

Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*

Mohammed Ezziyani, Consuelo Pérez Sánchez, María Emilia Requena, Ahmed Sid Ahmed & María Emilia Candela

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo (Murcia), España.

Correspondencia

M. E. Candela

Tel.: +34 968 364943

Fax: +34 968 363963

E-mail: mcandela@um.es

Recibido: 19 Abril 2004

Aceptado: 13 Junio 2004

Resumen

Se ha estudiado la capacidad antagónica de la bacteria *Burkholderia cepacia*, para controlar la enfermedad que el Oomiceto patógeno *Phytophthora capsici* causa en plantas de pimiento. Las evaluaciones antagónicas de *B. cepacia* se han realizado in vitro mediante confrontaciones de la bacteria y *P. capsici*. Se ha analizado su incidencia sobre semillas, hojas y raíces midiendo la reducción de las «manchas foliares» y la «podrición de la raíz» causada por el patógeno y su repercusión en la germinación y el crecimiento de las plántulas. Se ha asegurado la inocuidad de la bacteria al adicionarse a semillas y plántulas de pimiento in vivo. La adición del preparado de la bacteria a plantas inoculadas con el patógeno, redujo la podredumbre causada por *P. capsici* en un 37% en condiciones de campo y en un 55,6% en pimientos cultivados en condiciones controladas en macetas crecidas en invernaderos. Los resultados favorables obtenidos nos permiten considerar a la bacteria *B. cepacia*, uno de los microorganismos utilizables en el biocontrol de hongos telúricos, patógenos del pimiento.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, Biocontrol, *Burkholderia cepacia*, *Phytophthora capsici*, Podredumbre.

Abstract

Evaluation of the biocontrol of Phytophthora capsici in pepper (Capsicum annuum L.) using Burkholderia cepacia.

The antagonistic capacity of the bacterium *Burkholderia cepacia* for controlling diseases caused by the Oomicete pathogen *Phytophthora capsici* in pepper plants was studied. Its effect on seed, leaves and roots was evaluated by measuring the reduction in leaf spot and root rot caused by the pathogen and its influence on plantlet germination and growth. The antagonistic capacity of *B. cepacia* was assessed in vitro by confronting the bacterium and *P. capsici*, while its innocuousness was confirmed by adding to seeds and plantlets in in vivo trials. When the bacteria preparation was added to plants inoculated with the pathogen, it reduced root rot by 37% in field conditions and by 55,6% in the controlled conditions of greenhouse. The results obtained suggest that *B. cepacia* may be considered for use as an antagonist for the biocontrol of the soil fungi which attack peppers.

Key words: *Capsicum annuum*, Biocontrol, *Burkholderia cepacia*, *Phytophthora capsici*, Root rot.

Introducción

Se conocen numerosos grupos de bacterias y hongos con capacidad antagonica frente a otros microorganismos. Este antagonismo manifestado de diferentes formas, como inhibidores del desarrollo o incluso patógenos de las especies causantes de enfermedades de plantas, pueden ser utilizadas, y de hecho ya se utilizan algunas, para combatir enfermedades siempre que se pueda demostrar su no patogenicidad para la planta o incluso para el hombre o los animales.

Entre los géneros clasificados se encuentran las bacterias *Pseudomonas* y *Bacillus* (Elad & Baker 1985, Leeman et al 1995, Kimer et al 1998, Loper & Henkels 1997, Sid Ahmed et al 2003a, 2003b, Ezziyani et al 2004).

El motivo de este trabajo es la evaluación de la bacteria *Burkholderia cepacia* como microorganismo antagonista de *Phytophthora capsici* y su capacidad de reducción del marchitamiento que este patógeno causa en las plantas de pimiento.

Material y Métodos

Material vegetal

Se usaron semillas, plántulas o plantas de pimiento (*Capsicum annum*) variedad California Wonder, una variedad muy sensible al ataque de *Phytophthora capsici*. Las semillas se desinfectaron en una disolución comercial de hipoclorito sódico al 2%, durante 5 minutos, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se pusieron a germinar en bandejas alveolares (de 48 senos, 4x4x14 cm) con una mezcla de arena, turba y vermiculita (3:1:1/2) esterilizadas. Los semilleros se mantuvieron en invernadero hasta que se desarrolló la quinta hoja verdadera y se transplantaron a macetas o suelo.

Material fúngico

Para las inoculaciones se usó el hongo *Phytophthora capsici* (Pc), aislado 15 cepa extremadamente agresiva (Candela et al 1995), conservado en medio PDA (patata, dextrosa, agar, de Difco) esterilizado a 121°C durante 20 minutos en placas Petri.

