

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA



**Perfil fungitóxico de bacterias obtenidas de la rizósfera del
espárrago, pimiento y de humus de lombriz**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERA AGRÓNOMA

ELIZABETH PAMELA PLASENCIA SANGAY

TRUJILLO, PERÚ

2019

La presente tesis ha sido revisada y aprobada por el siguiente Jurado:

Ing. Dr. Milton Américo Huanes Mariños
PRESIDENTE

Ing. Dr. Juan Carlos Cabrera La Rosa
SECRETARIO

Ing. César Guillermo Morales Skranboja
VOCAL

Ing. Dr. Martín Augusto Delgado Junchaya
ASESOR

DEDICATORIA

A mis padres, Wilson y Delia, pero sobre todo a ti papito que con tu cariño y tu apoyo me diste la oportunidad de cumplir una de mis metas.

A Sergio, que siempre fuiste, eres y serás la motivación y fortaleza para cualquier reto que yo tenga que asumir.

AGRADECIMIENTO

A Dios padre y a María madre, que caminaron siempre junto a mi guiándome y permitiéndome superar los retos y alcanzar mis metas.

A mis padres, que con un consejo o un regaño sumaron a mi formación profesional.

A mis hermanas, que siempre me dieron su cariño y apoyo cuando las necesite.

A mi hijo Sergio, que con su gran amor me tiene siempre en constante aprendizaje y descubrimiento de diferentes emociones.

Al Dr. Martín Delgado Junchaya, una gran persona que me permitió aprender junto a él no solo concepto científico, sino que también me acompañó con sus sabios consejos de la vida.

A Manuel Ñique y Federico Silva, que ayudaron en la elaboración de esta investigación con sus consejos profesionales y por su gran amistad.

A mis grandes amigos, Giovanna Cassinelli, Lucero Vilchez, Jessarela Vertiz y César Merejildo que me hicieron pasar lindos y gratos años junto a ellos en este camino de aprendizaje.

Y a todas aquellas personas que no menciono les agradezco por colaborar directa o indirectamente conmigo en este camino de aprendizaje.

ÍNDICE

CARATULA	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	i
II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA.....	3
2.1. Generalidades	3
2.2. Géneros de bacterias biocontroladoras	5
2.3. Hongos fitopatógenos utilizados en este estudio.	7
2.3.1. <i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtend.W.C. Snyder and H.N. Hans. .	7
2.3.2. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary.....	7
2.3.3. <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn.....	8
2.3.4. <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.	8
2.3.5. <i>Stemphyllium vesicarium</i> Wallr.....	8
2.3.6. <i>Botrytis cinerea</i> Pers	9
2.3.7. <i>Phytophthora capsici</i> Leonian.	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1. Lugar de Ejecución:	7
3.2. Material Biológico.	7

3.3. Materiales de Laboratorio.....	13
3.4. Medios de cultivo e insumos relacionados.	13
3.5. Equipo de Laboratorio.....	14
3.6. Tratamientos.....	14
3.7.- Metodología para la ejecución del trabajo.....	18
3.7.1. Obtención de aislamientos de hongos fitopatógenos	18
3.7.2. Bacterias antagonistas:.....	18
3.7.3. Evaluación de Antagonismo por Antibiosis.....	18
3.7.4. Diseño estadístico y análisis	19
IV. RESULTADOS.....	18
4.1.Evaluación de la inhibición del desarrollo de hongos fitopatógenos por bacterias antagonistas.....	18
V. DISCUSIÓN	23
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	36
VIII. BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Especies bacterianas analizadas en su potencial antagónico respecto a hongos fitopatógenos. Trujillo, La Libertad, 2014....	7
Cuadro 2. Enfrentamiento de la bacteria <i>Pseudomonas putida</i> (ENA 12) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.	15
Cuadro 3. Enfrentamiento de la bacteria <i>Bacillus cereus</i> (ENA-24) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.	15
Cuadro 4. T-3: Enfrentamiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> (RP-1) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.	16
Cuadro 5. T-4: Enfrentamiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> (RP-18) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.	16
Cuadro 6. T-5: Enfrentamiento de la bacteria <i>Paenibacillus macerans</i> (ALE-155) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.	16
Cuadro 7. T-6: Enfrentamiento de la bacteria <i>Bacillus sphaericus</i> (B-4) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.	17
Cuadro 8. Inhibición del desarrollo fungoso producido por <i>Paenibacillus macerans</i> (ALE 155). Trujillo, La Libertad, 2014 (%).	18
Cuadro 9. Análisis de varianza del nivel de inhibición del desarrollo fungoso producido por <i>Paenibacillus macerans</i> (ALE 155). Trujillo, La Libertad, 2014.	22

Cuadro 10. Prueba Duncan de la inhibición del desarrollo fungoso producido por <i>Paenibacillus macerans</i> (ALE 155). Trujillo, La Libertad, 2014.....	22
Cuadro 11. Porcentaje de inhibición del desarrollo fungoso producido por <i>Bacillus sphaericus</i> GC Subgrupo E (B-4). Trujillo, La Libertad, 2014.....	23
Cuadro 12. Análisis de varianza de inhibición del desarrollo fungoso producido por <i>Bacillus sphaericus</i> GC Subgrupo E (B-4). Trujillo, La Libertad, 2014.	24
Cuadro 13. Prueba Duncan de la inhibición del desarrollo fungoso producido Por <i>Bacillus sphaericus</i> GC Subgrupo E (B-4). Trujillo, La Libertad, 2014.	24
Cuadro 14. Porcentaje de inhibición del desarrollo fungoso producido por <i>Pseudomonas putida</i> (ENA 12). Trujillo, La Libertad, 2014.	25
Cuadro 15. Análisis de varianza de inhibición del desarrollo fungoso producido por <i>Pseudomonas putida</i> (ENA 12). Trujillo, La Libertad, 2014.....	26
Cuadro 16. Prueba Duncan de la inhibición del desarrollo fungoso producido por <i>Pseudomonas putida</i> (ENA 12). Trujillo, La Libertad, 2014.....	26
Cuadro 17. Porcentaje de inhibición del desarrollo fungoso producido por <i>Bacillus cereus</i> (ENA-24). Trujillo, La Libertad, 2014.	27
Cuadro 18. Análisis de varianza de inhibición del desarrollo fungoso producido por <i>Bacillus cereus</i> (ENA-24). Trujillo, La Libertad, 2014.....	28

Cuadro 19. Prueba Duncan al 5% de la inhibición del desarrollo fungoso producido por Bacillus cereus (ENA-24). Trujillo, La Libertad, 2014.....	28
Cuadro 20. Porcentaje de inhibición del desarrollo fungoso producido por Bacillus subtilis (RP-1). Trujillo, La Libertad, 2014.	29
Cuadro 21. Análisis de varianza de la inhibición del desarrollo fungoso producido por Bacillus subtilis (RP-1). Trujillo, La Libertad, 2014.	30
Cuadro 22. Prueba Duncan de la inhibición del desarrollo fungoso producido por Bacillus subtilis (RP-1). Trujillo, La Libertad, 2014.	30
Cuadro 23. Porcentaje de inhibición del desarrollo fungoso producido por Bacillus subtilis (RP-18). Trujillo, La Libertad, 2014.	31
Cuadro 24. Análisis de varianza de inhibición del desarrollo fungoso producido por Bacillus subtilis (RP-18). Trujillo, La Libertad, 2014.....	32
Cuadro 25. Prueba Duncan de la inhibición del desarrollo fungoso producido por Bacillus subtilis (RP-18). Trujillo, La Libertad, 2014.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Ubicación de la bacteria y disco de agar con el hongo en la placa de Petri, donde d_1 y $ d_2$ representan la inhibición del desarrollo del hongo a distintos niveles y D la distancia entre el disco de agar con el hongo y la estría de desarrollo de la bacteria. Trujillo, La Libertad, 2014.	19
--	----

