

Incidência de dois antagonistas (*Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum*) sobre pathogens em culturas pepper (*Capsicum annuum* L.) Na área de Babahoyo, província Los Rios

Incidence of two antagonists (*Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*) on pathogens in pepper crops (*Capsicum annuum* L.) In the Babahoyo area, Los Rios province

DOI: 10.34188/bjaerv5n3-011

Recebimento dos originais: 06/05/2022

Aceitação para publicação: 30/06/2022

Gustavo Vásconez Galarza

Master en Agroecología y Agricultura Sostenible por la Universidad Agraria del Ecuador
Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias
Km 7,5 vía Babahoyo-Montalvo, Ecuador
Correo electrónico: gvasconez@utb.edu.ec

Ángel Torres García

Magister en Educación mención en pedagogía por la Universidad Tecnológica Empresarial de Guayaquil, Ecuador
Docente de la Unidad Educativa Ciudad de Valencia
Dirección: Valencia Av 13 de diciembre y calle 10ma Coop 12 de Julio, Ecuador
Correo electrónico: an_ro_to_ga@hotmail.com

Carlos Touma Henríquez

Master en Riego y Drenaje por la Universidad Agraria del Ecuador
Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias
Km 7,5 vía Babahoyo-Montalvo, Ecuador
Correo electrónico: ctoumah@utb.edu.ec

Héctor Ezeta Flores

Ingeniero Agrónomo por la Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador
Candidate a Magister en Agronomía Mención Protección Vegetal por la Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador
Grupo Grandes – Departamento de Nutrición Vegetal
Vía Durán - Tambo km 2.5, Durán 092406
Correo electrónico: hector_ezetaflores@hotmail.com

RESUMO

O controle biológico com microorganismos antagônicos é alcançado por várias interações diretas entre antagonistas e microorganismos patogênicos vegetais; estas interações são chamadas de mecanismos de ação. Os mecanismos de ação antagônica têm sido amplamente estudados a fim de controlar o desenvolvimento de microorganismos patogênicos vegetais. No presente estudo, foi avaliada a incidência de dois antagonistas (*Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum*) na cultura da pimenta. O trabalho experimental foi realizado no terreno do projeto de irrigação Babahoyo do CEDEGE de propriedade do Sr. Nilo Placencio Mosquera, localizado no Recinto Valle Verde no km 9 via Babahoyo Montalvo. Um desenho de bloco completo randomizado foi aplicado em um arranjo fatorial, com microorganismos como fator A e doses como fator B, em três réplicas. Os

tratamentos consistiram em doses de *Bacillus subtilis* QST 713 (1,0 e 1,5 L/ha) e *Trichoderma harzianum* (1,0 e 1,5 L/ha), mais um controle sem aplicação. Os meios foram avaliados usando o teste de Tukey com 95% de probabilidade. As variáveis avaliadas foram: número de frutos na colheita, diâmetro dos frutos, comprimento dos frutos, peso dos frutos, plantas por hectare, frutos por hectare, incidência de patógenos, gravidade das plantas atacadas, rendimento por hectare. Os resultados concluíram que as aplicações de *Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzianum* em doses de 2,0 L/ha, respectivamente, alcançaram maiores rendimentos sem serem estatisticamente superiores aos outros tratamentos. Além disso, a aplicação de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum*, em todas as suas doses e combinações, não diferiu estatisticamente do tratamento onde não foi aplicado. *Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzianum* na dose de 2,0 L/ha, apresentou o melhor rendimento com 25578, 7 kg ha⁻¹.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, cultivo de pimenta, controle biológico.

ABSTRACT

Biological control with antagonistic microorganisms is accomplished by several direct interactions between antagonists and plant pathogenic microorganisms; these interactions are called mechanisms of action. The mechanisms of antagonistic action have been extensively studied in order to control the development of plant pathogenic microorganisms. In the present study, the incidence of two antagonists (*Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*) on bell pepper crop was evaluated. The experimental work was carried out in the land of the Babahoyo irrigation project of CEDEGE owned by Mr. Nilo Placencio Mosquera, located in the Recinto Valle Verde at km 9 via Babahoyo Montalvo. A randomized complete block design was applied in factorial arrangement, with microorganisms as factor A and doses as factor B, in three replicates. The treatments were formed by doses of *Bacillus subtilis* race QST 713 (1.0 and 1.5 L/ha) and *Trichoderma harzianum* (1.0 and 1.5 L/ha), plus a control without application. The evaluation of means was carried out with Tukey's test at 95 % of probability. The variables evaluated were: number of fruits at harvest, fruit diameter, fruit length, fruit weight, plants per hectare, fruits per hectare, pathogen incidence, severity of attacked plants, yield per hectare. The results concluded that applications of *Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzianum* in doses of 2.0 L/ha, respectively; achieve higher yields without being statistically superior to the other treatments. In addition, the application of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*, in all their doses and combinations, did not differ statistically from the treatment where it was not applied. *Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzianum* in doses of 2.0 L/ha, presented the best yield with 25578, 7 kg ha⁻¹.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, bell pepper crop, biological control.

1 INTRODUCCIÓN

Según los datos del III Censo Nacional Agropecuario, el cultivo de pimiento en el Ecuador alcanza una superficie total de 1145 hectáreas aproximadamente. Las principales provincias productoras de pimiento son Chimborazo, Loja y Península de Santa Elena.