Se cultivó también en frascos Erlenmeyer de 1.000 ml con una mezcla formada por 150 g de vermiculita (esterilizada en autoclave a 121°C durante 30 minutos en dos días consecutivos) y 200 ml de PDB (caldo de patata dextrosa, de Difco). La vermiculita impregnada con el medio de cultivo PDB se esterilizó en autoclave y se sembró con 4 discos de 5 mm de

diámetro cortados del margen de la colonia micelial de *P. capsici* crecida en PDA. Los frascos de cultivo se incubaron en estufa a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante tres semanas durante los cuales el patógeno se multiplicó e invadió el medio.

Para conseguir grandes cantidades de zoosporas de *P. capsici* se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 150 ml de medio PDB. Estos se esterilizaron previamente en autoclave a 121 °C durante 20 minutos y ya fríos, se les añadió un disco por matraz de 5 mm de diámetro del hongo, cubriéndose con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz. Durante 15 días se mantuvieron a 25°C en agitación permanente en un agitador orbital a 120 rpm al cabo de los cuales se separó el micelio del cultivo, se lavó tres veces con agua destilada estéril y se volvió a introducir en agua destilada estéril. Se mantuvo en agitación por un periodo de 5 a 6 días, tiempo en el cual se generan y liberan las zoosporas. Finalmente la concentración se ajustó a 10^6 zoosporas por mililitro.

Antagonista bacteriano

La cepa bacteriana *Burkholderia cepacia* (Bc), aislado 322 se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). Esta bacteria se conserva en el laboratorio en medio NA (Agar nutritivo estándar II, Merk).

Preparación de los inóculos y filtrado de *Burkholderia cepacia*

En medios sólidos y líquidos, dependiendo del tipo de ensayo a realizar, los inóculos de *B. cepacia* se obtienen mediante tres procedimientos:

1- Para los ensayos de Biocontrol con suspensiones bacterianas. Se utilizaron frascos Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 150 ml de del medio NB (caldo nutritivo de Difco) esterilizado en autoclave a 121°C durante 30 minutos. Este medio se inoculó con una colonia aislada, tomada con un asa estéril de *B. cepacia* crecida en NA. Los frascos se incubaron con agitación a temperatura ambiente, en el laboratorio durante tres días. Las bacterias se recogieron en tubos estériles y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 20 minutos. El precipitado se resuspendió en 100 ml de agua destilada estéril y se transfirió a un Erlenmeyer de 1.000 ml conteniendo 150 g de vermiculita fina empapada en 150 ml de NB esterilizado a 121°C, 30 minutos, dos veces, dos días consecutivos. Finalmente se incubaron a 28°C en estufa durante 5 días

2- Para el tratamiento de las semillas. Se usaron frascos Elenmeyer de 500 ml con 150 ml de los medios, Acido casamino al 1% y PDB. Las bacterias desarrolladas en los distintos medios de cultivo se recogieron a los tres días en tubos estériles con agua destilada, se centrifugaron a 15.000 rpm durante 20 minutos y se decantaron. El precipitado se resuspendió en $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,001M, (Ongena et al. 1999), o en A-P (agua destilada peptona al 0,1%), y a partir de ellas se prepararon las concentraciones bacterianas requeridas, usando la recta de calibrado.

3- Para obtener componentes extracelulares del filtrado de los cultivos, *B. cepacia* se cultivó en frascos Elenmeyer de 250 ml conteniendo 150 ml de PDB previamente esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Una colonia aislada crecida en NA se transfirió asépticamente a un frasco conteniendo el medio de cultivo PDB y se dejó a temperatura ambiente en el laboratorio en agitación permanente, en un agitador orbital a 100 rpm durante 4-5 días. Las suspensiones bacterianas obtenidas se recogieron en tubos estériles y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante es el utilizado como filtrado bacteriano.

Confrontación «in vitro» de *B. cepacia* y *P. capsici*

En los medios PDA, AA (agua-agar al 2%) y Czapek sólido se siembra, en un extremo de la placa Petri, un disco de 5 mm de diámetro de la colonia miceliana crecidas en PDA de *P. capsici*. Enfrente se inocula, mediante un toque superficial, un alícuoto de la bacteria a ensayar. La comprobación de la acción antagónica de *B. cepacia*, se obtendrá al cabo de tres días de cultivo en estufa a 23, 25, 27, y 30°C al evaluar la inhibición del crecimiento del micelio fúngico, obtenido por acción de la bacteria.