RESUMEN

Se evaluó in vitro, el nivel de inhibición de bacterias aisladas de la rizósfera de espárrago, pimiento y humus de lombriz sobre las diversas especies de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de importancia económica en la región. Las especies bacterianas fueron: *Bacillus subtilis* (RP-1), *Bacillus subtilis* (RP-18), *Bacillus cereus* (ENA-24), *Pseudomonas putida* (ENA 12), *Paenibacillus macerans* (ALE 155) y *Bacillus sphaericus* GC Subgrupo E (B-4) y las especies fungosas fueron: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Stemphyllium vesicarium*, *Lasiodiplodia teobromae*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*. Los enfrentamientos entre las bacterias y los hongos se efectuaron en los medios de cultivo a base de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Agar Nutritivo (AN). Todas las especies bacterianas mostraron habilidad para inhibir los hongos fitopatógenos evaluados, siendo *Botrytis cinerea* el único que no fue inhibido. *Paenibacillus macerans* (ALE 155) fue el aislamiento bacteriano que produjo la mayor inhibición.

ABSTRACT

In vitro, the level of inhibition of bacteria isolated from the rhizosphere of asparagus, pepper and earthworm humus on the various species of phytopathogenic fungi affecting crops of economic importance in the region was evaluated. The bacterial species were: *Bacillus subtilis* (RP-1), *Bacillus subtilis* (RP-18), *Bacillus cereus* (ENA-24), *Pseudomonas putida* (ENA 12), *Paenibacillus macerans* (ALE 155) and *Bacillus sphaericus* GC Subgroup E (B -4) and the fungal species were: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Stemphyllium vesicarium*, *Lasiodiplodia teobromae*, *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. The confrontations between the bacteria and the fungi were carried out in the culture media based on Papa-Dextrose-Agar (PDA) and Nutritive Agar (AN). All the bacterial species showed ability to inhibit the phytopathogenic fungi evaluated, being *Botrytis cinerea* the only one that was not inhibited. *Paenibacillus macerans* (ALE 155) was the bacterial isolate that produced the greatest inhibition.

I. INTRODUCCIÓN

Las plagas y enfermedades constituyen la principal limitante de la producción agrícola. Su control se ha basado en el uso de productos químicos sintéticos, muchos de los cuales han producido, como efecto secundario, problemas de desequilibrio ambiental, de salud humana y el surgimiento de plagas y enfermedades más agresivas y resistentes a ellos. Existe referencia de una alta incidencia de enfermedades y diversos cuadros clínicos por intoxicación en la población, como también se detectan elevados niveles de pesticidas en cosechas y personas. Como consecuencia, se buscan otras alternativas. Las plantas, en su evolución, han desarrollado mecanismos de defensa contra insectos, hongos, bacterias y otros organismos nocivos y los metabolitos secundarios producidos por ellas constituyen una de esas barreras (Martínez y otros, 2010).

El uso de microorganismos modificados o naturales minimiza el daño ocasionado por organismos no deseados en las plantas haciendo que en paralelo estos microorganismos se desarrollen beneficiándola Pérez (2004)

El uso de controladores biológicos para patógenos foliares y del suelo ha recibido considerable atención en los últimos 20 años por la comunidad científica internacional, pues es una de las más eficaces maneras de control de plagas, generando productos “limpios”; es decir, sin contaminantes, lo cual es altamente cotizado en el mercado internacional (Delgado, 2010).

Con el propósito de contribuir en la búsqueda de controladores biológicos en los nichos naturales donde se desarrollan las interacciones hospedante-patógeno, en la presente investigación se ha evaluado el efecto antagónico de diferentes especies bacterianas aisladas de la filósfera, rizósfera o de sustratos orgánicos de nuestro medio sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos de importancia económica en la región y el país.

II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

2.1. Generalidades

Para el buen manejo de enfermedades es importante que se haga el uso de diferentes métodos de control que complementen al uso de agroquímicos. Entre otros métodos de control encontramos los denominados; control físico, control cultural y control biológico, los cuales junto al control químico son denominados como manejo integrado de enfermedades (Agrios, 1997).

En el contexto del control biológico, existen varios mecanismos de acción de las bacterias asociadas a la rizósfera de la planta, entre éstos se encuentra la antibiosis, que se produce por la inhibición o destrucción de un microorganismo debido a productos metabólicos de otros, que incluyen antibióticos, enzimas líticas y compuestos volátiles y difusibles (Fernández, 1998).

Al existir el riesgo de aparición de cepas resistentes, se recomienda que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista para el control de patógenos (Vero y Mondino, 1999). Dennis y Webster (1971), fueron los pioneros en esta temática, con la realización de los trabajos más completos acerca de la función de los antibióticos producidos por hongos del género *Trichoderma* sobre patógenos de las plantas. Los hongos pueden utilizar diferentes mecanismos de acción según su especie y cepa a utilizar. En cuanto a la especie, estos se vinculan con la secreción de diversos antibióticos, competencia por espacio y nutrientes, tolerancia al estrés e inducción de resistencia en la planta (Harman, 2000, Howell, 2003). Existen bacterias y hongos que en su desarrollo son inhibidos por especies que producen metabolitos secundarios, por lo que se ha recomendado hacer su uso como medida de protección para las plantas ante agentes fitopatógenos (Földes y otros,

2000). Según su naturaleza hay enzimas que no solo intervienen en el proceso de penetración y lisis, estas también tienen una actividad antibiótica, así por ejemplo tenemos a la enzima endoquitinaza (Ech42) que origina hidrólisis en paredes del patógeno conocido como *Botrytis cinerea* y que además causa inhibición en tubos germinativos de otros hongos (Carsolio y otros, 1999).

Existen diversas especies de bacterias, especialmente del género *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Erwinia* y *Burkholderia*, y también diferentes géneros de hongos, entre ellos *Trichoderma*, *Beauveria*, *Metharhyzium*, *Paecilomyces* que han demostrado efectos represores de patógenos del suelo y aire (Delgado, 2003).

Hussein y otros, (2007) en investigaciones desarrolladas in-vitro sobre efecto el antagonico de bacterias encontraron que *P. fluorescens*, *B. subtilis* y *T. harzianum* produjeron una detención del desarrollo micelial de *Stemphylium vesicarium* aislado del cultivo de cebolla.

Mediante ensayos in-vitro, Álvarez (2001), encontró que bacterias aisladas de la filósfera y rizósfera de espárrago desarrollado en el agroecosistema de chavimochic, también poseen acción antagonica contra el desarrollo de *Stemphyllium vesicarium* y *Alternaria spp.*, patógenos aislados de las manchas necróticas del tallo de espárrago.