Mediante el empleo de biocontroladores los investigadores a partir del año 2010, descubrieron que es posible mantener y al mediano plazo incrementar la resistencia de la planta al ataque de patógenos, además de elevar rendimiento de frutos y mejorar su calidad. Estos estudios también han demostrado que es necesario determinar la época más apropiada en que se deben

realizarse las aplicaciones de biocontroladores, es decir, conocer la edad apropiada en que el patógeno es más susceptible al control por estos agentes, y dicho control sea más eficiente.

Para que se pueda manifestar una enfermedad, se deben afectar tres factores, cuya importancia es relativa en cuanto a la susceptibilidad a un determinado microorganismo fitopatógeno y la severidad de su interacción. Un primer factor está asociado a la presencia de los microorganismos fitopatógenos en el medio, lo cual corresponde a la dinámica ecológica de los suelos en cuanto a la diversidad y a la regulación poblacional. Otro factor corresponde a la condición del hospedante, teniendo en cuenta sus etapas fenológicas y metabólicas. Al medio ambiente corresponde este factor en este sistema, especialmente referido a las condiciones edafoclimáticas en las cuales establecemos los cultivos. (Escalona *et al.*, 2019).

Entre los principales problemas que afectan al cultivo de pimiento en el Ecuador, por su importancia se destacan las causadas por hongos: (*Fusarium* sp., *Rhizoctonia*), por bacterias (*Pseudomonas*) y por nematodos (*Meloidogine* sp.) (Escalona *et al.*, 2019).

En los últimos años el control biológico de plagas y enfermedades en la agricultura ha adquirido gran importancia frente a los problemas fitosanitarios ocurridos por el uso indiscriminado de plaguicidas químicos en la agricultura, lo cual ha traído como consecuencia severos problemas de contaminación al medio ambiente y ha generado resistencia de plagas y enfermedades, así como la presencia de nuevas especies de microorganismos fitopatógenos con un grado de afección más virulento. (Castillo *et al.*, 2014).

La mayoría de los microorganismos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos o naturales que se pueden emplear como estrategia de lucha en un programa de control biológico. En los últimos años el empleo de bacterias y hongos antagonistas de enfermedades agrícolas ha cobrado una singular importancia, debido a que no sólo actúan contra un grupo determinado de microorganismos fitopatógenos (como lo hacen los plaguicidas químicos), sino que se están utilizando para un grupo muy amplio de microorganismos fitopatógenos. (Pérez *et al.*, 2014).

Aunque el control biológico no pretende reemplazar completamente los sistemas de control químico, puede ser utilizado junto con otras técnicas como parte de un sistema integrado de control. No hay que olvidar que el control biológico tiene unas propiedades y requerimientos muy distintos de los métodos de control tradicionales, y ha de ser puesto en práctica integrándolo con los métodos y las estrategias de producción existente actualmente. El control biológico depende de un funcionamiento efectivo de microorganismo antagonista apropiado para cada ecosistema particular planta-patógeno. (Pérez *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* presentan un gran potencial como antagonistas, principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticas y otras sustancias con actividad biocida capaces de producir efectos de control sobre varias especies de agentes fitopatogenos pertenecientes a los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Phthium*, causantes de severas enfermedades en semilleros y a los almacigos. (Sosa y Gonzales, 2018).

Se ha reportado que (*Bacillus subtilis*) actúa sobre la *Rhizoctonia* por competencia, antibiosis, micro parasitismo, lisis enzimática y estimulación vegetal (Reyes *et al.*, 2008).

El género *Bacillus* tiene más de 50 especies descritas, sin embargo, con base en la variedad de criterios taxonómicos, el grupo permanece como uno de los más heterogéneos. Esto ha concluido a la sugerencia que eventualmente este puede ser dividido en al menos tres géneros (Lara, 2016).

Se menciona que el *B. subtilis* segrega una proteína llamada subtilina que actúa sobre la pared celular de los hongos minimizando su daño, también demostró que induce resistencia sistemática natural de la planta contra el patógeno fungoso propiedad llamada Resistencia Sistemática Adquirida (SAR) (Cuervo, 2010). Estudios demuestran que el *B. subtilis* colabora activamente en la degradación de diversos sustratos celulares, gracias a las enzimas que este aporta (Adelantado *et al.*, 2017).

El *B. subtilis* inhibe los agentes patógenos ocupando su nicho, metabolizando los exudados de la raíz que pueden ser utilizados por el patógeno. (Hernández, 2017)

La bacteria al establecer contacto con el sistema radicular realiza una protección de protección y estimula la absorción de nutrientes (Obregón, 2015).

En un estudio los resultados mostraron un crecimiento y desarrollo significativo en las plantas tratadas con las *B. subtilis* en la etapa de semillero las cepas antagonistas fueron capaces de controlar significativamente las incidencias de enfermedades, y mostraron una respuesta positiva las plantas inoculadas con las *B. subtilis* en comparación con las testigos (Obregón, 2015).

En el campo del cultivo, la incidencia de *F. oxisporum* y *R. solani* en tallos de papa claramente disminuyo por efecto de las cepas de *B. subtilis*. (Hernández, *et al.*, 2018).