Análisis por microscopía electrónica de barrido

Se preparan cortes de agar de 2 x 2 mm de la zona de inhibición entre *B. cepacia* y *P. capsici* en medio PDA. Las muestras se sumergen en una disolución de agar al 1% y se prefijan a 4°C durante dos horas por inmersión en una disolución compuesta por glutaraldehído (25%) al 3% en tampón cacodilato sódico (R 23/25, Prolabo) 0,1M a pH 7,2. Finalmente se lavan tres veces con el mismo tampón durante 30 minutos en oscuridad.

La deshidratación se efectúa en etapas de 15 minutos con disoluciones crecientes de etanol de 30, 50, 70, 90 y 100% y posteriormente se secan mediante el método del punto crítico (etanol/CO₂ líquido). Fi-

nalmente se montan sobre un pedestal con pintura conductiva de grafito que se cubre con un metal pesado (oro o platino pálido) por los métodos de evaporación en «sputtering». El examen se hizo con un microscopio Jeol T-6.100.

Acción de *B. cepacia* sobre el control de las «manchas foliares» producidas por *P. capsici*

Para evaluar el efecto antagónico de *B. cepacia* en la supresión de las manchas foliares producidas por el patógeno se recolectaron hojas de pimiento recién cortadas sanas y jóvenes de 4 a 6 cm de longitud, se lavaron suavemente con agua destilada, se desinfectaron con hipoclorito sódico al 2 % durante 5 minutos y a continuación se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Las hojas se secaron sobre papel de filtro estéril bajo corriente de aire en la Cámara de flujo laminar.

En placas Petri de vidrio estériles, con papel de filtro (previamente esterilizado en estufa a 145°C, 45m) se introdujeron dos hojas de pimiento, en las que se practicaron cinco lesiones con un asa estéril caliente y se pulverizaron, con la suspensión de *B. cepacia* en agua destilada, hasta mojar las hojas y el papel de filtro.

Se montaron tres series con concentraciones de [1] $7,36 \times 10^4$; [2] 4×10^6 y [3] $1,5 \times 10^8$ UFC ml⁻¹ de *B. cepacia*. Las placas se sellaron con parafilm y se mantuvieron en oscuridad en el laboratorio a temperatura ambiente. A las 24 horas se inocularon con 10 µl de zoosporas de *P. capsici* por lesión. Las placas se volvieron a sellar, manteniéndolas en las mismas condiciones.

Para la evaluación de la inhibición de las manchas foliares, se inocularon hojas lesionadas con el antagonista, con el patógeno, con el antagonista más el patógeno y con agua destilada estéril como control. Al cabo de cinco días y a partir del punto de inoculación se midió la extensión de las manchas foliares. La gravedad (por hoja y tratamiento) se valoró sobre una escala de: 0 (ninguna mancha); 1 = lesión de 0-1 mm; 2= 1-2 mm; 3 = 2- 3 mm; 4= 3-4 y 5 => 4 mm.

Tratamiento «in vivo» con *B. cepacia* crecida en vermiculita

Se realizaron dos tipos de ensayos para medir la influencia de la bacteria antagonista, en la disminución de la podredumbre causada por *P. capsici*

A- En macetas: el substrato utilizado en las macetas fue una mezcla de turba, arena y vermiculita

(3/1^{1/2}) v/v/v) esterilizada a 121°C durante una hora, dos veces en dos días consecutivos. En todos los ensayos con suelo se analizó el efecto de diferentes pHs de la mezcla de cultivo. Se adicionó ácido fosfórico y fosfato disódico al suelo hasta conseguir medios de cultivo con cuatro pHs diferentes: 4, 4,5 5,5 y 6,5. En todos los ensayos, 15g del preparado del patógeno *P. capsici* crecido en vermiculita se agregó directamente a las macetas para asegurar una buena infección. La población inicial determinada mediante el número más probable (NMP) osciló entre 1,2 x 10⁶ y 8,1 10⁷ propágulos por gramo (ppg/g.). El inóculo de *B. cepacia* utilizado fue el preparado en vermiculita, probándose concentraciones de [1]=8x10⁷, [2]=6,5x10⁸, [3]=1x10⁹ y [4]=4x10¹¹ UFC. ml⁻¹. De ellas se tomaron porciones de 5, 10, 15, y 20g para las distintas series de macetas. De la muestra inoculada se recogieron muestras de 100g para hacer un recuento de la población inicial del antagonista mediante disoluciones decimales usando un detergente no iónico.

Las macetas se dispusieron al azar en bloques completos en la Estación de Experimentación Agrícola de la Universidad de Murcia. Se regaron con agua corriente cada dos o tres días y se enriquecieron con una solución de NPK cada dos semanas. La temperatura osciló entre 25 y 30°C. Díez plantas fueron utilizadas por cada tratamiento y los ensayos se repitieron tres veces.