Bajo condiciones epifitóticas muy favorables, Delgado y otros, (2008), efectuaron ensayos para el control biológico de *Stemphylium vesicarium*, agente causal de la mancha púrpura o tizón en espárrago, demostrando que los aislamientos de *Pseudomonas putida* Biotipo B (ENA-12) y *Bacillus cereus* GC Subgrupo A (ENA-24), obtenidos de la filósfera de espárrago y el aislamiento B-4 de *Bacillus sphaericus*, obtenido del humus de lombriz, aplicados juntos a una concentración de 5 L de suspensión bacteriana, con 10^8 ufc/mL o 100 millones de ufc/mL por 200 L de agua, abren la posibilidad de reducir drásticamente el uso de fungicidas para el control de esta enfermedad foliar, que es de alto riesgo en el cultivo de espárrago de La Libertad, Perú.

Se ha encontrado que hay diversidad de antibióticos en las diferentes especies de bacterias como *Brevibacillus*, *Paenibacillus* y *Bacillus* hallando hasta 70 sustancias con actividad antimicrobiana y las cuales mostraron bajo peso molecular y naturaleza polipeptídica, las especies más conocidas con estas propiedades biocidas son; *Brevibacillus laterosporus* y *Paenibacillus polymyxa*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, son los mayores productores (Baker, 1974).

2.2. Géneros de bacterias biocontroladoras

Dentro de las bacterias biocontroladoras se menciona a las *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *fluorescens*, *putida*), *Bacillus* y *Burkholderia*, que son las más experimentadas para el control de enfermedades en plantas. *P.fluorescens* se encuentra en grandes cantidades en la superficie de las raíces y es inestable en su metabolismo, además los sustratos producidos por estas bacterias pueden ser usados y no constituyen una relación simbiótica con la planta. Entre sus mecanismos de acción se encuentran el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la solubilización de fosfatos, la producción de reguladores del crecimiento vegetal, el control biológico de microorganismos fitopatógenos

mediante la producción de sideróforos y antibióticos, así como la inducción de resistencia en la planta, evidenciada en la producción de ácido jasmónico, el cual actúa como una molécula de señalización que activa la “resistencia sistémica inducida” (RSI) (Gato, 2006).

En la superficie foliar de diversas especies de plantas, proliferan muchas bacterias del género *Pseudomonas* dentro de las cuales se encuentran especies que son epifíticas o componentes naturales de la filósfera y otras que son fitopatógenas. Dentro de estas últimas existen bacterias que, a pesar de pertenecer a la misma especie, tienen comportamiento diferente son epifíticas y actúan como controladores biológicos porque secretan más antibióticos que otras, y ejercitan un control por antibiosis (Leben y otros, 1965).

En el grupo de bacterias antagonistas se encuentran los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*, siendo estas aerobias formadoras de endosporas. Entre la variedad de productos comerciales, existen los de uso convencional, tales como fungicidas, nematicidas, insecticidas o promotores de crecimiento vegetal que tienen en su composición aislados pertenecientes a las bacterias anteriormente descritas. (Mc Spadden, 2004). En el género *Bacillus*, la especie *Bacillus subtilis* se destaca por tener una alta actividad como controlador biológico para las enfermedades que provienen de origen bacteriano o fúngico (Fernández-Larrea, 2001). En el control biológico de enfermedades existen diversos mecanismos, los cuales tienen como actividad principal producir excretos de sustancias con actividad biocida, así mismo se conoce a la subtilisina, iturinas y polimixinas; este tipo de mecanismo de control es conocido como antibiosis. (Rahman y otros, 2006).

2.3. Hongos fitopatógenos utilizados en este estudio.

2.3.1. *Fusarium oxysporum* Schlechtend.W.C. Snyder and H.N. Hans.

Su principal daño es marchitez vascular. Los síntomas que se muestran paralelamente al daño vascular se caracterizan por doblamiento de brotes y el amarillamiento parcial de hojas hacia el lado de la planta enferma causadas por una mala conducción de agua y nutrientes. Los brotes no se desarrollan con normalidad observando enanismo y disminución del crecimiento en la planta, en un inicio las hojas solo muestran la mitad de su estructura un color clorótico y la otra mitad un color verde. Finalmente, los síntomas ocasionan un marchitamiento total haciendo que origine la muerte de la planta. (Delgado y col., 2005). Un aspecto muy importante para el diagnóstico de la enfermedad que la diferencia fácilmente de otras enfermedades vasculares es una coloración blanquecina, amarillenta o marrón en los haces vasculares y deshilachamiento de los tejidos sin afectar la médula (Baker, 1980).

2.3.2. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.

Este patógeno afecta toda la parte aérea de la planta, especialmente los tallos, raquis de las hojas y demás tejido succulento. En estas áreas el hongo progresa rápidamente formando tejido acuoso sobre el cual prolifera un micelio de color blanco (Delgado, 2010). Por la naturaleza de esta enfermedad, cuando las condiciones para su desarrollo son favorables, el patógeno ataca todos los órganos aéreos de la planta, especialmente el tejido succulento del tallo, dando como consecuencia que toda la planta se debilite y colapse. Por esta razón su aparición violenta en algunas zonas, como en la región Lima-Norte (Barranca) y Ancash (Santa) ha diezariado notablemente la producción de alcachofa, haciendo que el cultivo, en algunas áreas endémicas, no sea rentable, por los altos costos de producción que demanda (Delgado, 2010).

2.3.3. *Rhizoctonia solani* Kühn

Rhizoctonia solani Kühn es un hongo fitopatógeno con diversos hospederos dentro de los cuales tenemos a cultivos que tienen gran importancia económica en la agricultura, como el tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill) y la papa (*Solanum tuberosum* L.). Forma un micelio de color marrón cuyas hifas son robustas y ramificadas formando un ángulo recto. Desarrolla profusamente en el medio de cultivo a base de Papa-Dextrosa- Agar y cuando el hongo ha agotado el sustrato forma esclerotes, pues el micelio es estéril por lo que no da lugar a conidias (Delgado, 2012).

2.3.4. *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Este hongo es también típico causante de chupadera fungos y presenta micelio blanco con hifas delgadas y hialinas que forman una estructura característica de interconexión entre una célula y otra a manera de gancho (clampa), lo cual permite su identificación al microscopio. También forma esclerotes y tampoco produce conidias (Delgado, 2012). Los esclerocios son altamente viables durante varios años y se encuentran en el suelo, siendo este de importancia vital para ellos según su epidemiología, además del suelo también necesitan condiciones meteorológicas ideales como temperatura, amplios rangos de pH y baja humedad. Es encontrado con elevada actividad en los sustratos que están en etapa de descomposición y en los sustratos vegetales. (Pineda y Polanco, 2005).

2.3.5. *Stemphyllium vesicarium* Wallr.

Es un hongo que causa mancha foliar y en espárrago la denominada “mancha púrpura” y “tizón”, que es una de las amenazas más serias en este cultivo. Es un parásito necrotizante y perfito, es decir, esporula sólo en tejido muerto por éste y forma conidias robustas de color marrón oscuro en conidióforos cortos. El estado teleomórfico de este

patógeno es *Pleospora herbarum*, cuyas estructuras sexuales se forman en peritecios (Dugan, 2006, Delgado, 2010, Delgado, 2016).

2.3.6. *Botrytis cinerea* Pers

Este hongo causa pudrición en flores y frutos preferentemente. Los primeros síntomas se manifiestan como lesiones acuosas, que, si existen condiciones de alta humedad ambiental, pueden devenir muy rápidamente en lesiones necróticas tornándose el tejido afectado de color café grisáceo sobre el cual el patógeno desarrollo abundante micelio, conidióforos y conidias, formando un moho característico, razón por la cual la enfermedad que causa recibe el nombre de “moho gris”. Se conoce como las principales fuentes de inóculo a los tejidos afectados por *Botrytis cinerea*, estos tejidos pueden ser; tallos, frutos, ramas o flores, haciendo que esta enfermedad se disperse aceleradamente siendo más beneficiada en su desarrollo con las condiciones meteorológicas óptimas para su crecimiento (Delgado, 2012, La Torre, 1995, Williamson y otros, 2007).

