1): 3 – 13.

EVELEIGH D., A. DEMAINE, N. SOLOMON. 1986. *Trichoderma*. Biology of industrial microorganism. *Biothec Ser. (Ed.)* Cap. 16: 489 - 500.

EZZIYYANI M., C. PÉREZ, L. RUBIO, M. E. REQUENA y M. E. CANDELA. 2004a. Biocontrol por *Streptomyces rochei* – Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*. España. 26: 69 – 78.

EZZIYYANI M., C. PÉREZ, A. SID, M. E. REQUENA y M. E. CANDELA. 2004b. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*. España. 26: 61 – 68.

EZZIYYANI M., C. PÉREZ, A. SID, M. E. REQUENA y M. E. CANDELA. 2004c. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*. España. 26: 35 – 45.

EZZIYYANI M., C. PÉREZ, A. SID, M. E. REQUENA y M. E. CANDELA. 2006. Control biológico por microorganismos antagonistas. Artículo Sanidad Vegetal. *Revista Horticultura*. p. 8 – 15.

EZZIYYANI M., M. E. REQUENA, C. EGEA-GILABERT y M. E. CANDELA. 2007. Evaluación de microorganismos antagonistas en la inhibición de *Phytophthora capsici* sobre hojas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). XI Congreso SECH. Albacete. Actas de Horticultura. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. 48:310-314.

EZZIYYANI M., A. HAMDACHE, A. REQUENA, C. EGEA, M. CANDELA, L. GONZALEZ y M. REQUENA. 2011. Mejora de la capacidad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de un combinado de antagonistas compatibles frente a *Phytophthora capsici* Leonian. Anales de Biología. 33: 67 – 77.

FAOSTAT. 2013. FAO Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Disponible en: <http://faostat.fao.org> (Julio, 2013).

FERNANDEZ C. 1991. *Phytophthora capsici* Leonian organismo causante de marchitez del pimentón en zapallo de guarda Cucúrbita merma Agricultura técnica. 51: 353 – 355.

FERNÁNDEZ - LARREA, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. 62: 96 – 100.

FERNÁNDEZ – LARREA. O. 2002. Tecnologías para la producción biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de calidad. Http://www.codagea.gob.mx/-produce/hong_ent.htm (Octubre, 2011).

FERNÁNDEZ - LARREA, O. 2006. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. . Revista Fitosanidad. 10(1): 24 – 28.

FERNÁNDEZ E., M. ACOSTA, F. PONCE y V. PINTO. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr y *Rhizoctonia solani* Kühn en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Mexicana de Fitopatología. 25 (1): 35 – 42.

FLORES J. 2008. Capacidad antagonista *in vitro* de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium moniliforme* Sheldon. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central de Venezuela. 63 p.

FRIONI, L. 1999. Procesos microbianos. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina. 332 p.

GARCIA F. 2005. Selectividad de productos fitosanitarios en el control integrado: Herramientas indispensables para la implementación de programas de ICM, tomado de AgroInformación.com.

GIACONI V. y M. ESCAFF. 1998. Cultivo de Hortalizas. Editorial Universitaria. Santiago de Chile, Chile. 332 p.

GUIGÓN C. y P. GONZÁLEZ. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Ciudad Obregón, México. 22(1):117-124.

GUILLÉN R., F. HERNÁNDEZ, G. GALLEGOS, R. RODRIGUEZ, C. AGUILAR, E. PADRÓN y M. REYES. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* KUHN y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile. Revista Mexicana de Fitopatología. 24(2):105-114.

GUZMÁN J. 1997. El cultivo del pimiento y el ají. 2^a Edición. Editorial Espanande, S.R.L. Caracas – Venezuela. 84 p.

GUZMÁN L. 2011. Uso de *Trichoderma* spp. para el control *in vivo* de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler causante de la pudrición parda de la mazorca del cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central de Venezuela. 42 p.

HALLMANN, J., A. QUADT, W. MAHAFFEE and J. KLOEPPER. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 895 – 914.

HARAM S., H. SCHICKLER, A. OPPENHEIM and I. CHET. 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathol.* 86: 980 - 985.

HARMAN G. E. 2001. *Trichoderma* spp., Including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, moniliales (asexual classification system). <http://www.birdhybrids.com/t-22.htm> (Octubre, 2011).

HARMAN G. E., C. R. HOWELL, A. VITERBO, I. CHET and M. LORITO. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plants symbiont. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 43 – 56.

HERNANDEZ F., A. AGUIRRE, R. LIRA, E. GUERRERO y G. GALLEGOS. 2006. Bioeficacia de productos orgánicos, biológicos y químicos contra *Alternaria dauci* Kühn y su efecto en el cultivo de zanahoria. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 75: 91 – 101.

HJELJORD L. and A. TRONSMO. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman GE, Kubice KCP. Edicion. *Trichoderma & Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis Ltd. London. 2: 131 – 151.

HOLT J. C., N. R. KRIEG, P. H. A. SNEATH, J. T. STALEY, S. T. WILLIAMS. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 787 p.

INDEX FUNGORUM. 2011. [CABI Bioscience](http://www.indexfungorum.org/Names/IndexFungorumPartnership.htm). [En línea]. Dirección URL:<
<http://www.indexfungorum.org/Names/IndexFungorumPartnership.htm>> (Abril, 2011).

INFANTE D., B. MARTÍNEZ, N. GONZÁLEZ y Y. REYES. 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. La Habana. 24 (1): 14 - 21.

INFOSTAT. 2002. InfoStat, versión 1.1. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina.

INIA. 2005. El Cultivo de Hortalizas en Venezuela. Serie Manuales de Cultivos. INIA N° 2. Maracay, Venezuela. 192 p.

IZZEDDIN A. y L. MEDINA. 2011. Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. Antagonistas y Fitopatógenos vegetales. Salus Online. 15: 8 – 18.

JACKSON A. M., J. M. WHIPPS and J. M. LYNCH. 1991. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. World J. Microbiol. Biotechnol. 7: 494 – 501.

JIMENEZ D. R., G. V. CALLEROS, S. T. FRANCO y P. V. OLALDE. 2001. Bacterias promotoras de crecimiento de Plantas: agro-biotecnología. Avance y Perspectiva (México). 20: 395 – 400.

JOHNSTON S. 1989. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. Plant Disease. 83: 1080 – 1089.

JUDELSON H. and F. BLANCO. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. Nature Reviews Microbiology. 3: 47-58.

KIRK P., P. CANNON, J. DAVID y J. STALPERS. 2001. AinsWorld & Bisby's dictionary of the fungi. 9 th edition. CABI Publishing, Wallingford.