B- En suelo: se realizaron dos ensayos en el campo de la Estación de Experimentación Agrícola de la Universidad de Murcia. Las plantas se cultivaron como hemos indicado anteriormente. Alcanzados los tres meses de edad se transplantaron al suelo, en hoyos distanciados 70 cm por 40 cm en los que se añadieron, mezclados con la tierra, 15 g por hoyo del medio vermiculita-antagonista. Pasados siete días del trasplante se removió el suelo a nivel de la rizosfera, formando un círculo alrededor de la planta, se infectaron las plantas con *P. capsici* y se cubrieron de nuevo. El riego se hizo por goteo usando emisores auto-compensativos de 4l/h y la fertilización se realizó cada tres semanas con un sistema de inyección de fertilizantes (NPK) mediante un tanque de abonado (ATF0040, Novo Ris, Zaragoza, España) conectado a la red de riego. Los resultados se tomaron a los dos meses del trasplante tanto en macetas como en el suelo.

Análisis estadístico

Los efectos de las diferentes combinaciones de la bacteria sobre el peso y el crecimiento de las plantas de pimiento y sobre el marchitamiento o las manchas foliares, se analizaron estadísticamente usando el test

de Fisher MDS (de la mínima diferencia significativa) con un $P = 0,05$.

Resultados y discusión

Confrontación in vitro de *B. cepacia* frente al patógeno *P. capsici*

La inhibición varió según el medio de cultivo, fue efectiva en PDA y muy débil en AA, también influían la temperatura y el pH. En las placas de cultivo in vitro en PDA, la zona de inhibición producida por *B. cepacia* frente al patógeno aumenta a medida que transcurre el tiempo, acompañado de la destrucción del micelio fúngico desarrollado hasta ese momento. La viabilidad o muerte del patógeno, comprobadas por observaciones periódicas, mostraron que se producía la detención de la expansión del patógeno. En la Figura 1 se muestra la evolución de la inhibición, la destrucción del crecimiento vegetativo y finalmente la muerte de *P. capsici* por *B. cepacia*. En la figura 1A se observa que *B. cepacia* no solo inhibió la expansión de *P. capsici* que deja de extenderse en la zona o campo de acción de los antibióticos que difunden en el medio sino que a los 5 días comenzó la degradación o muerte (Fig. 1B). Esta se manifestó por la aparición de un suave color verde amarillento en la zona de aproximación, acompañado de la desaparición progresiva del micelio fúngico (Fig. 1C). La zona necrosada fue aumentando y a los 10 días la desaparición del micelio es completa. La colonia de *P. capsici* quedó reducida a una masa gelatinosa de color amarillento (Fig. 1D).

Diversos autores han responsabilizado de la inhibición y destrucción del micelio de hongos patógenos a la acción de uno o varios antibióticos producidos por bacterias (Elander et al. 1968, Rosales et al. 1995, Kraus & Loper 1995, De La Fuente et al. 2001). Estos autores trabajaron con varias cepas de *Pseudomonas cepacia* y detectaron antibióticos como pirrol-nitrina y pioluteorina, con un amplio espectro anti-fúngico.

Los diámetros de crecimiento del patógeno y el antagonista en los cultivos duales se compararon con la escala utilizada por Sid Ahmed et al. (2003b) que va desde [0]: ninguna invasión de la superficie de la colonia del patógeno a [5]: invasión total. Pasadas 48 horas de incubación, *B. cepacia* produjo un porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de *P. capsici* de aproximadamente 40% en la escala de capacidad antagónica que equivale a [3] de invasión de la superficie de la colonia de *P. capsici* por el antagonista. A partir de 96 horas se produjo un PICR de 81% y a partir de los 8 días *B. cepacia* invadió