2.3.7. *Phytophthora capsici* Leonian.

Es un organismo que pertenece al reino Chromista, clase Oomycetes, orden Peronosporales y familia Pythiaceae y que por mucho tiempo fue considerado como un hongo (Agrios, 1998). Este patógeno causa pudrición radicular en los cultivos de zanahoria, pimiento, calabaza y además en los frutos de tomate, berenjena, pimiento y cucurbitáceas, además de otras plantas (Wasilva y col., 1995). Este patógeno aparece en zonas oscuras del tronco y causa síntomas de humedecimiento de la corteza en la zona de la raíz principal o en el tallo que se encuentra por debajo de la superficie del suelo ocasionando que los órganos aéreos se marchiten (Ristaino y Johnston, 1999). Si la planta es pequeña y suculenta, el ennegrecimiento puede rodear todo el tallo en poco tiempo y el sistema radicular llega a pudrirse generando así la muerte total de la

planta. *P. capsici* puede infectar a la planta en todos sus estadios de crecimiento cuando las condiciones son favorables (Castrejon y Rodriguez, 1984). El patógeno daña a sus hospedantes en casi cualquier parte del mundo donde la temperatura se mantiene casi siempre baja (entre 15 y 23°C) y el suelo es lo suficientemente húmedo como para permitir el desarrollo normal de las plantas susceptibles. *P. capsici* se reproduce tanto sexual como asexualmente, siendo esta última la que le permite al patógeno, mediante la producción de sus esporangios, propagarse abundantemente cuando las condiciones son favorables. *P. capsici* infecta a frutos carnosos, como los de las cucurbitáceas que yacen sobre un suelo húmedo e infestado por el patógeno. Este organismo tiene escasa habilidad saprofitica (Bowers, Papavizas, y Johnston, 1990, Hwang y Kim, 1995, Zitter, Hopkins, y Thomas, 1998).

2.3.8. Lasiodiplodia theobromae

(Pat) *Lasiodiplodia theobromae* (Pat) Griffon & Maublanc. Es un hongo que causa muerte regresiva en palto, mango, vid y otras especies de importancia económica. Cuando ingresa a la planta causa desecamiento de ramas y ramillas terminales, canchales en ramillas, ramas y tronco, exudación blaquecina (como sal) que la produce la planta, no el patógeno, decoloración vascular de color marrón y la corteza se separa fácilmente, frutos con lesiones oscuras hundidas y deprimidas, con pérdida de consistencia (como las causadas por antracnosis), defoliación y muerte del árbol (Rodriguez-Galvéz, 2010).

Las hifas de este patógeno son septadas, ramificadas y de color marrón oscuro cuando el micelio madura. Forman estructuras de fructificación asexual llamadas picnidios que son piriformes con paredes marrón oscuro y una cavidad ubicada en la parte apical (ostiolo), por donde son expulsadas las conidias que son de color claro, hialinas y carecen de septas cuando están inmaduras y cambian de color a marrón

oscuro con una septa cuando maduran. Los picnidios se forman en los tejidos infectados de la corteza, en presencia de alta humedad relativa e incidencia de luz solar (Rodríguez - Galvéz, 2010).

L. theobromae, en medio in-vitro, forma colonias mesuradamente pesadas, con micelio aéreo, inicialmente blanco tornándose gris-oliváceo a los 7 días y que toman un color negro mientras va pasando el tiempo. Las temperaturas que ayudan al desarrollo de este hongo son 15 °C mínima, 28 °C como óptima y 40 °C como máxima. La esporulación es favorecida por fotoperiodos de más de 16 horas de exposición de luz lo que permite la formación de picnidios; por el contrario, una exposición menor a 4 horas de luz diaria en un periodo de 23 días inhibe la esporulación del hongo (Picos, 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de Ejecución:

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Privada Antenor Orrego de la ciudad de Trujillo, provincia de Trujillo, región La Libertad.

3.2. Material Biológico.

- Especies bacterianas provenientes de la filósfera y rizósfera de espárrago, de pimiento y humus de lombriz, que a continuación se detallan:

Cuadro 1. Especies bacterianas analizadas en su potencial antagónico respecto a hongos fitopatógenos. Trujillo, La Libertad, 2014.

N°	AISLAMIENTO NOMBRE CIENTÍFICO	CÓDIGO	PROCEDENCIA
1	<i>Pseudomonas putida</i>	ENA – 12	Filósfera de espárrago
2	<i>Bacillus cereus</i>	ENA – 24	Filósfera de espárrago
3	<i>Paenibacillus macerans</i>	ALE – 155	Rizósfera de espárrago
4	<i>Bacillus subtilis</i>	RP – 1	Rizósfera de pimiento
5	<i>Bacillus subtilis</i>	RP – 18	Rizósfera de pimiento
6	<i>Bacillus sphaericus</i> GC	B – 4	Humus de lombriz

Subgrupo E

- Hongos fitopatógenos: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*, *Botrytis cinerea*, *Stemphyllium vesicarium*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*.
- Chromista Oomycete: *Phytophthora capsici*.

3.3. Materiales de Laboratorio

- Placas de Petri.
- Matraz de 500mL
- Tubos de ensayo 30 x 2.5mL
- Probeta de 1L.
- Sacabocado 1 cm diámetro.
- Trípode y malla de asbesto
- Asa de Kohle.
- Algodón
- Pinzas
- Tijeras
- Parafilm
- Papel aluminio- 8.33YD.18IN.3.48m².7.62mx457mm
- Mechero bunsen
- Plumones indelebles
- Bolsas de polietileno

3.4. Medios de cultivo e insumos relacionados.

- Medio de cultivo a base de Papa-Dextrosa-Agar (PDA 2%)

PDA (PAPA DEXTROSA-AGAR)

39g/1L

Agar

20g/1L

- Medio de cultivo **AGAR NUTRITIVO (AN 2%)**

Agar Nutritivo

20g/ 1L (el contenido de agar en el medio es sólo de 1%)

Agar

8g/1L

Si el medio está liofilizado con 1.0 ó 1.5% ya no es necesaria esta adición

Agua destilada

1 L

Luego se autoclavizó a 121°C / 15 lbs/pulg²/ 15´

La enmienda consistió en 200 ppm de ampicilina y 200ppm de cloranfenicol. Ésta se adicionó después de la autoclavización del medio y cuando la temperatura había descendido a 60°C.

- Agar-agar deshidratado
- Cápsulas de antibiótico chloranfenicol 500mg
- Cápsulas de antibiótico ampicilina 500mg
- Alcohol puro o de 96%
- Agua destilada

3.5. Equipo de Laboratorio

- Microscopio.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Cocina eléctrica.
- Cámara fotográfica

3.6. Tratamientos

Se consideraron 6 tratamientos con 5 repeticiones. Los tratamientos se exponen en los cuadros 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

Cuadro 2. Enfrentamiento de la bacteria *Pseudomonas putida* (ENA 12) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.