El *B. subtilis* previene las enfermedades del suelo causadas por el *R. solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Sclerotinia*, *Sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp. y el nematodo nodulador de raíces de tomate *Meloidogyne* spp. (Cuervo, 2010; Hernández *et al.*, 2018).

En un ensayo de col se encontró que la supresión de *Colletotrichum gloesporioides* es similar al hacer aplicaciones dirigidas de *B. subtilis* (Serenade® ASO) y el testigo regional Oxiclورو de Cobre (Oximet® Flo) pero superior al testigo absoluto. (Rodríguez y Arredondo, 2017).

Se realizó un estudio que sirvió para establecer el efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium oxysporum*., bajo condiciones de invernadero en tomillo. La metodología incluyó el aislamiento del posible patógeno que estaba causando marchitez vascular y pérdidas en la producción, su identificación por claves taxonómicas, pruebas de antagonismo directo en placa en donde se evaluó el radio de crecimiento de la colonia, porcentaje de inhibición y tasa de crecimiento, ensayos bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo con evaluaciones cada 5 días durante 1 mes por escala de severidad (Constanza *et al.*, 2015).

Los resultados mostraron que el causante de la enfermedad era el hongo *Fusarium* sp. Y en las pruebas de antagonismo que el tratamiento con *Bacillus subtilis* UCMC (B2) resultó tener el mejor efecto biocontrolador *in vitro* y bajo condiciones de invernadero contra *Fusarium* sp., por presentar mayores porcentajes de inhibición, raíces más largas, mayor peso seco y disminución o ausencia de síntomas de la enfermedad. (Constanza *et al.*, 2015).

Se probó el efecto antagonista de algunos agentes biológicos como los microorganismos *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. aureiviride*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, contra el patógeno *F. oxysporum* causante de la marchitez del pimiento, para ello fueron probados y acompañados con aceites esenciales de canela, clavo, tomillo, hierba de limón, limón, menta, pimienta menta y mostaza (Mona *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos indican que los agentes biológicos antagónicos, *T. viride*, *B. subtilis*, *P. fluorescens* mostraron efecto inhibitorio superior contra el crecimiento de hongos patógenos en comparación con *T. harzianum* y *T. aureiviride*. El crecimiento del micelio fúngico se reduce gradualmente mediante el aumento de las concentraciones ensayadas para llegar a una reducción completa (100 %) en las concentraciones de 4 % de bicarbonato de potasio y el benzoato de sodio y en 6 % de sorbato de potasio (Mona *et al.*, 2015).

En una investigación sobre encapsulación de *B. subtilis* y *T. asperillum* aplicando su antagonismo en el fitopatógeno *F. oxysporum* en el cultivo de pimiento nos manifiesta que los mejores resultados en crecimiento se obtuvieron en las microcápsulas combinadas de *B. subtilis* y *T. asperillum* a pesar de haber sido inoculadas con el fitopatógeno antes mencionado (Janisiewicz *et al.*, 2014).

Trichoderma harzianum es un hongo mico-parasítico. Este hongo crece y se ramifica en típicas hifas que pueden oscilar entre 3 a 12 μm de diámetro, según las condiciones del sitio donde se esté produciendo. La esporulación asexual ocurre en conidios unicelulares de color verde generalmente tienen de 3 a 6 μm de diámetro. (FAO, 2014).

Trichoderma harzianum es eficaz contra diversos organismos; tanto en el suelo contra pudriciones de raíces como *Armillaria*, *Rhizoctonia*, *Phytium*, *Phytophthora*, *Fusarium*,

enfermedades que se presentan en numerosas especies tanto anuales como perennes, o bien, contra enfermedades de órganos aéreos como *Botritis* o *Stereum*. Se han estudiado cuatro modos de acción de esta especie de hongo: la competencia por nutrientes, la antibiosis, el micoparasitismo y la estimulación de defensas de la planta (TEOREMA, 2018).

El *Trichoderma harzianum* es un hongo antagonista de patógenos vegetales, y se encuentra presente en la mayoría de los suelos. Su crecimiento se ve favorecido por la presencia de raíces de plantas, a las cuales coloniza rápidamente. Algunas cepas, son capaces de colonizar y crecer en las raíces a medida que estas se desarrollan. Su aplicación, una vez formulado el producto es fácil, pues puede añadirse directamente a las semillas o al suelo, semilleros, transplante, bandejas, y plantas de maceta, utilizando cualquier método convencional (IABIOTEC, 2010).

El mecanismo de acción el *Trichoderma harzianum* al ser aplicado a las raíces forma una capa protectora, haciendo una simbiosis, el hongo se alimenta de los exudados de las raíces y las raíces son protegidas por el hongo y al mismo tiempo reduce o elimina las fuentes de alimento del patógeno; forma una barrera para prevenir la entrada de patógenos a las raíces. Tienen una acción de hiperparasitismo, que es la acción del microorganismo que parasita a otro organismo de su misma naturaleza, es decir, lo utiliza como alimento y lo destruye. Compite por espacio y nutrimentos con los hongos patógenos (IABIOTEC, 2010).