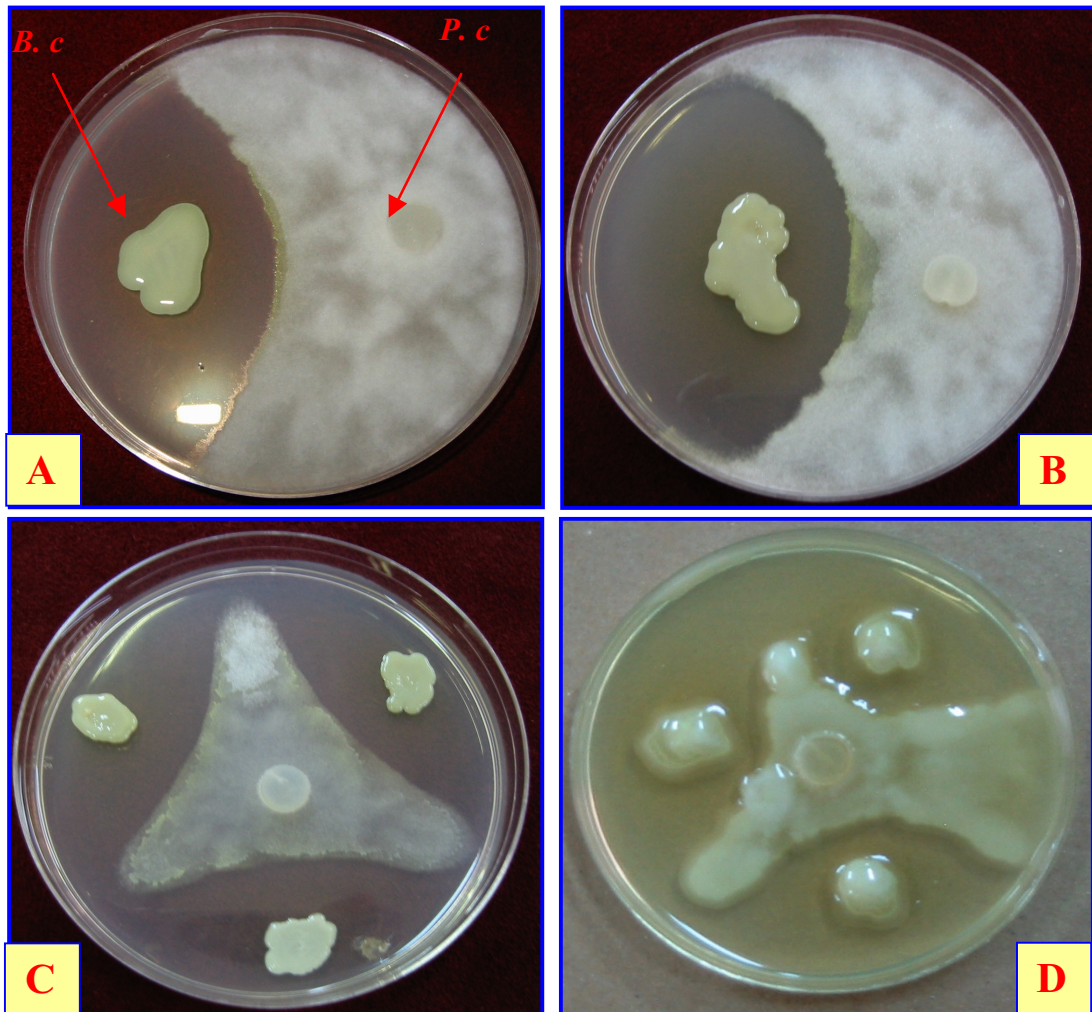


Figura 1. [A], [B], [C] y [D]: Cronología de inhibición (antibiosis) y destrucción del crecimiento vegetativo de *Phytophthora capsici* en presencia de *Burkholderia cepacia*. Confrontación in vitro en medio PDA.

con valor de [5] que significa que la bacteria antagonista fue capaz de cubrir totalmente al patógeno *P. capsici*. La incidencia de la temperatura y el pH de incubación en la actividad antagonista son factores a tener en cuenta. En los medios Czapek y PDA la inhibición de *P. capsici* por *B. cepacia* a partir de 25, 27 y 30°C fue superior a lo observado a 23°C. A pH 4,5 se observó una notable reducción en la velocidad de crecimiento y la densidad de la colonia de *P. capsici*.

En las interacciones entre el antagonista y *P. capsici* observadas por microscopía electrónica de barrido, comprobamos que la alteración del crecimiento vegetativo del patógeno empieza a notarse a partir del segundo día después de la confrontación. Las interacciones en la zona de inhibición se muestran en la Fig. 2 donde se observa deformación morfológica, desorganización y formación de hipertrofias esféricas sobre las hifas de *P. capsici*. La desintegración de

las paredes miceliales da como resultado la destrucción total de la colonia de *P. capsici*. Estos resultados demuestran la particular habilidad parásita del antagonista que finalmente es capaz de inhibir el crecimiento del patógeno.