T-1

BACTERIA	HONGO
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	<i>Sclerotium rolfsii</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>capsici</i>
	<i>Botrytis cinerea</i>
ENA – 12	<i>Stemphyllium vesicarium</i>
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
	<i>Phytophthora capsici</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>

Cuadro 3. Enfrentamiento de la bacteria *Bacillus cereus* (ENA-24) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.

T-2

BACTERIA	HONGO
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	<i>Sclerotium rolfsii</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>capsici</i>
	<i>Botrytis cinérea</i>
ENA – 24	<i>Stemphyllium vesicarium</i>
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
	<i>Phytophthora capsici</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>

Cuadro 4. Enfrentamiento de la bacteria *Bacillus subtilis* (RP-1) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.

T-3

BACTERIA	HONGO
RP-1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	<i>Sclerotium rolfsii</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>capsici</i>
	<i>Botrytis cinérea</i>
	<i>Stemphyllium vesicarium</i>
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
	<i>Phytophthora capsici</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>

Cuadro 5. Enfrentamiento de la bacteria *Bacillus subtilis* (RP-18) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.

T-4

BACTERIA	HONGO
RP-18	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	<i>Sclerotium rolfsii</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>capsici</i>
	<i>Botrytis cinerea</i>
	<i>Stemphyllium vesicarium</i>
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
	<i>Phytophthora capsici</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>

Cuadro 6. Enfrentamiento de la bacteria *Paenibacillus macerans* (ALE-155) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.

T-5

BACTERIA	HONGO
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	<i>Sclerotium rolfsii</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>capsici</i>
	<i>Botrytis cinerea</i>
ALE - 155	<i>Stemphyllium vesicarium</i>
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
	<i>Phytophthora capsici</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>

Cuadro 7. Enfrentamiento de la bacteria *Bacillus sphaericus* (B-4) con las ocho especies de hongos fitopatógenos consideradas en este estudio. Trujillo, La Libertad, 2014.

T-6

BACTERIAS	HONGO
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	<i>Sclerotium rolfsii</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>capsici</i>
	<i>Botrytis cinerea</i>
B-4	<i>Stemphyllium vesicarium</i>
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
	<i>Phytophthora capsici</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>

3.7.- Metodología para la ejecución del trabajo

3.7.1. Obtención de aislamientos de hongos fitopatógenos

Los aislamientos fueron obtenidos de plantas infectadas en la zona radicular y/o foliar. Para tal fin las muestras de material afectado seleccionadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% y luego enjuagadas con agua estéril, se cortaron en pequeños trocitos (2-4mm) que incluía el tejido infectado y fueron transferidas a placas de Petri conteniendo Papa-Dextrosa-Agar (PDA). El material tratado se sembró a razón de 10 trocitos por placa de Petri.

3.7.2. Bacterias antagonistas:

Los aislamientos bacterianos utilizados en esta investigación fueron proporcionados por la Empresa Insumos Biológicos E.I.R.L. y se exponen en el Cuadro 1. Las especies bacterianas fueron propagadas en medio AN.

3.7.3. Evaluación de Antagonismo por Antibiosis

Se realizó el enfrentamiento de cada especie bacteriana con los aislamientos de hongos fitopatógenos indicados. Para lo cual se sembró cada aislamiento bacteriano haciendo una estría o raya al centro de cada placa Petri que contenía el medio de cultivo PDA. Luego se colocaron dos discos de agar con el hongo fitopatógeno a ambos lados de la estría dejando un distanciamiento entre la estría y el disco de aproximadamente 22 mm. Las placas sembradas fueron incubadas a temperatura ambiente hasta que el hongo desarrollara completamente hacia el margen opuesto a la estría con la bacteria antagonista y se haga evidente la inhibición por antibiosis. Posteriormente se midió con una regla milimétrica el espacio comprendido entre los límites de las colonias de la bacteria y del hongo: **zona de inhibición**, lo cual constituyó un dato

referencial del antagonismo que presentó cada bacteria (d1 y d2, Fig.1), luego se procedió a sacar el porcentaje de inhibición obteniendo primero el promedio $d1+d2 / 2=di$ y posteriormente la fórmula: **Inhibición % = $di \times 100 / D$**

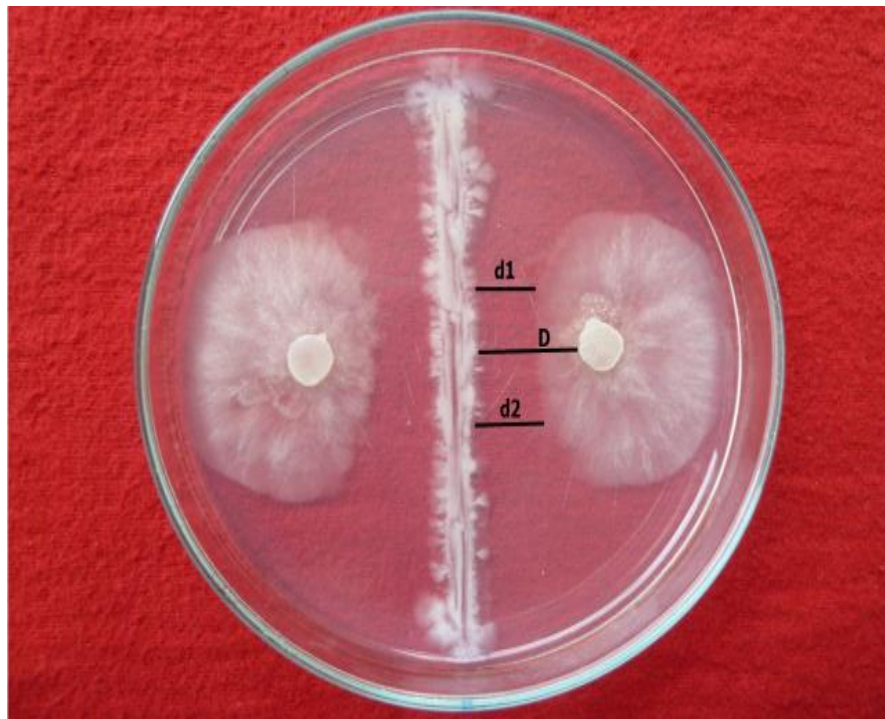


Figura 1. Ubicación de la bacteria y disco de agar con el hongo en la placa de Petri, donde d1 y d2 representan la inhibición del desarrollo del hongo a distintos niveles y D la distancia entre el disco de agar con el hongo y la estría de desarrollo de la bacteria. Trujillo, La Libertad, 2014.

3.7.4. Diseño estadístico y análisis

El diseño estadístico que se empleó para la evaluación del nivel de inhibición del desarrollo del hongo causado por la bacteria antagonista fue completamente al azar con ocho tratamientos y cinco repeticiones. Para el análisis de varianza, cuando un porcentaje de inhibición fue 0, se les sumó a todos los datos la cifra de 1.81. Los datos porcentuales fueron transformados a

arco seno $\sqrt{}$, según Calzada (1964), la información obtenida del análisis de varianza fue sometida a la prueba Duncan, utilizando el programa SPSS® en su versión 16.5 (UPAO).

IV. RESULTADOS

4.1. Evaluación de la inhibición del desarrollo de hongos fitopatógenos por bacterias antagonistas.

Paenibacillus macerans (ALE 155)

Cuadro 8. Inhibición del desarrollo fungoso producido por *Paenibacillus macerans* (ALE 155). Trujillo, La Libertad, 2014 (%).