LABRADOR Y. 2011. Evaluación de la capacidad biocontroladora *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma crassum* Bissett y *Bacillus subtilis* Ehrenberg sobre *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler causante de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de Postgrado para optar al título de *Magister Scientiarum* en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 68 p.

LAGUNAS J., E. ZAVALETA, S. OSADA, S. ARANDA, I. LUNA y H. VAQUERA. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. Rev. Mexicana Fitopatol. 19: 57 – 65.

LATORRE B. 1992. Enfermedades de las plantas cultivadas. Ediciones Universidad Católica, Santiago, Chile, 628 p.

LEEMAN M., J. A. VAN PELT, F. M. DE OUDEN, M. HEINSBROEK and P. BAKKER. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to *Fusarium wilt*, using a novel bioassay. European Journal of Plant Pathology. 101: 655 – 664.

LEEMAN M., F. DEN and K. MENDGEN. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. Phytopathology. 87: 1103 – 1110.

LEONIAN L. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. Phytopathology. 12: 401 – 408.

LÓPEZ C. J., R. M. PÉREZ, A. LLOBEL, E. MONTE y T. ZEA. 1999. Estudios in vivo de *Trichoderma* como agente de Biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. Revista Chapingo. Serie Horticultura. 5: 261 – 265.

LORENZO N. 2001. Prospección de hongos antagonistas en la providencia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. Tesis de Postgrado para optar al título de *Magister Scientiarum* en Protección Vegetal. Universidad Agraria de la Habana. p. 15-20.

LORITO M., G. HARMAN, A. DI PRIETO, C. HAYES. 1990. Extracellular chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning. Phytopathol. 82 (10):10 - 77.

MALAGUTI G. y R. E. PONTIS. 1950. *Phytophthora capsici* in Venezuela. Estratto dalla Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale. 44(1–3):4-12.

MALAJCZUK N. 1983. Microbial Antagonism to *Phytophthora*. pp. 197 – 218. In: D. C. Erwin S., Bartnicki – García and P.H. Tsao (eds.). *Phytophthora*. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Epidemiology. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 392 p.

MARIANO R. L. R., A. M. A. GOMES, S. M. P. ASSIS y E. B. SILVEIRA. 2005. Mecanismos de acción de bacterias promotoras de crecimiento de plantas. En: Manual de prácticas en Fitobacteriología. 2ª Edición. Coordinación: Ramos M. R. de L. y Barbosa da S. E. Universidad Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE-Brasil. 148 p.

MAROTO J. 1986. Horticultura Herbácea y Especial. Ed. Mundi - Prensa. 5^{ta} edición. Madrid - España. 590 p.

MATHRE D., R. COOK and N. CALLAN. 1999. Traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. Plant Disease. 83: 972 – 983.

MELGAREJO P., E. SAGASTA. 1989. Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. Can. J. Bot. 67: 83 - 87.

MELNICK R., N. ZIDACK, B. BAILEY, S. MAXIMOVA, M. GULTINAN and P. BACKMAN. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. Biological Control. 46: 46 – 56.

MENTEN J.O.M., C.C. MACHADO, E. CASTRO, y H. C. KIMATI. 1976. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (tass.) Goid. *in vitro*. Fitopatología Brasileira 1:57-64.

MCSPADDEN G. B. and D. FRAVEL. 2002. Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. In line: <http://www.apsnet.org/online/feature/biocontrol/top.html> (Noviembre, 2011).

MOJICA M., H. LUNA, C. SANDOVAL, B. PEREYRA, L. MORALES, N. GONZALEZ, C. HERNANDEZ y O. ALVARADO. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. Revista Internacional de Botánica Experimental. 78: 105 – 110.

MONTAÑO N. y E. CEDEÑO. 2002. Evaluación agronómica de siete cultivares de pimentón (*Capsicum annuum* L.). Revista UDO Agrícola 2 (1): 95 – 100.

NEWHOOK F. J., G. M. WATERHOUSE and D. J. STAMPS. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycological Papers. 143 p.

NIEDMANN M. 1998. Etiología de la enfermedad “Pudrición al cuello” en pimentón (*Capsicum annuum* var. *Grossum*) y efecto de cinco fungicidas sobre el control *in vitro* e *in vivo* del agente causal. Tesis de grado. Talca, Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía. 69 p.

NUÉZ F., G. ORTEGA y J. COSTA. 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. 1^{era} edición. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid, España. 603 p.

PALAZÓN C. y I. PALAZÓN. 1989. Estudios epidemiológicos sobre la “Tristeza” del pimiento en la zona del Valle Medio del Ebro Bol. San. Veg. Plagas. Zaragoza. 15: 233 – 262.

PAPAVIZAS G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 23: 23 – 54.

PAULITZ T. C. and R. BAKER. 1987. Biological control of *Phytophthora* damping off of cucumbers with *Pythium nunn*: influence of soil environment and organic amendments. Phytopathology. 77: 341 – 346.

PELDOZA M. 2005. Evaluación de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el control de caídas de plántulas en almácigo de pimentón (*Capsicum annuum*) cv. Fyuco. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Talca – Chile. Universidad de Talca. 37 p.

PÉREZ L., L. DURÁN and J. SÁNCHEZ. 2002. Identification of fungi that cause “pepper wilt” in the Bajío Region. Proceeding of the 16th International Pepper Conference. Tampico, Tamaulipas – México. 1 p.

PÉREZ N. 2004. Manejo Ecológico de plagas. CEDAR: La Habana. Cuba. 296 p.

PINEDA J., D. RODRIGUEZ, N. CONTRERAS, J. MONTILLA y J. RENAUD. 2003. Enfermedades en hortalizas diagnosticadas en la región centro – occidental durante 2000 – 2001. IX Congreso de Hortalizas San Cristóbal – Venezuela. Resúmenes p. 144.

PICHARDO, Y. 2009. Eficiencia de un biofungicida a base de (*Trichoderma harzianum*) sobre el control de *Phytophthora capsici* en el cultivo de pimentón (*Capsicum annum* L.). Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central de Venezuela. 28 p.

PODILE A. R. and V. P. V. LAXMI. 1998. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF1 increases phenylalanine ammonia lyase and reduces the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. Journal of Phytopathology. 146: 255 – 259.

RIFAI, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Res. Mycol. 116:1-56.

ROMERO Y., J. VELÁSQUEZ, B. DOOAL, L. PALACIOS y D. RODRIGUEZ. 2003. Pudrición basal del tallo de ají dulce (*Capsicum chinense*) y pimentón (*Capsicum annum*) causado por *Fusarium oxysporum* en el estado Falcón. Recomendaciones para el manejo de la enfermedad. IX Congreso de Hortalizas San Cristóbal, Venezuela. Resúmenes. 137 p.