Protege las raíces de enfermedades causadas por *Phytium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, permite el crecimiento de raíces más fuertes y, por tanto, sistemas radiculares más sanos. Aumenta la capacidad de captura de nutrientes y de humedad, así como mejora rendimientos en condiciones de estrés hídrico. Es compatible con inoculantes de leguminosas y posibilidad de aplicar a semillas que han sufrido un tratamiento fungicida químico. Disminuye y en algunos casos elimina la necesidad de tratar con fungicidas químicos reduciendo los costos y uso de fertilizantes, pues las plantas tienen más raíces y las utilizan mejor (IABIOTEC, 2010).

El género *Trichoderma* ha sido reportado en el mundo como controlador de hongos fitopatógenos (*Pythium*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerothium*, *Fusarium solani*, *Altenaria solani*) en diferentes cultivos. En Colombia se está implementado su uso a nivel comercial para el biocontrol de diferentes hongos fitopatógenos, sin embargo, no se ha hecho una adecuada gestión de riesgo para el hombre, los animales y el medio ambiente. (Vargas y Dussan, 2012).

2 METODOLOGÍA

La investigación se realizó en los terrenos del proyecto de riego Babahoyo de CEDEGE propiedad del Sr. Nilo Placencio Anchundia, ubicados en el Recinto Valle Verde en el km 9 vía Babahoyo Montalvo, cuyas coordenadas geográficas son: 01° 49' de Latitud Sur, 79° 32', de longitud Occidental, y altitud 17 msnm. La climatología del lugar está caracterizada por temperatura media anual de 24.7°C, precipitación de 1.500,7 mm; humedad relativa 85.5 %, y heliofanía de 998.2 horas. Los suelos son de textura franco arcilloso, con topografía plana y drenaje regular. Se utilizaron materiales campo, laboratorio y material genético para la siembra, semillas de pimiento híbrido Salvador. Se estudiaron dos factores; a) Incidencia de *B. subtilis* sobre los patógenos del cultivo de pimiento; y, b) *T. harzianum* sobre los patógenos del cultivo de pimiento. Se evaluaron los tratamientos como se indica en el siguiente cuadro 1:

Cuadro 1. Tratamientos en estudio para determinar la incidencia de dos antagonistas (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*) sobre los patógenos en el cultivo de pimiento. Babahoyo, 2022.

N°	COMBINACIÓN FACTORIAL	DESCRIPCIÓN	DOSIS (Kg/ha + L/ha)	ÉPOCAS DE APLICACIÓN
1	A ₁ x B ₁	Testigo Absoluto	0	(N.A.)
2	A ₁ x B ₂	<i>Trichoderma harzianum</i>	1.5	5 (d.d.t.) – 15 (d.d.f.) – 5 (d.d.f.f.)
3	A ₁ x B ₃	<i>Trichoderma harzianum</i>	2.0	5 (d.d.t.) – 15 (d.d.f.) – 5 (d.d.f.f.)
4	A ₂ x B ₁	<i>Bacillus subtilis</i>	1.5	5 (d.d.t.) – 15 (d.d.f.) – 5 (d.d.f.f.)
5	A ₂ x B ₂	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1.5+1.5	5 (d.d.t.) – 15 (d.d.f.) – 5 (d.d.f.f.)
6	A ₂ x B ₃	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1.5+2.0	5 (d.d.t.) – 15 (d.d.f.) – 5 (d.d.f.f.)
7	A ₃ x B ₁	<i>Bacillus subtilis</i>	2.0	5 (d.d.t.) – 15 (d.d.f.) – 5 (d.d.f.f.)
8	A ₃ x B ₂	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2.0+1.5	5 (d.d.t.) – 15 (d.d.f.) – 5 (d.d.f.f.)
9	A ₃ x B ₃	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2.0+2.0	5 (d.d.t.) – 15 (d.d.f.) – 5 (d.d.f.f.)

Para el desarrollo y evaluación estadística del ensayo se aplicó el diseño experimental Diseño Bloques completamente al azar, con arreglo factorial (AxB) con nueve tratamientos y tres repeticiones, se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) y la comparación de medias con la prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. La evaluación de variables entre los tratamientos en las parcelas, se realizó con 27 unidades experimentales y 10 plantas al azar por cada uno. Se evaluó: Número de frutos a cosecha, diámetro de frutos a la cosecha, longitud de frutos a la cosecha, peso de frutos por cosecha, plantas por hectárea, frutos por hectárea, incidencia de plantas afectadas por patógenos, severidad de plantas afectadas por patógenos y rendimiento por hectárea. Se realizó un análisis de suelo a 30 cm de profundidad mediante el método del zig-zag después del laboreo del mismo. El semillero se efectuó en bandejas de germinación, las cuales fueron llenadas con turba rubia como sustrato.