Efecto del filtrado de *Burkholderia cepacia* sobre la germinación de las semillas de pimiento

El porcentaje de germinación de las semillas no varió en presencia o ausencia del filtrado de *B. cepacia*, cuando se hizo crecer en medio PDB (resultados no mostrados). En esas condiciones no se afectó ni la germinación ni el crecimiento de las semillas, en contraposición con lo ocurrido con el filtrado de *Trichoderma harzianum* crecido en PDB que afectó negativamente el crecimiento de las radículas de las semillas (Ezziyyani 2004). Estos resultados indican la inocuidad del filtrado del antagonista sobre semi-

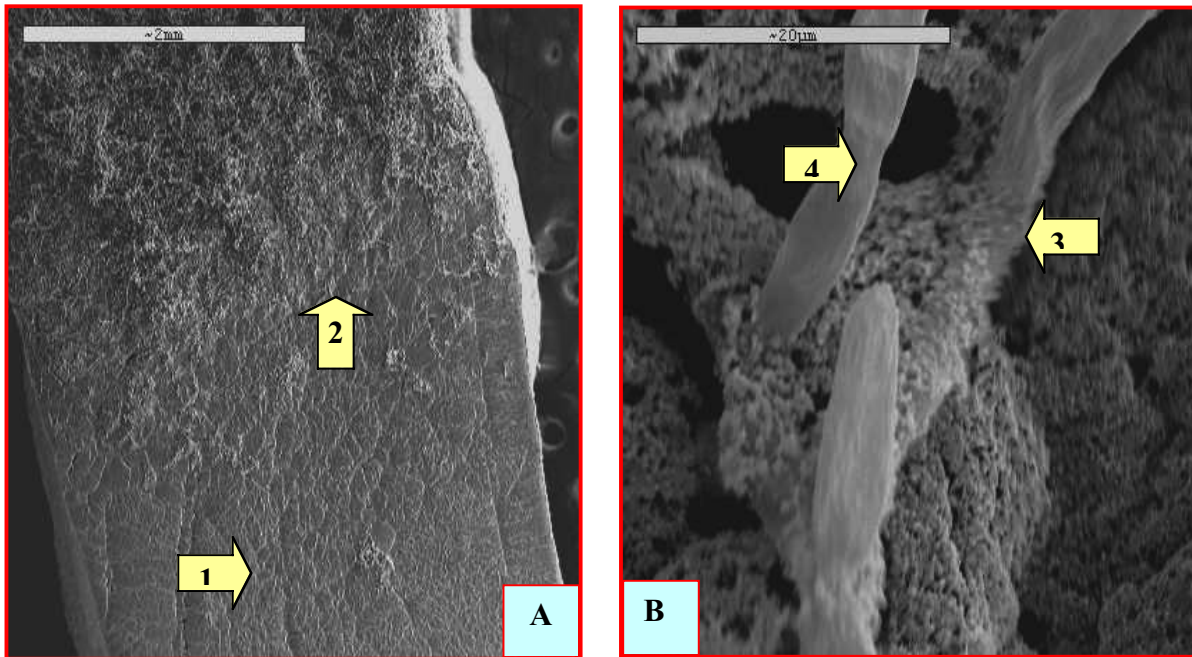


Figura 2. Fotomicrografías de las interacciones entre *Burkholderia cepacia* (Bc) y *Phytophthora capsici* (Pc), vistos en microscopía electrónica de barrido. [A]: Antibiosis (1) y comienzo de la desintegración de las hifas del patógeno Pc (2). [B]: Adhesión, proliferación y formación de hipertrofias esféricas sobre las hifas de Pc (3) y (4) destrucción total del micelio.

llas de pimiento pero también su falta de efecto sobre la germinación.

Test de inhibición de las «manchas foliares» en las hojas de pimiento recién cortadas

La gravedad de las manchas foliares causadas por *P. capsici*, no variaba significativamente, entre los distintos ensayos, e incluso entre las hojas del mismo tratamiento en el mismo ensayo.

La Figura 3, muestra los resultados de las manchas foliares (suma de los valores de la lesión / hoja) en función del crecimiento del hongo patógeno *P. capsici*, desde el punto de inoculación. En cada grupo de columnas, las encabezadas con las mismas letras, no son estadísticamente diferentes según el test MSD a $P = 0.05$.

Se utilizaron tres concentraciones de *B. cepacia* a partir de un mínimo, sabiendo que una dosis mayor de la requerida no aumenta la eficacia en el biocontrol (Montesinos & Bonaterra 1996). Se consiguieron varios grados de reducción de las manchas, pero estas reducciones no se correlacionaban con las concentraciones del antagonista utilizadas. La extensión máxima de las manchas, en hojas tratadas con la concentración de *B. cepacia* $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, fue de 0,444 mm por hoja. Estos resultados demuestran que *B. cepacia* es capaz de disminuir las manchas foliares en las plantas tratadas con la bacteria como anta-

gonista, ya que en las hojas tratadas solo con el patógeno, aparecen los síntomas de marchitamiento a las 24 horas de la infección y a los 5 días las hojas quedaron totalmente invadidas.