ROS C., N. GONZALEZ, R. AREVALO y A. PUERTAS. 2008. Utilización de cepas bacterianas para el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Revista Electrónica Granma Ciencia. 12 (3): 1 -10.

RUDOLPH K., M. A. ROY, M. SASSER, D.E. STEAD, M. DAVIS, J. SWINGS and F. GOSSELÉ. 1990. Isolation of bacteria. In: Methods in Phytobacteriology, Ch.

1.4. Z. Klement, K. Rudolph, and D.C. Sands, eds. Akadémiai Kiadó, Budapest. p. 43-94.

SALDARRIAGA F. 2007. Evaluación agronómica a escala semicomercial de cinco cultivares de pimentón (*Capsicum annuum* L.) y comparación de dos planes de fertilización foliar bajo ambiente protegido. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central de Venezuela. 55 p.

SAMUELS G. J. 2005. Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 69. 195 – 206.

SANTANDER A. 2012. Uso de *Trichoderma harzianum* Rifai y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn para el control de (*Colletotrichum gloeosporioides* Pens.) causante de la antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.). Tesis de Postgrado para optar al título de *Magister Scientiarum* en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 91 p.

SCHAAD N. W. 2001. Initial Identification of common genera. In: Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. Edited by Schaad N., Jones J.; Chun W. Third Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota. p. 1 - 5.

SCHAAD N. W., J. B. JONES and W. CHUN. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3^{era} ed. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. 373 p.

SHLUB R. L. 1983. Epidemiology of *Phytophthora capsici* on bell pepper. Journal of Agricultural Science. 100 (1): 7 – 11.

SID A., C. PEREZ, C. EGEA and M. CANDELA. 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. Plant Pathology. 48: 58 – 65.

STEFANOVA M., A. LEIVA, F. CORONADO y L. LARRINAGA. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Rev. Fac. Agron. (LUZ). Venezuela. 16: 509 – 516.

STRANDBERG J. O. 1992. *Alternaria* species that attack vegetables crops: Biology and options for disease management. In: *Alternaria – Biology. Plant Disease and Metabolites, Topics in secondary Metabolism*, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers. 3: 175.

TALAVERA M., E. BUSTAMANTE, R. GONZALEZ y V. SANCHEZ. 1998. Selección y evaluación en el laboratorio y campo de microorganismos glucanólitos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*. *Manejo Integrado de Plagas*. 47: 24 – 30.

TEJEDA G., J. RODRIGUEZ, R. GARCIA, V. MARTINEZ, B. DIBUT, J. CASTELLANOS, L. GUTIERREZ, L. PLANA, Y. RIOS, M. SIMANCA, M. ORTEGA, C. LAMELA, A. MARTINEZ, L. IZQUIERDO, G. CROCHE y L. FEY. 2006. Efectividad del Biobac, obtenido a partir de *Bacillus subtilis* (cepa INIFAT – 101) como biocontrolador de enfermedades y estimulador del crecimiento vegetal. *Fitosanidad*. 10(2): 141 – 142.

TOLEDO D. 2004. Evaluación *in vitro* del efecto de cepas nativas de la bacteria *Bacillus* sp. en el biocontrol de la bacteria *Erwinia carotovora*. Tesis de pregrado para optar título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Talca. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía. Talca – Chile. 45 p.

TUSET, B. J. J. 1977. Contribución al conocimiento del género *Phytophthora* de Bary en España. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INICA)*. N° 7.

ULLOA C. J. 1996. Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. En: *Actas del V de Simposio de controle biológico. Anais: Conferencias y Palestras. Foz de Iguaçu – Parana – Brasil*. p. 234-238.

VALLEJO F. y E. ESTRADA. 2004. Producción de hortalizas en clima cálido. Palmira. Universidad Nacional de Colombia. 346 p.

VENEGAS E., L. CIAMPI, L. COLLASO, M. COSTA, R. FUENTES, J. SCHOEBITZ y M. SCHOEBITZ. 2005. Aislamiento e identificación de bacterias nativas de

genero *Bacillus* Cohn antagonistas de cepas patógenas de *Fusarium* Link en cala. AGROSUR. 33 (2) 1 – 12.

VERO S. M., P. MONDINO. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. Horticultura Internacional. 7: 1 - 10.

WALKER C. and P. VAN WEST. 2007. Zoospore development in the oomycetes. Fungal Biology Reviews. 21:10 - 18.

WATERHOUSE, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycological Papers. N° 92.

WESTE G., P. RUPPIN and K. VITHANAGE. 1976. *Phytophthora cinnamomi* in the brisbane ranges: patterns of disease extension. Australian Journal of Botany. 24: 201 – 208.

WIDDEN P. and V. SCATTOLIN. 1988. Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. Mycology. 80:795 - 803.

WILCOX W., E. AGOSIN y B. LATORRE. 1993. Identificación y enfermedades producidas por *Phytophthora*. Pontificia Universidad Católica, Facultad de Agronomía, Departamento de fruticultura y enología. Santiago, Chile. 104 p.

WILCOX W. y B. LATORRE. 1994. Pudrición radical y del cuello en frutales causadas por *Phytophthora*. Aconex 43: 5 – 12.

ZHANG C., I. DRUZHININA, C. P. KUBICK and T. XU. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a north to southern distribution of species in East Asia. FEMS Microbiol. Lett. 251: 251 – 257.

ANEXO

Resultados del análisis estadístico del Porcentaje de inhibición de Crecimiento (PIC) y Porcentaje de Inhibición de Esporulación (PIE) de *P. capsici* enfrentado con aislamientos de *Trichoderma* spp.

PIC

N:\Georgette\Datos in vitro Tricho PIC.IDB2: 17/01/2013 - 08:36:38 p.m.

Medidas resumen

Resumen	PIC1	PIC2	PIC3	PIC4	PIC(4-1)
n	88.00	88.00	88.00	88.00	88.00
Media	23.65	19.14	38.82	57.16	33.51
D.E.	16.01	11.52	13.03	14.48	19.21
E.E.	1.71	1.23	1.39	1.54	2.05
CV	67.68	60.18	33.56	25.34	57.33
Mín	-16.67	-3.70	0.00	0.00	-7.83
Máx	57.14	48.28	66.67	78.08	90.95
Mediana	28.57	17.86	39.58	59.59	31.62
Q1	14.29	11.11	34.78	55.56	23.42
Q3	33.33	28.57	44.68	63.89	44.76
Asimetría	-0.18	0.31	-0.99	-2.74	0.16
Kurtosis	-0.62	-0.27	2.31	9.12	0.34
MAD	11.90	7.80	5.10	4.17	11.32
Datos faltantes	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

N:\Georgette\Datos in vitro Tricho PIC.IDB2: 17/01/2013 - 08:37:00 p.m.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
PIC1	88	23.648	16.005	0.929	<0.0001
PIC2	88	19.144	11.520	0.961	0.0810
PIC3	88	38.820	13.028	0.900	<0.0001
PIC4	88	57.156	14.481	0.704	<0.0001
PIC(4-1)	88	33.510	19.212	0.975	0.4646

N:\Georgette\Datos in vitro Tricho PIC.IDB2: 17/01/2013 - 08:37:24 p.m.