Posteriormente se aplicó una solución de fertilizante foliar con aminoácidos para favorecer el crecimiento acelerado de las plántulas en el semillero en dosis de 5 cc/L de agua. La preparación del suelo se realizó a los 21 días después de la siembra del semillero, se utilizó las plantas más sanas posibles. En el hoyo de siembra se aplicó fertilizante completo 8-20-20. El distanciamiento que se utilizó fue de 0,40 m entre planta y 1 m entre hileras. La fertilización del cultivo se realizó según los resultados del análisis de suelo realizado. Las dosis de fertilizantes se aplicaron de manera quincenal después del trasplante a campo. Esta labor se realizó en corona alrededor de la planta, tapando con suelo el fertilizante. Se aplicó, 4 sacos de urea, 2 sacos de 8-20-20 y 1 saco de muriato de potasio (100 kg de N, 20 kg de fósforo y 50 kg de potasio); distribuido a la siembra fraccionadamente como se indicó. La fertilización foliar se realizó con Fitoamin 1 L/ha, la aplicación de los tratamientos foliares se realizó con una bomba de aspersion de espalda CP3, previamente calibrada. El riego se realizó al trasplante dirigido al hoyo por surcos, cada 7 días para favorecer el crecimiento del cultivo, evitando encharcamientos. Se aplicó láminas de 150 mm en cada riego, realizándose en total 6 aplicaciones de agua. Para el manejo de malezas gramíneas y hoja ancha solo se utilizó control cultural manual. Se hicieron 6 desyerbas durante el desarrollo del cultivo. El control de insectos plagas se realizó aplicando Cypermetrina 0.3 L/ha para el control de comedores de hoja a los 5 días después del trasplante. Acetamiprid (Rescate 300 g/ha) + Diazinon (1 L/ha) para el control de mosca blanca a los 15 días después del trasplante y para el control de insectos chupadores de hojas a los 45 días después del trasplante Lamda Cihalotrina (0.3 L/ha). Las enfermedades se controlaron con la aplicación de los tratamientos planteados para la investigación. Las mismas se realizaron en drench a los 5 días después del trasplante y las siguientes a los 5 días después de la floración; y 15 días después de la formación de frutos. La aplicación se realizó con una bomba de aspersion de espalda CP3, previamente calibrada. La cosecha se realizó cuando los frutos obtuvieron la maduración necesaria, en general presentaron una coloración verde intensa brillante. Para lograr la identificación de patógenos, se procedió a multiplicar los mismos por el método de cámara húmeda en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Agraria del Ecuador en la extensión Milagro, esta consistió en colocar en cajas Petri una sección de la planta enferma con una lámina de papel filtro húmedo por 72 horas aproximadamente y la observación se realizó a las 96 horas después de la inserción, esta caja estuvo cerrada herméticamente. Con la ayuda de la humedad ambiental se logró la visualización de los signos del hongo en cada caja. Las muestras fueron colectadas de los campos arroceros del sector del ensayo, además estas se purificaron con agua destilada para evitar resultados alterados (FAGRO, 2015). Para la identificación de los géneros de hongo presentes en las partes vegetativas de las plantas enfermas, se tomó los síntomas visibles en la caja Petri, se colocaron en un porta objeto y se observó las características en un microscopio

óptico en lente 400. Esto se realizó en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la UAE. Las claves utilizadas para la identificación morfológica, fueron las empleadas por Agrios (1998).

3 RESULTADOS

En el Cuadro 2, se observan los promedios de cada combinación factorial y luego de haber realizado los análisis estadísticos correspondientes, en cuanto al número de frutos por planta, no se detectaron diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos evaluados; tanto entre los factores de estudio como en la respectiva interacción de los mismos. El promedio mayor que se pudo evidenciar fue en el T7 con 13,50 frutos por planta, reportándose también un coeficiente de variación de 6,5 %, lo que confiere la confianza necesaria sobre este análisis.

Cuadro 2. Número de frutos con la aplicación de (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*) para control de patógenos en pimiento. Babahoyo, 2022.

Tratamientos	Dosis L/ha+kg/ha	Frutos por planta
Testigo Absoluto	0	12,73
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,5	13,47
<i>Trichoderma harzianum</i>	2,0	13,47
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5	13,03
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+1,5	12,63
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+2,0	13,43
<i>Bacillus subtilis</i>	2,0	13,50
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+1,5	13,10
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+2,0	13,27
Significancia Estadística	Ns	
Coeficiente de variación %	6,5	

N.s.: no significativa

El Cuadro 3 se muestra los promedios de cada combinación factorial, luego de haber realizado los análisis estadísticos correspondientes, en el diámetro del fruto (mm) por planta no se detectó diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos evaluados; tanto entre los factores de estudio como en la respectiva interacción de los mismos. El promedio mayor lo alcanzó el T8 con 46,22 mm de diámetro del fruto, reportándose también un coeficiente de variación de 2,26%, lo que confiere la confianza necesaria sobre este análisis.

Cuadro 3. Diámetro de frutos con la aplicación de (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*) para control de patógenos en pimiento. Babahoyo, 2022.

Tratamientos	Dosis L/ha+kg/ha	Diámetro (mm)
Testigo Absoluto	0	45,37
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,5	44,11
<i>Trichoderma harzianum</i>	2,0	44,84
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5	45,08
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+1,5	45,10
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+2,0	45,43
<i>Bacillus subtilis</i>	2,0	45,28
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+1,5	46,22
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+2,0	45,11
Significancia Estadística		Ns
Coefficiente de variación %		2,26

N.s.: no significativo

Los promedios de cada combinación factorial y con el respectivo análisis estadístico no mostró en cuanto a la longitud de los frutos (cm) diferencias significativas, entre cada uno de los tratamientos evaluados, tanto para los factores de estudio como sus interacciones. El promedio mayor encontrado se ubicó en el T7 con 22,75 cm de longitud, reportándose también un coeficiente de variación de 6,32% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Longitud de frutos con la aplicación de (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*) para control de patógenos en pimiento. Babahoyo, 2022.