TRATAMIENTOS	REPETICIÓN					MEDIA ±
	I	II	III	IV	V	DESV ESTÁNDAR
<i>Paenibacillus macerans</i> (ALE 155) VS						
<i>Stemphyllium vesicarium</i>	74.88	73.26	72.74	72.64	90.00	76.70 ± 6.70
<i>Phytophthora capsici</i>	64.23	67.29	63.08	67.13	72.74	66.89 ± 3.35
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	57.04	54.21	53.43	51.88	49.49	53.21 ± 2.50
<i>Botrytis cinérea</i>	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81 ± 0.00
<i>Sclerotium rolfsii</i>	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00 ± 0.00
<i>Fusarium oxysporum</i>	50.94	68.28	72.74	66.66	63.94	64.51 ± 7.36
<i>Rhizoctonia solani</i>	69.30	52.65	52.18	76.06	62.80	62.60 ± 9.31
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	70.91	64.67	68.28	55.80	55.12	62.96 ± 6.44

Cuadro 9. Análisis de varianza del nivel de inhibición del desarrollo fungoso producido por *Paenibacillus macerans* (ALE 155). Trujillo, La Libertad, 2014.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	23471.8013	7	3353.11447	87.7035271	4.6593E-19
Dentro de los grupos	1223.43612	32	38.2323788		
Total	24695.2374	39			
PROMEDIO	59.8355				
CV	10%				

Cuadro 10. Prueba Duncan de la inhibición del desarrollo fungoso producido por *Paenibacillus macerans* (ALE 155). Trujillo, La Libertad, 2014.

TRATAMIENTO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA
<i>Paenibacillus macerans</i> (ALE 155)		
vs		
<i>Sclerotium rolfsii</i> .	90.00	a
<i>Stemphyllium vesicarium</i>	76.70	b
<i>Phytophthora capsici</i>	66.89	c
<i>Fusarium oxysporum</i>	64.51	c
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	62.95	c
<i>Rhizoctonia solani</i>	62.59	c
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	53.21	d
<i>Botrytis cinerea</i>	1.81	e

En el Cuadro 9 el Análisis de Varianza, muestra para los tratamientos diferencias altamente significativas. El Coeficiente de Variación fue de 10%, que es un indicador confiable para este tipo de

Cuadro 12. Análisis de varianza de inhibición del desarrollo fungoso producido por *Bacillus sphaericus* GC Subgrupo E (B-4). Trujillo, La Libertad, 2014.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	24970.3744	7	3567.19634	256.18522	3.05E-26
Dentro de los grupos	445.57716	32	13.9242863		
Total	25415.9515	39			
PROMEDIO	25.5665				
CV	14%				

Cuadro 13. Prueba Duncan de la inhibición del desarrollo fungoso producido Por *Bacillus sphaericus* GC Subgrupo E (B-4). Trujillo, La Libertad, 2014.

TRATAMIENTO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA
<i>Bacillus sphaericus</i> GC Subgrupo E (B-4)		
VS		
<i>Stemphyllium vesicarium</i>	67.38	a
<i>Lasiodiplodia teobromae</i>	48.58	b
<i>Phytophthora capsici</i>	41.69	c
<i>Fusarium oxysporum</i>	39.62	c
<i>Botrytis cinerea</i>	1.81	d
<i>Rhizoctonia solani</i>	1.81	d
<i>Sclerotium rolfsii</i>	1.81	d
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1.81	d

Cuadro 15. Análisis de varianza de inhibición del desarrollo fungoso producido por *Pseudomonas putida* (ENA 12). Trujillo, La Libertad, 2014.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	15420.6192	7	2202.94561	334.795437	4.5387E-28
Dentro de los grupos	210.5592	32	6.579975		
Total	15631.1784	39			
PROMEDIO	25.932				
CV	10%				

Cuadro 16. Prueba Duncan de la inhibición del desarrollo fungoso producido por *Pseudomonas putida* (ENA 12). Trujillo, La Libertad, 2014.

TRATAMIENTO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA
<i>Pseudomonas putida</i> (ENA 12) VS		
<i>Stemphylium vesicarium</i>	51.98	a
<i>Fusarium oxysporum</i>	42.30	b
<i>Phytophthora capsici</i>	41.81	b
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	37.50	c
<i>Rhizoctonia solani</i>	28.44	d
<i>Botrytis cinérea</i>	1.81	e
<i>Sclerotium rolfsii</i>	1.81	e
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1.81	e

Cuadro 18. Análisis de varianza de inhibición del desarrollo fungoso producido por *Bacillus cereus* (ENA-24). Trujillo, La Libertad, 2014.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	20258.2779	7	2894.0397	161.543929	4.04E-23
Dentro de los grupos	573.27608	32	17.9148775		
Total	20831.554	39			
PROMEDIO	27.8055				
CV	15%				

Cuadro 19. Prueba Duncan al 5% de la inhibición del desarrollo fungoso producido por *Bacillus cereus* (ENA-24). Trujillo, La Libertad, 2014.

TRATAMIENTO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA
<i>Bacillus cereus</i> (ENA-24) VS		
<i>Stemphyllium vesicarium</i>	62.66	a
<i>Phytophthora capsici</i>	49.01	b
<i>Fusarium oxysporum</i>	45.70	b
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	33.78	c
<i>Rhizoctonia solani</i>	25.86	d
<i>Botrytis cinerea</i>	1.81	e
<i>Sclerotium rolfsii</i>	1.81	e
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1.81	e

El Análisis de Varianza, expuesto en el Cuadro 18, arroja diferencias altamente significativas entre los tratamientos. El Coeficiente de Variación es de 15%.

En la Prueba de Duncan, al 5% de significancia, se contrasta la inhibición del de los hongos fitopatógenos en estudio por el aislamiento bacteriano *Bacillus cereus* (ENA-24). La Prueba muestra que la mayor inhibición se observó en el hongo *Stemphylium vesicarium*, con un promedio de 62.66% y que también se registró significativa inhibición de los fitopatógenos *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Lasiodiplodia theobromae*. No se encontró inhibición del desarrollo fungoso frente a *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotium rolfsii*.

***Bacillus subtilis* (RP-1).**

Cuadro 20. Porcentaje de inhibición del desarrollo fungoso producido por *Bacillus subtilis* (RP-1). Trujillo, La Libertad, 2014.

TRATAMIENTO <i>Bacillus subtilis</i> (RP-1) VS	REPETICIÓN					MEDIA ± DESV ESTÁNDAR
	I	II	III	IV	V	
<i>Stemphyllium vesicarium</i>	73.05	64.82	80.54	65.88	72.34	71.33 ± 5.67
<i>Phytophthora capsici</i>	64.30	60.60	57.67	65.20	64.75	62.50 ± 2.92
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	33.89	45.23	44.14	45.80	46.89	43.19 ± 4.73
<i>Botrytis cinerea</i>	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81	1.81 ± 0.00
<i>Sclerotium rolfsii</i>	70.00	46.20	48.85	39.64	47.93	50.52 ± 10.26
<i>Fusarium oxysporum</i>	46.09	34.14	27.90	33.46	30.92	34.50 ± 6.20
<i>Rhizoctonia</i> sp.	31.44	31.63	23.81	32.77	34.33	30.80 ± 3.64
<i>Sclerotinia</i> sp.	28.52	37.29	30.79	33.46	32.83	32.58 ± 2.92

Cuadro 21. Análisis de varianza de la inhibición del desarrollo fungoso producido por *Bacillus subtilis* (RP-1). Trujillo, La Libertad, 2014.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	16153.2433	7	2307.60619	64.6387472	4.46E-17
Dentro de los grupos	1142.40144	32	35.700045		
Total	17295.6447	39			
PROMEDIO	40.90375				
CV	15%				

Cuadro 22. Prueba Duncan de la inhibición del desarrollo fungoso producido por *Bacillus subtilis* (RP-1). Trujillo, La Libertad, 2014.