Análisis de la varianza

PIC1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PIC1	88	0.42	0.24	59.11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9391.01	21	447.19	2.29	0.0057
Prueba/día	9391.01	21	447.19	2.29	0.0057
Error	12896.04	66	195.39		

Total	22287.05	87
-------	----------	----

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=37.02288

Error: 195.3946 gl: 66

Prueba/día	Medias	n	E.E.		
T19	41.67	4	6.99	A	
T18	41.67	4	6.99	A	
T7	33.93	4	6.99	A	B
T14	30.95	4	6.99	A	B
T11	30.95	4	6.99	A	B
T6	30.95	4	6.99	A	B
T21	30.36	4	6.99	A	B
T4	29.77	4	6.99	A	B
T15	26.79	4	6.99	A	B
T16	26.19	4	6.99	A	B
T20	26.19	4	6.99	A	B
T1	22.62	4	6.99	A	B
T8	22.62	4	6.99	A	B
T5	22.03	4	6.99	A	B
T2	22.03	4	6.99	A	B
T17	19.05	4	6.99	A	B
T9	19.05	4	6.99	A	B
T10	14.88	4	6.99	A	B
T13	14.88	4	6.99	A	B
T3	7.14	4	6.99	A	B
T12	6.55	4	6.99	A	B
Testigo	0.00	4	6.99		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PIC2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PIC2	88	0.84	0.79	27.35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9736.77	21	463.66	16.92	<0.0001
Prueba/día	9736.77	21	463.66	16.92	<0.0001
Error	1809.08	66	27.41		
Total	11545.86	87			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=13.86664

Error: 27.4104 gl: 66

Prueba/día	Medias	n	E.E.		
T12	45.47	4	2.62	A	
T2	32.04	4	2.62	A	B
T16	30.28	4	2.62		B C
T1	28.53	4	2.62		B C
T21	28.50	4	2.62		B C

T3		24.92	4	2.62	B	C	D				
T4		24.79	4	2.62	B	C	D				
T19		24.09	4	2.62	B	C	D				
T18		22.27	4	2.62	B	C	D				
T11		21.47	4	2.62	B	C	D	E			
T10		21.32	4	2.62	B	C	D	E			
T17		20.59	4	2.62	B	C	D	E			
T15		16.85	4	2.62		C	D	E	F		
T14		14.30	4	2.62			D	E	F	G	
T8		13.34	4	2.62			D	E	F	G	
T6	H	12.51	4	2.62			D	E	F	G	
T7	H	12.48	4	2.62			D	E	F	G	
T20	H	11.55	4	2.62			D	E	F	G	
T9	H	8.04	4	2.62				E	F	G	
T5	H	5.20	4	2.62					F	G	
T13	H	2.68	4	2.62							G
Testigo	H	0.00	4	2.62							

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PIC3

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PIC3	88	0.96	0.94	8.06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14121.19	21	672.44	68.73	<0.0001
Prueba/día	14121.19	21	672.44	68.73	<0.0001
Error	645.76	66	9.78		
Total	14766.95	87			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=8.28472

Error: 9.7843 gl: 66

Prueba/día	Medias	n	E.E.
T12	64.52	4	1.56 A

T16		52.91	4	1.56	B					
T3		52.34	4	1.56	B					
T4		49.15	4	1.56	B	C				
T15		46.50	4	1.56	B	C	D			
T14		45.50	4	1.56	B	C	D	E		
T8		43.35	4	1.56		C	D	E	F	
T6		42.86	4	1.56		C	D	E	F	G
T7		42.86	4	1.56		C	D	E	F	G
T9		41.29	4	1.56		C	D	E	F	G
T11	H	39.17	4	1.56			D	E	F	G
T18	H	38.08	4	1.56				E	F	G
T21	H	38.05	4	1.56				E	F	G
T13	H	37.02	4	1.56					F	G
T2	H	37.00	4	1.56					F	G
T19	H	35.94	4	1.56					F	G
T20	H	35.45	4	1.56					F	G
T1	H	34.93	4	1.56						G
T10	H	33.82	4	1.56						
T5	H	26.92	4	1.56						
T17	I	16.40	4	1.56						
Testigo	J	0.00	4	1.56						

K

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PIC4

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PIC4	88	0.99	0.99	3.10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18036.72	21	858.89	273.35	<0.0001
Prueba/día	18036.72	21	858.89	273.35	<0.0001
Error	207.38	66	3.14		
Total	18244.10	87			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=4.69485

Error: 3.1421 gl: 66

Prueba/día	Medias	n	E.E.				
T12	76.80	4	0.89	A			
T3	68.49	4	0.89		B		
T16	68.16	4	0.89		B		
T4	66.40	4	0.89		B	C	
T15	65.00	4	0.89		B	C	D
T14	64.36	4	0.89		B	C	D
T7	62.63	4	0.89			C	D E
T6	62.27	4	0.89			C	D E
T8	62.25	4	0.89			C	D E
T9	60.91	4	0.89				D E F
T21	59.14	4	0.89				E F
T13	58.81	4	0.89				E F
T2	58.79	4	0.89				E F
T11	57.45	4	0.89				F
T20	57.44	4	0.89				F
T1	57.44	4	0.89				F
T10	56.37	4	0.89				F
T19	50.14	4	0.89				G
T5	49.82	4	0.89				G
H T18	49.48	4	0.89				G
H T17	45.32	4	0.89				
H Testigo	0.00	4	0.89				

I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PIE

N:\Georgette\Datos in vitro Tricho.IDB2: 17/01/2013 - 08:09:12 p.m.