Tratamientos	Dosis L/ha+kg/ha	Longitud (cm)
Testigo Absoluto	0	21,03
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,5	20,97
<i>Trichoderma harzianum</i>	2,0	22,20
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5	21,13
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+1,5	21,16
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+2,0	21,08
<i>Bacillus subtilis</i>	2,0	22,75
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+1,5	21,40
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+2,0	21,29
Significancia Estadística		Ns
Coefficiente de variación %		6,32

N.s.: no significativo

El Cuadro 5, registra los promedios de cada combinación factorial del peso de frutos, con el análisis estadístico no se encontraron niveles estadísticos significantes entre los tratamientos evaluados y sus interacciones. El promedio mayor se situó en el T8 con 84,80 g de peso del fruto, reportándose también un coeficiente de variación de 6,43 %.

Cuadro 5. Peso de frutos con la aplicación de (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*) para control de patógenos en pimiento. Babahoyo, 2022.

Tratamientos	Dosis L/ha+kg/ha	Peso (g)
Testigo Absoluto	0	81,45
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,5	78,85
<i>Trichoderma harzianum</i>	2,0	78,60
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5	80,10
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+1,5	81,08
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+2,0	80,62
<i>Bacillus subtilis</i>	2,0	84,23
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+1,5	84,80
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+2,0	82,79
Significancia Estadística		Ns
Coefficiente de variación %		6,43

N.s.: no significativo

Los valores del número de plantas por hectárea obtenidas en el ensayo, se presentan en el Cuadro 6. Se observó que los promedios y su combinación factorial, realizados los análisis estadísticos correspondientes, no se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. El promedio máximo lo obtuvo el T6 con 24305,3 plantas por hectárea, con un coeficiente de variación de 6,92%.

Cuadro 6. Plantas por hectárea con la aplicación de (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*) para control de patógenos en pimiento. Babahoyo, 2022.

Tratamientos	Dosis L/ha+kg/ha	Número de plantas
Testigo Absoluto	0	12500,0
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,5	23611,3
<i>Trichoderma harzianum</i>	2,0	19305,7
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5	12777,7
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+1,5	24305,3
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+2,0	23472,0
<i>Bacillus subtilis</i>	2,0	15555,7
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+1,5	21666,7
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+2,0	23333,7
Significancia Estadística		Ns
Coefficiente de variación %		6,92

N.s.: no significativo

El Cuadro 7, muestra los promedios del número de frutos por hectárea donde no se encontró significancia estadística entre tratamientos e interacciones, siendo el coeficiente de variación fue 8,64 %. El mayor promedio que se pudo evidenciar se ubicó en el T2 317625,0 frutos por hectárea, lo que confiere la confianza necesaria sobre este análisis.

Cuadro 7. Frutos por hectárea con la aplicación de (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*) para control de patógenos en pimiento. Babahoyo, 2022.

Tratamientos	Dosis L/ha+kg/ha	Número de frutos (ha)
Testigo Absoluto	0	159 000,0
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,5	317 625,0
<i>Trichoderma harzianum</i>	2,0	258 389,0
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5	163 819,3
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+1,5	306 569,7
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+2,0	315 777,7
<i>Bacillus subtilis</i>	2,0	209 500,0
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+1,5	284 097,3
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+2,0	309 194,3
Significancia Estadística		Ns
Coeficiente de variación %		8,64

N.s.: no significante

La incidencia de *Fusarium oxisporum* y *Rhizoctonia solani*, se presenta en el Cuadro 8. No se encontró significancia estadística en las evaluaciones realizadas. Los coeficientes de variación fueron de 4,71 y 7.18 %; respectivamente. A los 50 días la evaluación de *Fusarium* presentó mayor incidencia en las plantas sin aplicación de microorganismos benéficos (80,30 %), teniendo menor incidencia del patógeno las plantas tratadas con *Trichoderma harzianum* en dosis de 2,0 kg/ha (39,33 %). En la misma fecha evaluación la evaluación de *R. solani* encontró la menor incidencia con la mezcla *Bacillus subtilis* 1,5 L/ha + *Trichoderma harzianum* 1,5 kg/ha (43.73 %). El registro más alto estuvo en el testigo sin aplicación con 70,26 %.

Cuadro 8. Incidencia de *Fusarium oxisporum* y *Rhizoctonia solani*, con la aplicación de (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*) para control de patógenos en pimiento. Babahoyo, 2022.