Evaluación «in vivo» del tratamiento de la podredumbre causada por *P. capsici*

En los experimentos in vitro, *B. cepacia* no sólo inhibe la expansión de *P. capsici* sino que a los cinco días comienza la degradación de *P. capsici* en la zona más próxima, acompañada de la desaparición progresiva del micelio fúngico. Esta destrucción podría resultar de la presencia de compuestos orgánicos pequeños tales como fenazina, 2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina y pioluteorina, que a bajas concentraciones (del orden de los mg/ml) pueden inhibir o matar otros fitopatógenos (Maurhofer et al. 1994, Rodríguez & Pfender 1997). El antagonista se utilizó después de un crecimiento en medio de cultivo soportado por vermiculita en el que la biomasa se mantiene en plenas condiciones morfo-fisiológicas a la hora de pasarlo al suelo.

La máxima reducción de la enfermedad se obtuvo con la adición de *B. cepacia*, a una concentración de 1×10^9 UFC/ml crecida en vermiculita-PDB. La mayor diferencia de efectividad en la reducción de la enfermedad se logró cuando las raíces fueron empapadas con el antagonista crecido en vermiculita,

Tratamientos	Podredumbre causada por <i>P. capsici</i>
Control: (NT&NI)	0,00 a
<i>P. capsici</i> : (NT&I)	5,00 c
<i>B. cepacia</i> + <i>P. capsici</i> : (T&I) «M»	2,22 a
<i>B. cepacia</i> + <i>P. capsici</i> : (T&I) «S»	3,15 b
<i>B. cepacia</i> : (T&NI)	0,00 a

Tabla 1. Efecto del tratamiento in vivo de *Burkholderia cepacia* sobre la podredumbre de la planta de pimiento causada por *Phytophthora capsici*. Evaluación mediante una escala graduada de 0 (ningún síntoma) a 5 (planta muerta). Los valores de la podredumbre son las medias por planta y tratamientos. Las medias seguidas por las mismas letras no son significativamente diferentes según el test LSD a $P = 0.05$. [M = Macetas; S= Suelo]. Plantas, T= tratadas con *B.c.*; NT= no tratadas; I= Inoculadas con *Pc*; NI= no inoculadas.

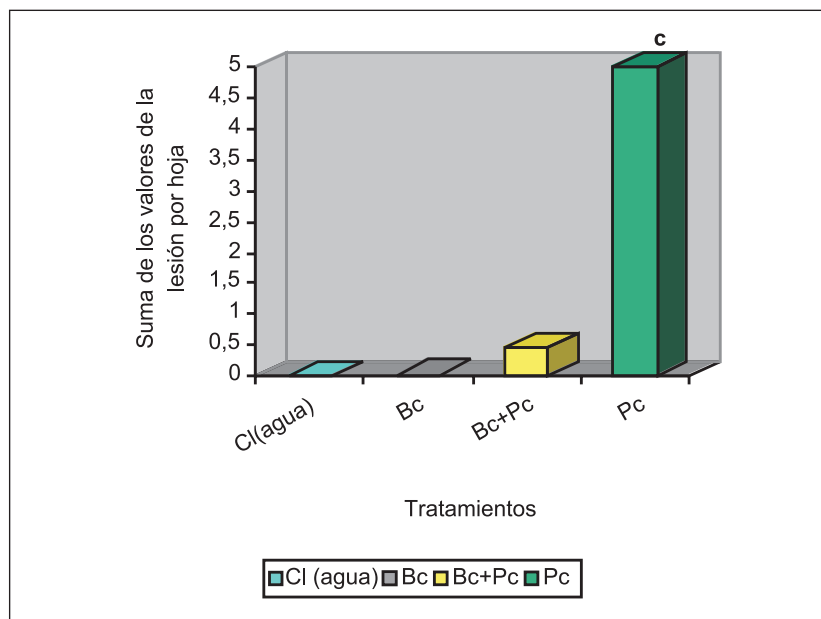


Figura 3. Efecto de los tratamientos con *Burkholderia cepacia* (Bc) sobre las manchas foliares causadas por *Phytophthora capsici* (Pc). El control (Cl) se ha realizado con agua. En cada columna, el valor medio de los datos no muestra diferencias significativas de acuerdo al test de Fisher MDS con un $P = 0,05$.

frente al tratamiento con la suspensión de las colonias bacterianas mantenidas en agua destilada estéril. El tratamiento con agua fue el utilizado como control frente a la adición de la bacteria.