Medidas resumen

Resumen	Promediox2000	PIE
n	88.00	88.00
Media	2368.18	64.96
D.E.	1255.02	18.66
E.E.	133.79	1.99
CV	52.99	28.72
Mín	800.00	0.00
Máx	7200.00	88.89
Mediana	2000.00	66.67
Q1	1600.00	55.56
Q3	2800.00	77.78
Asimetría	2.04	-1.90
Kurtosis	5.52	4.62
MAD	400.00	11.11
Datos faltantes	0.00	0.00

N:\Georgette\Datos in vitro Tricho.IDB2: 17/01/2013 - 08:09:56 p.m.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Promediox2000	88	2368.18	1255.02	0.80	<0.0001
PIE	88	64.96	18.66	0.81	<0.0001

N:\Georgette\Datos in vitro Tricho.IDB2: 17/01/2013 - 08:10:07 p.m.

Análisis de la varianza

Promediox2000

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Promediox2000	88	0.89	0.86	20.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	122110909.09	21	5814805.19	25.72	<0.0001
Tratamiento	122110909.09	21	5814805.19	25.72	<0.0001
Error	14920000.00	66	226060.61		
Total	137030909.09	87			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1259.29184

Error: 226060.6061 gl: 66

Tratamiento	Medias	n	E.E.						
Testigo	6800.00	4	237.73	A					
T17	3700.00	4	237.73		B				
T18	3400.00	4	237.73		B	C			
T5	3200.00	4	237.73		B	C	D		
T19	2900.00	4	237.73		B	C	D	E	
T20	2500.00	4	237.73		B	C	D	E	F
T13	2300.00	4	237.73			C	D	E	F
T21	2200.00	4	237.73			C	D	E	F
T6	2200.00	4	237.73			C	D	E	F
T1	2200.00	4	237.73			C	D	E	F
T7	2100.00	4	237.73				D	E	F
T10	2100.00	4	237.73				D	E	F
T2	2100.00	4	237.73				D	E	F
T11	2000.00	4	237.73				D	E	F
T8	2000.00	4	237.73				D	E	F
T9	1900.00	4	237.73					E	F
T4	1900.00	4	237.73					E	F

T14	1800.00	4	237.73	E	F	G	H
T15	1500.00	4	237.73		F	G	H
T16	1300.00	4	237.73		F	G	H
T3	1200.00	4	237.73			G	H
T12	800.00	4	237.73				H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PIE

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PIE	88	0.87	0.83	11.82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	26395.28	21	1256.92	21.30	<0.0001
Tratamiento	26395.28	21	1256.92	21.30	<0.0001
Error	3893.80	66	59.00		
Total	30289.08	87			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=20.34366

Error: 58.9970 gl: 66

Tratamiento	Medias	n	E.E.				
T12	88.17	4	3.84	A			
T3	82.25	4	3.84	A	B		
T16	80.79	4	3.84	A	B		
T15	78.09	4	3.84	A	B		
T14	73.09	4	3.84	A	B	C	
T9	71.98	4	3.84	A	B	C	
T4	71.42	4	3.84	A	B	C	
T8	70.43	4	3.84	A	B	C	
T11	70.43	4	3.84	A	B	C	
T2	69.04	4	3.84	A	B	C	D
T10	68.96	4	3.84	A	B	C	D
T7	68.96	4	3.84	A	B	C	D
T1	67.45	4	3.84		B	C	D
T6	67.09	4	3.84		B	C	D
T21	67.09	4	3.84		B	C	D
T13	66.46	4	3.84		B	C	D
T20	62.73	4	3.84		B	C	D
T19	56.77	4	3.84			C	D
T5	53.04	4	3.84			C	D
T18	49.90	4	3.84				D
T17	45.10	4	3.84				D
Testigo	0.00	4	3.84				F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

N:\Georgette\Datos in vitro Tricho.IDB2: 17/01/2013 - 08:09:12 p.m.

Medidas resumen

Resumen	Promedio x2000	PIE
n	88.00	88.00
Media	2368.18	64.96
D.E.	1255.02	18.66
E.E.	133.79	1.99
CV	52.99	28.72
Mín	800.00	0.00
Máx	7200.00	88.89

Mediana	2000.00	66.67
Q1	1600.00	55.56
Q3	2800.00	77.78
Asimetría	2.04	-1.90
Kurtosis	5.52	4.62
MAD	400.00	11.11
Datos faltantes	0.00	0.00

N:\Georgette\Datos in vitro Tricho.IDB2: 17/01/2013 - 08:09:56 p.m.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Promedio2000	88	2368.18	1255.02	0.80	<0.0001
PIE	88	64.96	18.66	0.81	<0.0001

N:\Georgette\Datos in vitro Tricho.IDB2: 17/01/2013 - 08:10:07 p.m.

Análisis de la varianza

Promedio2000

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Promedio2000	88	0.89	0.86	20.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	122110909.09	21	5814805.19	25.72	<0.0001
Tratamiento	122110909.09	21	5814805.19	25.72	<0.0001
Error	14920000.00	66	226060.61		
Total	137030909.09	87			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1259.29184

Error: 226060.6061 gl: 66

Tratamiento	Medias	n	E.E.					
Testigo	6800.00	4	237.73	A				
T17	3700.00	4	237.73		B			
T18	3400.00	4	237.73		B	C		
T5	3200.00	4	237.73		B	C	D	
T19	2900.00	4	237.73		B	C	D	E
T20	2500.00	4	237.73		B	C	D	E
T13	2300.00	4	237.73			C	D	E
T21	2200.00	4	237.73			C	D	E
T6	2200.00	4	237.73			C	D	E
T1	2200.00	4	237.73			C	D	E
T7	2100.00	4	237.73				D	E
T10	2100.00	4	237.73				D	E
T2	2100.00	4	237.73				D	E
T11	2000.00	4	237.73				D	E
T8	2000.00	4	237.73				D	E
T9	1900.00	4	237.73					E
T4	1900.00	4	237.73					E
T14	1800.00	4	237.73					E
T15	1500.00	4	237.73					
T16	1300.00	4	237.73					
T3	1200.00	4	237.73					
T12	800.00	4	237.73					

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

PIE

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PIE	88	0.87	0.83	11.82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	26395.28	21	1256.92	21.30	<0.0001
Tratamiento	26395.28	21	1256.92	21.30	<0.0001
Error	3893.80	66	59.00		
Total	30289.08	87			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=20.34366

Error: 58.9970 gl: 66

Tratamiento	Medias	n	E.E.					
T12	88.17	4	3.84	A				
T3	82.25	4	3.84	A	B			
T16	80.79	4	3.84	A	B			
T15	78.09	4	3.84	A	B			
T14	73.09	4	3.84	A	B	C		
T9	71.98	4	3.84	A	B	C		
T4	71.42	4	3.84	A	B	C		
T8	70.43	4	3.84	A	B	C		
T11	70.43	4	3.84	A	B	C		
T2	69.04	4	3.84	A	B	C	D	
T10	68.96	4	3.84	A	B	C	D	
T7	68.96	4	3.84	A	B	C	D	
T1	67.45	4	3.84		B	C	D	
T6	67.09	4	3.84		B	C	D	
T21	67.09	4	3.84		B	C	D	
T13	66.46	4	3.84		B	C	D	
T20	62.73	4	3.84		B	C	D	E
T19	56.77	4	3.84			C	D	E
T5	53.04	4	3.84			C	D	E
T18	49.90	4	3.84				D	E
T17	45.10	4	3.84					E
Testigo	0.00	4	3.84					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Resultados del análisis estadísticos del Porcentaje de Inhibición de Crecimiento (PIC) y Porcentaje de Inhibición de Esporulación (PIE) de *P. capsici* enfrentado con aislamientos de *Bacillus* spp.