Tratamientos	Dosis L/ha+kg/ha	<i>Fusarium oxisporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
Testigo Absoluto	0	80,30	70,26
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,5	41,00	47,16
<i>Trichoderma harzianum</i>	2,0	39,33	38,00
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5	47,93	52,03
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+1,5	48,70	43,73
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+2,0	47,16	55,10
<i>Bacillus subtilis</i>	2,0	43,73	55,96
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+1,5	50,63	45,26
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+2,0	47,20	47,16
Significancia Estadística		Ns	Ns
Coefficiente de variación %		4,71	7,18

N.s.: no significativo

En el Cuadro 9 se presenta la severidad del ataque *Fusarium oxisporum* y *Rhizoctonia solani*, observada en el cultivo. Se obtuvo alta significancia estadística en las observaciones realizadas, siendo los coeficientes de variación fue de 6.36 y 6.30, respectivamente. La evaluación determinó que la mayor severidad en daños de *Fusarium oxisporum* se dio cuando no existió aplicación de biofungicidas (42.33 %), que fue estadísticamente superior a las dosis de antagonicos. La aplicación de *Trichoderma harzianum* en dosis de 2,0 kg/ha con 12,70 %, fue el que tuvo menor daño. Realizada la valoración de daños de *Rhizoctonia solani* se dio la menor severidad aplicando *Trichoderma harzianum* 2,0 kg/ha (16.56 %), el cual fue estadísticamente inferior. Se observó mayor severidad y diferencia estadística superior en el testigo sin aplicación con 46.00 % de daño en promedio.

Cuadro 9. Severidad de daños de *Fusarium oxisporum* y *Rhizoctonia solani*, con la aplicación de (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*) para control de patógenos en pimiento. Babahoyo, 2022.

Tratamientos	Dosis L/ha+kg/ha	<i>Fusarium oxisporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
Testigo Absoluto	0	42,33 a	46,00 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,5	16,40 d	24,40 cd
<i>Trichoderma harzianum</i>	2,0	12,70 e	16,56 d
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5	26,23 c	36,29 b
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+1,5	22,29 c	27,16 cd
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	1,5+2,0	24,46 bc	42,33 b
<i>Bacillus subtilis</i>	2,0	20,76 cd	32,33 c
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+1,5	27,76 b	23,80 de
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	2,0+2,0	23,78 bc	29,16 c
Significancia Estadística		**	**
Coefficiente de variación %		6,36	6,30

Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente según prueba de Tukey al 5% de significancia.

Los promedios del rendimiento por hectárea registrado en el ensayo se observan en el Cuadro 10. Estadísticamente existió alta significancia estadística, para tratamiento e interacciones con un coeficiente de variación de 11,44 %. El promedio que se pudo evidenciar en rendimiento se ubicó alrededor de 20307 kilogramos por hectárea, reportándose el mayor en *Trichoderma harzyanum* 1,5 kg/ha (24895 kg/ha), *Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzyanum* 1,5 L/ha +1,5 kg/ha (24840,3 kg/ha), *Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzyanum* 1,5 L/ha +2,0 kg/ha (25532 kg/ha), *Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzyanum* 2,0 L/ha +1,5 kg/ha (24065 kg/ha) y *Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzyanum* 2,0 L/ha +2,0 kg/ha (25578,7 kg/ha), los cuales fueron estadísticamente iguales entre sí y distintos al testigo absoluto (13014 kg/ha) que tuvo el menor rendimiento.

Cuadro 10. Rendimiento por hectárea con la aplicación de (*Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*) para control de patógenos en pimienta. Babahoyo, 2022.

Tratamientos	Dosis L/ha+kg/ha	Rendimiento Kg/ha
Testigo Absoluto	0	13014,0 c
<i>Trichoderma harzyanum</i>	1,5	24895,0 a
<i>Trichoderma harzyanum</i>	2,0	20342,7 b
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5	13158,0 c
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzyanum</i>	1,5+1,5	24840,3 a
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzyanum</i>	1,5+2,0	25532,0 a
<i>Bacillus subtilis</i>	2,0	17679,0 b
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzyanum</i>	2,0+1,5	24065,0 a
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzyanum</i>	2,0+2,0	25578,7 a
Significancia Estadística		**
Coeficiente de variación %		11,44

Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente según prueba de Tukey al 5% de significancia.

4 DISCUSION

Las aplicaciones de *Trichoderma harzyanum* en dosis de 2 L/ha, sobre plantas de pimienta, no presentaron influencia sobre las variables de comportamiento agronómico, esto debido a que son factores que dependen exclusivamente del material de siembra, el cual vienen determinado en su progenie, esto es corroborado por Escalona *et al.* (2019), quienes indican que para que se pueda manifestar una enfermedad, se deben afectar tres factores, un primer factor está asociado a la presencia de los microorganismos fitopatógenos en el medio, otro factor corresponde a la condición del hospedante, teniendo en cuenta sus etapas fenológicas y metabólicas; las condiciones edafoclimáticas en las cuales establecemos los cultivos.

Adicionalmente los análisis de estadística demuestran que las diferentes aplicaciones de biocontroladores, incrementan la tolerancia del cultivo al generar fitoalexinas que estimulan a la planta a producir elicitores que inhiben el desarrollo del hongo. Esto se explica con lo manifestado por Mona *et al.* (2015), que en su estudio sobre capacidad antagonista menciona que los resultados de los agentes biológicos antagonistas, *T. viride*, *B. subtilis*, *P. fluorescens* mostraron efecto inhibitor superior contra el crecimiento de hongos patógenos en comparación con *T. harzianum* y *T. aureoviride*. El crecimiento del micelio fúngico se reduce gradualmente mediante el aumento de las concentraciones. Para llegar a una reducción completa (100 %) en las concentraciones de 4 % de bicarbonato de potasio y el benzoato de sodio y en 6 % de sorbato de potasio.