TRATAMIENTO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA
<i>Bacillus subtilis</i> (RP-1) VS		
<i>Stemphyllium vesicarium</i>	71.33	a
<i>Phytophthora capsici</i>	62.50	b
<i>Sclerotium rolfsii</i>	50.52	c
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	43.19	c
<i>Fusarium oxysporum</i>	34.50	d
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	32.58	d
<i>Rhizoctonia solani</i>	30.80	d
<i>Botrytis cinerea</i>	1.81	e

Cuadro 24. Análisis de varianza de inhibición del desarrollo fungoso producido por *Bacillus subtilis* (RP-18). Trujillo, La Libertad, 2014.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	9058.1262	7	1294.01803	452.43507	3.91E-30
Dentro de los grupos	91.5238	32	2.86011875		
Total	9149.65	39			
PROMEDIO	10.487				
CV	16%				

Cuadro 25. Prueba Duncan de la inhibición del desarrollo fungoso producido por *Bacillus subtilis* (RP-18). Trujillo, La Libertad, 2014.

TRATAMIENTO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA
<i>Bacillus subtilis</i> (RP-18)		
<i>Phytophthora capsici</i>	38.04	a
<i>Stemphylium vesicarium</i>	34.99	b
<i>Botrytis cinerea</i>	1.81	c
<i>Fusarium oxysporum</i>	1.81	c
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	1.81	c
<i>Rhizoctonia solani</i>	1.81	c
<i>Sclerotium rolfsii</i>	1.81	c
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1.81	c

El Cuadro 24 revela el Análisis de Varianza de la inhibición del complejo fungoso en estudio, por parte del antagonista *Bacillus subtilis* (RP-18) con un Coeficiente de Variación de 16%.

La Prueba de Duncan muestra (Cuadro 25) muestra que *B. subtilis* (RP-18) inhibió significativamente el desarrollo solo de *Phytophthora capsici* (38.04%) y *Stemphylium vesicarium* (34.99%), no encontrándose inhibición de *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f sp. *capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* y *Lasiodiplodia theobromae*.

V. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha evaluado el potencial antagónico de seis especies bacterianas sobre el desarrollo de ocho fitopatógenos: siete hongos y un Oomycete. Los resultados arrojan claras evidencias de diferentes niveles de inhibición del desarrollo de los fitopatógenos con excepción de *Botrytis cinerea* cuyo desarrollo no fue inhibido por ninguna de las especies bacterianas en estudio. Respecto a la inhibición causada por *Pseudomonas putida* (ENA-12), *Bacillus cereus* (E-24) y *Paenibacillus macerans* (ALE-155), nuestros resultados coinciden con los obtenidos según Álvarez (2001), quien demostró también la acción antagónica de las tres especies antes mencionadas contra el desarrollo de *Stemphylium vesicarium* y *Alternaria spp.* Similares resultados han sido reportados por Gato (2006) y Rodríguez y Hernández (2009).

Bajo condiciones de campo según Delgado y otros (2008), demostraron que *P. putida* (ENA-12), *B. cereus* (ENA-24) y *B. sphaericus* (B-4) ejercieron un significativo control de *Stemphylium vesicarium*, agente causal de la mancha púrpura o tizón en espárrago. En relación a la actividad antagónica registrada por *Bacillus subtilis*, los resultados obtenidos en este trabajo son concordantes con los reportados según Hussein y col., (2007) citados por Saguma (1995), quienes en investigaciones desarrolladas in-vitro encontraron que, entre otros antagonistas bacterianos y fungosos, *B. subtilis* también produjo una detención del desarrollo micelial de *Stemphylium vesicarium* aislado del cultivo de cebolla.

En este estudio se observó efecto antagónico in-vitro de *Bacillus subtilis* (RP 1 – RP 18) frente a los diferentes fitopatógenos, destacándose que *B. subtilis* (RP 1) generó mayor inhibición de *Stemphyllium vesicarium*, mientras que *B. subtilis* (RP 18) fue el que más inhibió a *Phytophthora capsici*. El efecto inhibitorio que se observó en *Bacillus* concuerda también con lo encontrado por Sneh y otros, (1984), Loeffler (1986); Weller y Tomashow (1990), especialmente del *Bacillus subtilis* y su potencial antagónico por antibiosis sobre hongos entre ellos *Rhizoctonia solani*. Según Fernandez-Larrea (2001) citado por Saguma (1995), sostiene que *B. subtilis* está entre las especies de mayor actividad en el control biológico de enfermedades de origen fúngico y bacteriano.

Botrytis cinerea es el único fitopatógeno que no fue inhibido por los antagonistas bacterianos usados en este estudio. Sin embargo, según Wang y otros, (2009) citado por Saguma (1995) demostraron que el aislamiento EB 28 de *Bacillus subtilis* que capaz de inhibir la enfermedad causada por *B. cinerea* En este trabajo el desarrollo micelial de este fitopatógenos no fue inhibido por ninguna de los aislamientos de *Bacillus subtilis* (RP-1 y RP-18).

En esta investigación se ha evaluado la inhibición del desarrollo de hongos fitopatógenos pero no se ha investigado la naturaleza de los compuestos responsables de esta inhibición. Por la identidad del antagonista, se estima, que estas sustancias sean de naturaleza antibiótica según Baker y Cook, 1974, Loeffler y otros, 1986, Homma y otros, 1989, Weller y Thomashow, 1990 citados por Saguma (1995) y para el caso de *P. putida* puede tratarse de sideróforos según Howell y Stipanovic (1979), Loeffler (1986), Leong (1986) y Weller y Tomashow (1990), Parke (1990), citados por Saguma (1995).

Sostiene que un determinado agente biocontrolador puede operar a través de más de un mecanismo. Según Howell y Stipanovic (1979) citados por Saguma (1995) demostraron que los antibióticos Pyoluteorin y Pyrrolnitrin obtenidos de *Pseudomonas fluorescens* pf-5 son efectivos inhibidores de *Rhizoctonia solani*. Según Homma y otros, (1989) citado por Saguma (1995), estudiaron el antibiótico producido por *Pseudomonas cepacia* RB-425 identificado como Pyrrolnitrin el que mostró una gran actividad contra diferentes especies de hongos incluyendo *Rhizoctonia solani*.

VI. CONCLUSIONES

Las especies *Bacillus subtilis* (RP-18), *Bacillus subtilis* (RP-1), *Bacillus cereus* (ENA-24), *Pseudomonas putida* (ENA 12) y *Bacillus sphaericus* GC Subgrupo E (B-4) mostraron diferentes comportamientos frente al desarrollo de los hongos fitopatógenos ensayados.

Paenibacillus macerans (ALE-155) fue el aislamiento que mayor inhibición del desarrollo de los fitopatógenos mostró.

Pseudomonas putida (ENA 12) y *Bacillus cereus* (ENA-24) no inhibieron a *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Bacillus subtilis (RP-18) no inhibió el desarrollo de *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum f.sp. capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* y *Lasiodiplodia theobromae*.

Ningún antagonista inhibió el desarrollo de *Botrytis cinerea*.