PIC

N:\Georgette\Datos in vitro Bacillus PIC.IDB2: 17/01/2013 - 08:21:19 p.m.

Medidas resumen

Resumen	PIC 1*	PIC 2*	PIC 3*	PIC 4*	PIC (4-1)
n	84.00	84.00	84.00	84.00	84.00
Media	16.16	17.94	33.53	49.37	33.21
D.E.	9.22	11.99	15.54	15.01	13.80
E.E.	1.01	1.31	1.70	1.64	1.51
CV	57.06	66.84	46.33	30.40	41.55

Mín	-4.17	-4.65	0.00	0.00	0.00
Máx	35.71	47.73	59.09	69.66	62.50
Mediana	16.67	18.60	33.08	50.57	34.34
Q1	8.33	7.14	22.73	41.67	24.84
Q3	23.08	27.27	48.39	60.92	41.49
Asimetría	-0.23	0.13	-0.32	-1.55	-0.47
Kurtosis	-0.49	-0.71	-0.77	3.43	0.22
MAD	6.41	9.41	12.23	9.39	7.67
Datos faltantes	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

N:\Georgette\Datos in vitro Bacillus PIC.IDB2: 17/01/2013 - 08:21:46 p.m.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
PIC 1*	84	16.16	9.22	0.96	0.0970
PIC 2*	84	17.94	11.99	0.95	0.0331
PIC 3*	84	33.53	15.54	0.93	<0.0001
PIC 4*	84	49.37	15.01	0.84	<0.0001
PIC(4-1)	84	33.21	13.80	0.96	0.0598

N:\Georgette\Datos in vitro Bacillus PIC.IDB2: 17/01/2013 - 08:21:59 p.m.

Análisis de la varianza

PIC 1*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PIC 1*	84	0.57	0.44	42.84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4038.28	20	201.91	4.21	<0.0001
Prueba/día	4038.28	20	201.91	4.21	<0.0001
Error	3019.68	63	47.93		
Total	7057.96	83			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=18.24236

Error: 47.9314 gl: 63

Prueba/día	Medias	n	E.E.				
B11	28.71	4	3.46	A			
B20	25.74	4	3.46	A	B		
B17	25.60	4	3.46	A	B		
B1	23.89	4	3.46	A	B		
B15	20.98	4	3.46	A	B	C	
B19	19.13	4	3.46	A	B	C	
B13	18.99	4	3.46	A	B	C	
B18	18.18	4	3.46	A	B	C	D
B16	17.29	4	3.46	A	B	C	D
B12	17.08	4	3.46	A	B	C	D
B14	17.07	4	3.46	A	B	C	D
B2	16.92	4	3.46	A	B	C	D
B10	16.10	4	3.46	A	B	C	D
B8	15.95	4	3.46	A	B	C	D

B9	13.96	4	3.46	A	B	C	D
B3	12.39	4	3.46	A	B	C	D
B7	9.26	4	3.46		B	C	D
B6	8.47	4	3.46		B	C	D
B4	8.24	4	3.46		B	C	D
B5	5.48	4	3.46			C	D
Testigo	0.00	4	3.46				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PIC 2*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PIC 2*	84	0.91	0.88	22.81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10881.77	20	544.09	32.50	<0.0001
Prueba/día	10881.77	20	544.09	32.50	<0.0001
Error	1054.85	63	16.74		
Total	11936.61	83			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=10.78191

Error: 16.7436 gl: 63

Prueba/día	Medias	n	E.E.							
B8	41.18	4	2.05	A						
B1	34.27	4	2.05	A	B					
B11	29.05	4	2.05		B	C				
B18	28.50	4	2.05		B	C				
B14	28.46	4	2.05		B	C				
B15	26.74	4	2.05		B	C	D			
B13	26.13	4	2.05		B	C	D			
B4	24.36	4	2.05		B	C	D	E		
B19	23.85	4	2.05		B	C	D	E	F	
B5	22.06	4	2.05			C	D	E	F	G
B7	17.42	4	2.05				D	E	F	G
H										
B2	13.90	4	2.05					E	F	G
H	I									
B20	13.38	4	2.05						F	G
H	I									
B9	12.13	4	2.05							G
H	I									
B3	11.64	4	2.05							G
H	I	J								
B6	8.11	4	2.05							
H	I	J	K							

B16	6.41	4	2.05
	I J	K	
B10	4.06	4	2.05
	I J	K	
B17	4.02	4	2.05
	I J	K	
B12	1.15	4	2.05
	J	K	
Testigo	0.00	4	2.05
		K	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PIC 3*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PIC 3*	84	0.96	0.95	10.54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	19248.38	20	962.42	77.11	<0.0001
Prueba/día	19248.38	20	962.42	77.11	<0.0001
Error	786.28	63	12.48		
Total	20034.66	83			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=9.30872

Error: 12.4807 gl: 63

Prueba/día	Medias	n	E.E.				
B1	55.81	4	1.77	A			
B11	52.29	4	1.77	A	B		
B14	51.91	4	1.77	A	B		
B15	50.79	4	1.77	A	B		
B4	49.15	4	1.77	A	B		
B13	47.57	4	1.77	A	B	C	
B5	45.30	4	1.77		B	C	
B8	44.49	4	1.77		B	C	
B18	38.68	4	1.77			C	D
B9	33.52	4	1.77			D	E
B3	32.05	4	1.77			D	E
B17	31.58	4	1.77			D	E
B10	30.41	4	1.77			D	E F
B2	26.51	4	1.77				E F G

B16		26.13	4	1.77		E	F	G
B19		22.19	4	1.77			F	G
B6	H	21.85	4	1.77			F	G
B12	H	17.88	4	1.77				G
B20	H	I	15.17	4	1.77			
B7	H	I	10.93	4	1.77			
Testigo		I	0.00	4	1.77			