En las plantas (NT&I) no tratadas e inoculadas con *P. capsici*, la podredumbre de la raíz alcanzó 5.0 sobre la escala usada (Tabla 1). El tratamiento de las plantas con el antagonista *B. cepacia* creciendo en vermiculita: plantas (T&I) tratadas e inoculadas, redujo la enfermedad a 2,22 en macetas y a 3,15 en suelo, tomando 5 como máximo, lo cual equivale a una reducción porcentual del 37% y del 55,6% respectivamente. El tratamiento de las plantas con la bacteria sola: plantas (T&NI) tratadas y no-inoculadas, indica que *B. cepacia* no es patógena de pimiento y puede ser usada con total seguridad como antagonista en los ensayos de biocontrol. La disminución de la podredumbre debida al patógeno por la bacte-

ria permite señalar que el antagonista ejerció un buen control sobre *P. capsici* y los ensayos de cultivo in vivo nos han confirmado su viabilidad en el suelo. Después de la aplicación de la bacteria antagonista a la rizosfera de las plantas de pimiento se ha observado que su desarrollo sigue un patrón determinado, independientemente de la concentración inicial del inóculo y además se demuestra que su concentración se mantiene en continuo crecimiento. Nuestros resultados indican que su acción se basa, entre otros, en el mecanismo de antibiosis que desintegra el micelio del patógeno impidiendo su proliferación.

Así, bajo esta perspectiva y basándonos en los resultados obtenidos hasta ahora, in vitro e in vivo concluimos que el uso de la cepa *Burkholderia cepacia* es eficaz en el control biológico de *Phytophthora capsici* y también podría serlo en el control de otros hongos telúricos como *Fusarium spp.* y *Rhizoctonia*

spp. y una de las alternativas principales a la utilización de productos químicos.

Agradecimientos

M. Ezziyyani ha sido Becario MAE durante la realización de este trabajo.

Referencias

- Candela ME, Alcázar MD, Espín A, Egea-Gilbert C & Almela L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44: 116-123.
- De la Fuente L, Bajsa N, Bagnasco P, Quagliotto L, Thomashow L & Arias A. 2001. Antibiotic production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from forage legume rhizosphere. *Journal of Applied Microbiology* 90: 421-429
- Elad Y & Baker R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of clamidospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75: 1053
- Elander RP, Mabe JA, Hamill RH & Gorman M. 1968. Metabolism of tryptophans by *Pseudomonas aureofaciens*. VI. Production of pyrrolnitrin by selected *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology* 16: 753-758
- Ezziyyani M. 2004. Biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) mediante una combinación de microorganismos antagonistas. Murcia: Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Kimer S, Hammer PE, Hill DS, Altmann A, Fischer I, Weislo LJ, Lanahan M, Vanpee KH & Ligon JM. 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*. 180: 939-1943.
- Kraus J & Loper JE. 1995. Characterization of genomic required for production of antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied Environmental Microbiology* 61: 849-854.
- Loper JE & Henkels MD. 1997. Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Applied Environmental Microbiology* 63: 99-105.
- Leeman M, Van Pelt JA, DeOuden FM, Heinsbroek M & Bakker PAHM. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to *Fusarium* wilt, using a novel bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 101: 655-664.
- Maurhofer M, Keel C, Haas D & Defago G. 1994. Phytoalexin production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 is involved in the suppression of *Pythium damping-off* of cress but not of cucumber. *European Journal of Plant Pathology* 100: 221-232.
- Montesinos E & Bonaterra A. 1996. Dose-response models in biological control of plant pathogens. An empirical verification. *Phytopathology* 86: 464-472.
- Ongena M, Daayf F, Jaques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC, Comédis P, Koedam N & Bélanger RR. 1999. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent *Pseudomonads*: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiotics. *Plant Pathology* 48: 66-76.
- Rodríguez F & Pfender WF. 1997. Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in vitro and in planta. *Phytopathology* 87:614-621
- Rosales AM, Thomashow RJC & Mew TW. 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 85: 1028-1032.
- Sid Ahmed A, Ezziyyani M, Pérez Sánchez C. & Candela ME. 2003a. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109: 418-426.
- Sid Ahmed A, Ezziyyani M, Egea Gilibert C & Candela ME. 2003b. Selecting bacterial stains for use in the biocontrol of diseases caused by *Phytophthora capsici* and *Alternaria alternata* in sweet pepper plants. *Biologia Plantarum* 47: 569-574.