RECOMENDACIONES

Realizar trabajos en campo para probar el efecto inhibitorio de estos microorganismos contra el complejo de hongos fitopatógenos, especialmente los patógenos del suelo.

Continuar los estudios para lograr la inhibición del hongo *Botrytis cinérea*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N. 1997. Fitopatología. De Limusa, México, D.F. 756 pp.
- Álvarez, A. 2001. Ensayos sobre el control biológico de *Stemphylium vesicarium* Wallr. y *Alternaria* sp. en espárrago (*Asparagus officinalis* L.) mediante bacterias antagonistas. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo. Perú. 101pp.
- Baker, E. F and Cook, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman & Co. San Fransisco. 433pp.
- Baker, R. 1980. Measures to control *Fusarium* and *Phialophora* wilt of carnations. Plant Disease 64: 743- 749.
- Bowers, J.H; Papavizas, G.C; and Johnston, S.A. 1990. Effect of soil temperature and soil-water matric potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. Plant Disease. 74: 771 – 777.
- Calzada, B. J. 1964. Métodos Estadísticos para la Investigación. Ed. Los Manzanos 314, Orrantia, Lima, Perú. 465-466 pp.
- Carsolio, C., Benhamou, N, Haran, S, Cortés C, Gutierrez A., Chet I, Herrera-Estrella A.1999.Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Appl Environ Microbiol. 65: 929-935.
- Castrejon, A. y Rodriguez, R. 1984. Algunos aspectos fisiológicos del síndrome del marchitamiento del Chile causado por *Phytophthora capsici*. Agrociencia, 56: 47-55.

Delgado, J.M.A. 2003. Patosistema de espárrago. Curso de Profesionalización EPIA, FCA, UPAO. 15 p.

Delgado, J. M. A. 2010. Manejo ecológico e integrado de plagas y enfermedades. Control biológico de enfermedades. Curso de Doctorado. Programa de Doctorado en Agricultura Sustentable. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú. 21p.

Delgado, J. M.A. 2012. Fitopatología Agrícola. Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Privada Antenor Orrego. Impreso. 268p.

Delgado, M.A., Elmer, W. y Nirenberg, H. 2005. Especies de *Fusarium* asociadas a los sistemas vascular y cortical del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en La Libertad, Perú. *Fitopatología*, 40: 23-34.

Delgado, M., Velásquez, E., Bacilio, G, Ñique, M., Rubio, Z., Paz, E., Dickstein, H. y Castillo, L. 2008. Investigación en el control biológico de *Stemphylium vesicarium* en espárrago (*Asparagus officinalis* L.) mediante antagonistas bacteriales bajo condiciones de campo. XX Congreso Peruanos de Fitopatología.

Dennis, L. y Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III Hyphal interaction. *Trans Br Mycol Soc*, 57:363-369.

Dugan, F.M. 2006. The identification of Fungi. An illustrated Introduction with Keys, Glossary, and Guide to Literature. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota U.S.A. 176 p.

Fernández, Y. 1998 Evaluación de diferentes medios para la producción de metabolitos secundarios a partir de las cepas de *Pseudomonas spp.* Trabajo de diploma. Universidad de La Habana. p1.

Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario, Manejo Integrado de Plagas 62:96-100 Rahman, M. S.; T. Ano; M. Shoda. 2006. Second Stage Production of Iturin A by Induced Germination of *Bacillus subtilis* RB14. Journal of Biotechnology 18:226-229.

Földes, T., Banhegyi, I., Varga, Z., Szageti, J. 2000. Isolation of *Bacillus* Strains from the Rhizosphere of Cereals and in vitro Screening for Antagonism Against Phytopathogenic, Food-Borne Pathogenic and Spoilage Microorganisms, Journal of Applied Microbiology 89:840-845.

Gato, I. 2006 Evaluación de bacterias antagonistas en el control de enfermedades fúngicas foliares del tomate en condiciones de cultivo protegido. Tesis para obtener el Título Académico de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara, Cuba. 64 p.

Harman, G. E. 2000 Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes in Perceptions Research on *Trichoderma harzianum* t-22, Plant Disease 84:377- 393.

Howell, C. R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. Plant Disease, 87:4-10.

Hussein, A., Hassan, H., Allam, D. and Abo-Elyousr, A. 2007. Management of *Stemphylium* blight of onion by using biological agent and resistance inducers. Egyptian Journal Phytopathology 35:49-60.

Hwang, B. K; and Kim, C. H. 1995. *Phytophthora* Blight of Pepper and its control in Korea. Plant Dis. 79: 221 - 227

La Torre B, 1995. Enfermedades de las plantas cultivadas. 2a ed. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile. 62 p.

Leben, C. 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. Annu. Rev. Phytopathology 3:209-230.

Leben, C.; Daft, C.; Wilson, D. AND Winter, F. 1965. Field tests for disease control by an epiphytic bacterium. Phytopathology 55:1375-1376.

Lehmann-Danzinger, H. 2004. Introduction to integrated pest management of plant diseases and pests in the tropics/subtropics. Germany University of Göttingen. 396 p.

Martínez, S., Terrazas, E., Alvarez, T., Mamani, O., Vila, J., Mollinedo, P. 2010. Actividad antifúngica in vitro de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre fitopatógenos. Revista Boliviana de Química. 27: 13-18.

McSpadden, B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. Phytopathology, 94:1252-1258.

Pérez, C. N. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. La Habana, Cuba. Editorial Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. 127 – 284 p.

Pineda, J. B. y Polanco, C. D. 2005. Control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en *Phaseolus vulgaris* mediante la utilización de *Penicillium notatum* Westl, Agronomía Tropical, 31:265-281.

Rahman, M. S., T. Ano, M. Shoda. 2006. Second Stage Production of Iturin A by Induced Germination of *Bacillus subtilis* RB14. *Journal of Biotechnology* 18:226-229.

Ristaino, J.B., Johnston, S.A. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on Bell Pepper. *Plant Dis.* 83, 1080-1089.

Rodríguez, C. V. y Hernández, M. J. M. 2009. Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp. Tesis para obtener los Títulos Académicos de Microbiólogo Agrícola-Veterinario y Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 61 p.

Saguma, A.A. 1995. Estudio comparativo del efecto protector de fungicidas y antagonistas biológicos contra el agente causal de la chupadera fungosa del algodónero *Rhizoctonia solani* khün en condiciones de laboratorio y tinglado en Piura, Perú. 74p-103p.

Sneh, B., Dipler, M., Elad, Y., and Kaker, R. 1984. *Chlamydo-spore* germination of *Fusarium oxysporum* f.sp. cucumerium as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium* – suppressive soil. *Phytopathology*, 74:1115 – 1124.

Vero, S.M. y Mondino, P. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional*, 7:1-10.

Wang, S.; Hu, T.; Jiao, Y.; Wei, J. and Cao, K. (2009). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* EB-28, an endophytic bacterium strain displaying biocontrol activity against *Botrytis cinerea* Pers. *Frontiers of Agriculture China*, 3: 247-252

Wasilva, L.A; Correl; J.C; and Morelock, T.E. 1995. *Phytophthora* blight of Squash Caused by *Phytophthora capsici* in Arkansas. Plant Dis, 79: 1188.

Williamson, B., Tudzynski, B. and Van Kan, J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology, 8:561–580

Zitter, T.A., Hopkins, D.L., Thomas, C.E. 1998. Compendium of cucurbit diseases. APS PRESS The American Phytopathological Society, 19-22 pp.