J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PIC 4*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PIC 4*	84	0.98	0.97	4.98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18317.28	20	915.86	151.43	<0.0001
Prueba/día	18317.28	20	915.86	151.43	<0.0001
Error	381.03	63	6.05		
Total	18698.31	83			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=6.48010

Error: 6.0481 gl: 63

Prueba/día	Medias	n	E.E.					
B1	67.22	4	1.23	A				
B11	64.63	4	1.23	A	B			
B14	64.33	4	1.23	A	B			
B15	63.48	4	1.23	A	B			
B4	62.26	4	1.23	A	B			
B13	61.14	4	1.23	A	B			
B5	59.41	4	1.23		B	C		
B8	58.75	4	1.23		B	C		
B18	54.48	4	1.23			C	D	
B9	50.66	4	1.23				D	E
B3	49.27	4	1.23				D	E
B17	49.22	4	1.23				D	E

B10		48.35	4	1.23	D	E	F	G
B16		45.22	4	1.23		E	F	G
B2	H	44.02	4	1.23			F	G
B19	H	42.31	4	1.23				G
B6	H	I 42.01	4	1.23				G
B12	H	I 39.11	4	1.23				
B20	H	I J 37.11	4	1.23				
B7		I J 33.88	4	1.23				
Testigo		J 0.00	4	1.23				
					K			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PIE

Nueva tabla: 17/01/2013 - 08:03:25 p.m.

Medidas resumen

Resumen	Promedio x2000	PIE
n	84.00	84.00
Media	3142.86	43.45
D.E.	987.91	18.41
E.E.	107.79	2.01
CV	31.43	42.37
Mín	400.00	0.00
Máx	6400.00	92.31
Mediana	3200.00	46.15
Q1	2800.00	30.77
Q3	3600.00	53.85
Asimetría	0.06	0.04
Kurtosis	1.95	0.87
MAD	400.00	10.27
Datos faltantes	0.00	0.00

N:\Georgette\Datos in vitro Bacillus.IDB2: 17/01/2013 - 08:05:09 p.m.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Promedio x2000	84	3142.86	987.91	0.95	0.0070
PIE	84	43.45	18.41	0.95	0.0373

N:\Georgette\Datos in vitro Bacillus.IDB2: 17/01/2013 - 08:05:21 p.m.

Análisis de la varianza

Promedio2000

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Promedio2000	84	0.88	0.84	12.63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	71085714.29	20	3554285.71	22.57	<0.0001
Tratamiento	71085714.29	20	3554285.71	22.57	<0.0001
Error	9920000.00	63	157460.32		
Total	81005714.29	83			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1045.57801

Error: 157460.3175 gl: 63

Tratamiento	Medias	n	E.E.					
Testigo	5600.00	4	198.41	A				
B20	3900.00	4	198.41		B			
B6	3900.00	4	198.41		B			
B7	3900.00	4	198.41		B			
B19	3800.00	4	198.41		B	C		
B12	3700.00	4	198.41		B	C		
B16	3700.00	4	198.41		B	C		
B2	3600.00	4	198.41		B	C	D	
B10	3300.00	4	198.41		B	C	D	E
B9	3200.00	4	198.41		B	C	D	E
B3	3000.00	4	198.41		B	C	D	E
B17	2900.00	4	198.41		B	C	D	E
B8	2900.00	4	198.41		B	C	D	E
B5	2800.00	4	198.41			C	D	E
B18	2800.00	4	198.41			C	D	E
B13	2600.00	4	198.41				D	E
B11	2500.00	4	198.41					E
B15	2500.00	4	198.41					E
B14	2400.00	4	198.41					E
B4	2300.00	4	198.41					E
B1	700.00	4	198.41					E

F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PIE

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PIE	84	0.81	0.75	21.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22880.46	20	1144.02	13.74	<0.0001
Tratamiento	22880.46	20	1144.02	13.74	<0.0001
Error	5245.66	63	83.26		
Total	28126.12	83			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=24.04366

Error: 83.2644 gl: 63

Tratamiento	Medias	n	E.E.					
B1	87.67	4	4.56	A				
B4	58.40	4	4.56		B			
B14	56.97	4	4.56		B	C		

B11	55.27	4	4.56	B	C	D	
B15	54.69	4	4.56	B	C	D	
B13	53.49	4	4.56	B	C	D	E
B5	49.64	4	4.56	B	C	D	E
B18	49.64	4	4.56	B	C	D	E
B17	47.85	4	4.56	B	C	D	E
B8	47.72	4	4.56	B	C	D	E
B3	46.15	4	4.56	B	C	D	E
B9	41.95	4	4.56	B	C	D	E
B10	40.39	4	4.56	B	C	D	E
B2	35.03	4	4.56	B	C	D	E
B16	33.11	4	4.56		C	D	E
B12	32.61	4	4.56			D	E
B19	31.77	4	4.56			D	E
B7	30.20	4	4.56				E
B20	29.98	4	4.56				E
B6	29.98	4	4.56				E
Testigo	0.00	4	4.56				F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Resultados del análisis estadístico de las pruebas *in vivo*

Medidas resumen

Resumen	APLANT	PFRPA	PSECPA	NFLOR	PFRRRAIZ	PSECRAIZ	VOLRAIZ
n	116.00	116.00	116.00	116.00	116.00	116.00	116.00
Media	37.53	29.36	4.02	9.80	7.59	1.73	9.99
D.E.	8.86	13.23	1.83	4.37	4.33	1.21	4.95
E.E.	0.82	1.23	0.17	0.41	0.40	0.11	0.46
CV	23.62	45.05	45.54	44.61	57.06	70.03	49.57
Mín	14.00	2.28	0.01	0.00	0.81	0.24	0.50
Máx	56.00	66.11	8.07	21.00	20.19	6.87	26.50
Mediana	37.00	27.25	3.97	10.00	6.61	1.45	9.50
Q1	32.00	21.09	3.06	8.00	4.07	0.92	6.50
Q3	43.00	38.62	4.93	12.00	9.87	2.11	13.00
Asimetría	-0.19	0.49	0.05	-0.30	0.75	2.00	0.56
Kurtosis	0.17	0.25	-0.11	0.61	-0.06	5.18	0.50
MAD	6.00	7.88	0.95	2.00	2.97	0.58	3.15
Datos faltantes	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00

N:\Georgette\Datos in vivo.IDB2: 15/01/2013 - 11:08:30 p.m.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
APLANT	116	37.5259	8.8624	0.9619	0.0218
PFRPA	116	29.3633	13.2289	0.9592	0.0128
PSECPA	116	4.0201	1.8309	0.9658	0.0487
NFLOR	116	9.8017	4.3723	0.9406	<0.0001
PFRRRAIZ	116	7.5854	4.3280	0.9308	<0.0001
PSECRAIZ	116	1.7347	1.2148	0.8222	<0.0001
VOLRAIZ	116	9.9879	4.9514	0.9702	0.1110

N:\Georgette\Datos in vivo.IDB2: 15/01/2013 - 11:08:56 p.m.