Las aplicaciones de biocontroladores logran un desarrollo fisiológico más eficiente, debido a que ellos tienen en su composición química estimulan a la planta en la generación de hormonas de crecimiento, sin embargo este efecto es mejor comparando las variables de crecimiento y rendimiento, como lo menciona Constanza *et al.* (2015), quienes mostraron en las pruebas de antagonismo con el tratamiento con *Trichoderma viride*, resultó con el mejor efecto biocontrolador in vitro y bajo condiciones de invernadero contra *Fusarium sp.*, por presentar mayores porcentajes de inhibición, raíces más largas, mayor peso seco y disminución o ausencia de síntomas de la enfermedad.

El mayor rendimiento de frutos se observó con la aplicación de *Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzianum* 2,0 L/ha +2,0 kg/ha (25578,7 kg/ha). La aplicación de estos productos con su dosis activa la productividad de la planta logrando un crecimiento relativamente equilibrado y sostenido, lo cual es deseable ya que los patógenos no ocasionan daños de consideración en el desarrollo, que según Castillo *et al.* (2004) cumplen importantes roles en los ciclos biogeoquímicos del Carbono y Nitrógeno; adicional que presentan una potencial capacidad para producir antibióticos. Además, Teorema (2018), sostiene que *Trichoderma harzianum* es eficaz porque en sus estudios demuestra los cuatro modos de acción de esta especie de hongo: la competencia por nutrientes, la antibiosis, el micoparasitismo y la estimulación de defensas de la planta, ya que algunas cepas, son capaces de colonizar y crecer en las raíces a medida que estas se desarrollan.

5 CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación, demostraron que la aplicación de biocontroladores *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*, en diferentes dosis, fueron capaces de suprimir significativamente la incidencia de patógenos que atacan al cultivo de pimiento, y mostraron una respuesta supresiva positiva en las plantas tratadas con *Trichoderma harzianum* en comparación con las testigos.

REFERENCIAS

- Agrios, G. 2016. Fitopatología. México: Limusa. S. A. p. 358
- Adelantado, C., Acero, X., Tusell, P., Corcuera, P., Calvo, Ma. 2017. Evaluación de la capacidad de cepas de *Bacillus subtilis* de degradar sustratos celulósicos. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Constanza, L., Sánchez, L., Márquez, K. 2015. Efecto biocontrolador del *Bacillus* sp. frente al ataque de *Fusarium* sp. bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymu vulgaris*). Bogotá.
- Calderón, E. 2014. Control biológico de la sarna seca de la papa (*Fusarium oxysporum*) con aplicaciones de *Bacillus subtilis*, Tesis de Grado. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile. 118 p.
- Castillo, C. Sosa, B., Scorza, J. 2014. Evaluación de la termoresistencia en metabolitos antifúngicos, producidos por esporulados del género *Bacillus*. Caracas: Sociedad Venezolana de Microbiología. 25 p.
- Cuervo, L. 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de Nitrógeno y solubilizadores de fosfato en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Editado por Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas Carrera de Microbiología Agrícola. Bogotá: Tesis de grado.
- Escalona, V., Alvarado, P., Monardes, H., Urbina, C., Martin, A. 2019. Manual de cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Editorial Nodo Hortícola. Chile. 60 pp.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2014. Manual técnico de manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos, 53 p.
- Hernández, C., Lira, S., Cruz, C., Gallegos, M., Galindo, C. 2018. Antifungal potential of *Bacillus* spp. strains and *larrea tridentata* extract against *Rhizoctonia solani* on potato crop. International Journal of experimental botany. 49 p.
- Hernández, S. 2017. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* con microencapsulados de *Bacillus subtilis* y su efecto en el crecimiento y rendimiento de tomate. Buena vista Saltillo, Coahuila: Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología. 128 p.
- IABIOTEC. 2010. Controladores biológicos. SAGARPA, México. 82 p.
- Janisiewicz, W., Conway, A., Glenn, D., Sans, E. 2015. Integrating biological control and calcium treatment for controlling decay on apples. HortScience, 33:105-109.
- Lara, J. 2016. Marcate de cepas de *Bacillus subtilis* de la rizosfera de la papa por recombinación ilegítima con un plásmido y detección por PCR. Guadalajara: Tesis. 135 p.
- Mona, M. Ragab, A., Ashour, M., Kader, A. 2015. Cepas de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades. Revista Agropecuaria 12(5): 1-17.
- Obregón, G. 2015. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Fusarium* spp. en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Revista Investigación Agropecuaria 5(4): 1-13.

Pérez, C., Mohammed, E., Ahmed, S. 2014. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Tesis de grado. España. 140 p.

Rodríguez, B y Arredondo, B. 2017. Teoría y aplicación del control biológico. México: Sociedad Mexicana del Control Biológico. 60 p.

Sosa, A. y Gonzales, M. 2018. Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con potencialidades para el control biológico de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Pythium*. XXXIII Congreso. La Habana Cuba, 22-29 Sep, 2018. 63.

Teorema. 2018. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de enfermedades. Obtenido de <http://www.teorema.com.mx/>

Vargas, M. y Dussan, J. 2012. Bioseguridad de cepas nativas del hongo *Trichoderma* spp utilizadas en control biológico. Colombia. 67 p.