Análisis de la varianza

APLANT

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
APLANT	116	0.76	0.74	12.09

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6892.52	11	626.59	30.45	<0.0001
Tratamiento	6892.52	11	626.59	30.45	<0.0001
Error	2139.90	104	20.58		
Total	9032.42	115			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=6.90329

Error: 20.5760 gl: 104

Tratamiento	Medias	n	E.E.			
T11	50.50	10	1.43	A		
T12	50.40	10	1.43	A		
T5	40.10	10	1.43		B	
T6	39.90	10	1.43		B	
T1	39.50	9	1.51		B	
T2	38.10	10	1.43		B	C
T8	34.95	10	1.43		B	C
T3	34.67	9	1.51		B	C
T10	34.56	9	1.51		B	C
T4	33.60	10	1.43		B	C
T7	32.22	9	1.51			C
T9	20.90	10	1.43			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PFRPA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PFRPA	116	0.57	0.53	30.92

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	11552.49	11	1050.23	12.74	<0.0001
Tratamiento	11552.49	11	1050.23	12.74	<0.0001
Error	8573.05	104	82.43		
Total	20125.54	115			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=13.81741

Error: 82.4332 gl: 104

Tratamiento	Medias	n	E.E.				
T11	43.18	10	2.87	A			
T12	41.13	10	2.87	A			
T2	39.71	10	2.87	A	B		
T1	36.14	9	3.03	A	B	C	
T5	33.37	10	2.87	A	B	C	D
T6	32.46	10	2.87	A	B	C	D

T10	26.76	9	3.03	B	C	D
T4	23.98	10	2.87		C	D
T3	23.13	9	3.03		C	D
T7	22.10	9	3.03			D
T8	22.04	10	2.87			D
T9	7.44	10	2.87			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PSECPA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PSECPA	116	0.60	0.56	30.36

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	230.55	11	20.96	14.07	<0.0001
Tratamiento	230.55	11	20.96	14.07	<0.0001
Error	154.95	104	1.49		
Total	385.51	115			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.85763

Error: 1.4899 gl: 104

Tratamiento	Medias	n	E.E.				
T11	5.78	10	0.39	A			
T12	5.51	10	0.39	A	B		
T1	5.13	9	0.41	A	B	C	
T2	5.12	10	0.39	A	B	C	
T6	4.84	10	0.39	A	B	C	
T5	4.13	10	0.39	A	B	C	D
T4	4.09	10	0.39	A	B	C	D
T3	3.90	9	0.41		B	C	D
T10	3.40	9	0.41			C	D
T8	2.86	10	0.39				D
T7	2.80	9	0.41				D
T9	0.60	10	0.39				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

NFLOR

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NFLOR	116	0.48	0.42	33.92

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1048.83	11	95.35	8.63	<0.0001
Tratamiento	1048.83	11	95.35	8.63	<0.0001
Error	1149.61	104	11.05		
Total	2198.44	115			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.05981

Error: 11.0540 gl: 104

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
T11	13.60	10	1.05	A	
T12	13.10	10	1.05	A	B
T1	11.67	9	1.11	A	B
T2	11.30	10	1.05	A	B
T10	10.67	9	1.11	A	B
T5	10.50	10	1.05	A	B
T6	9.80	10	1.05	A	B
T7	9.78	9	1.11	A	B
T3	8.78	9	1.11	A	B
T8	8.70	10	1.05	A	B
T4	8.40	10	1.05		B
T9	1.50	10	1.05		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PFERRAIZ

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PFERRAIZ	116	0.46	0.41	43.99

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	995.99	11	90.54	8.13	<0.0001
Tratamiento	995.99	11	90.54	8.13	<0.0001
Error	1158.12	104	11.14		
Total	2154.11	115			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.07850

Error: 11.1358 gl: 104

Tratamiento	Medias	n	E.E.				
T2	12.15	10	1.06	A			
T5	11.02	10	1.06	A	B		
T11	10.53	10	1.06	A	B		
T12	10.00	10	1.06	A	B		
T1	9.48	9	1.11	A	B	C	
T6	7.33	10	1.06	A	B	C	D
T3	7.24	9	1.11	A	B	C	D
T4	6.53	10	1.06		B	C	D
T10	4.48	9	1.11			C	D
T9	4.05	10	1.06				D
T8	3.85	10	1.06				D
T7	3.82	9	1.11				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

PSECRAIZ

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PSECRAIZ	116	0,25	0,17	57,75

Datos desbalanceados en celdas.
 Para otra descomposición de la SC
 especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	32,81	11	2,98	3,12	0,0011
Tratamiento	32,81	11	2,98	3,12	0,0011
Error	99,48	104	0,96		
Total	132,29	115			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,48840

Error: 0,9565 gl: 104

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
T2	2,38	10	0,31	A
T11	2,33	10	0,31	A
T3	2,26	9	0,33	A
T1	2,22	9	0,33	A
T6	1,95	10	0,31	A
T12	1,82	10	0,31	A
T5	1,78	10	0,31	A
T10	1,46	9	0,33	A
T8	1,11	10	0,31	A
T4	1,06	10	0,31	A
T7	0,99	9	0,33	A
T9	0,97	10	0,31	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

VOLRAIZ

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VOLRAIZ	116	0.64	0.60	31.16

Datos desbalanceados en celdas.
 Para otra descomposición de la SC
 especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1811.72	11	164.70	17.00	<0.0001
Tratamiento	1811.72	11	164.70	17.00	<0.0001
Error	1007.66	104	9.69		
Total	2819.38	115			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=4.73714

Error: 9.6890 gl: 104

Tratamiento	Medias	n	E.E.						
T12	16.17	10	0.98	A					
T11	15.80	10	0.98	A					
T5	14.10	10	0.98	A	B				
T2	12.55	10	0.98	A	B	C			
T6	10.88	10	0.98		B	C	D		
T1	10.44	9	1.04		B	C	D	E	
T10	7.94	9	1.04			C	D	E	F
T3	7.70	9	1.04				D	E	F
T8	7.35	10	0.98				D	E	F
T4	6.83	10	0.98				D	E	F

T7	6.06	9	1.04	E	F
T9	3.25	10	0.98		F
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)</i>					