

# Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*

Mohammed Ezziyani, Consuelo Pérez Sánchez, María Emilia Requena, Luis Rubio & María Emilia Candela  
Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100-Espinardo, Murcia, España.

## Resumen

Correspondencia  
M. E. Candela  
Tel.: +34 968 364943  
Fax: +34 968 363963  
E-mail: mcandela@um.es  
**Recibido:** 30 Abril 2004  
**Aceptado:** 8 Junio 2004

Se ha realizado un aislamiento de antagonistas del Oomiceto patógeno de plantas de pimiento *Phytophthora capsici* seleccionándose un aislado bacteriano identificado como *Streptomyces rochei* y denominado Ziyani. En confrontaciones in vitro el aislado originó una zona de inhibición por vertido de antibióticos que produjo un porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno del 40% a las 48 h y del 81% a las 96 h. A los 7 días el antagonista invadió completamente la colonia del oomiceto, desintegrándola y esporulando sobre ella. La microscopía electrónica de barrido en la zona de inhibición nos muestra un enrollamiento masivo de las hifas del patógeno por la bacteria. Este micoparasitismo provocó la lisis y desintegración de las hifas del patógeno. La adición del aislado a plantas de pimiento redujo el marchitamiento hasta un 65%. Las plantas presentaron un color verde más intenso, aunque no se detectaron cambios en el peso seco ni en la longitud de las plántulas frente al control. El aislado se cultiva en vermiculita + caldo nutritivo lo que permite su viabilidad en el tiempo y su adición directamente a las plantas. La concentración de 1.900 UFC/ml del aislado bacteriano es la que consiguió la mayor reducción de los síntomas de la tristeza.

**Palabras clave:** *Streptomyces rochei* –Ziyani–, Biocontrol, *Phytophthora capsici*, *Capsicum annuum*.

## Abstract

*Biocontrol of pepper (Capsicum annuum L.) root rot caused by Phytophthora capsici using Streptomyces rochei Ziyani.*

Antagonists of the pathogenic Oomycete of pepper plants, *Phytophthora capsici*, were isolated, selecting a bacterial isolate identified as *Streptomyces rochei* and denominated Ziyani. During in vitro confrontations, the isolate produced inhibition zone by producing antibiotics. The radial growth of the pathogen was reduced by 48% at 48 hours and 81% at 96 hours. After 7 days the antagonist had completely invaded the Oomycete colony fragmenting it and sporulating throughout it. Scand electronic microscopy of the inhibition zone revealed the massive rolling up of the pathogen's hyphae. This micro parasitism led to lysis and disintegration of the hyphae. The addition of the isolate to plants reduced root rot by up to 65%. The treated plants were a more intense green and no changes in dry weight or seedling length were detected

compared with the control. The isolate can be cultivated in vermiculite + nutrient solution, which prolongs its life and facilitates its direct action in plants. The greatest decrease in root rot symptoms was attained with a concentration of 1,900 CFU/ml.

**Key words:** *Streptomyces rochei* –Ziyani–, Biocontrol, *Phytophthora capsici*, *Capsicum annuum*.

## Introducción

La enfermedad conocida como «tristeza del pimiento» está ocasionada por el oomiceto patógeno *Phytophthora capsici*. Este provoca una muerte prematura de la planta por marchitamiento al que también se asocia la obstrucción de haces vasculares González-Chavira (2002). La enfermedad se encuentra presente en todo el mundo y en los últimos años varias aportaciones señalan a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. como patógenos asociados con el síndrome ya que ambos están asociados con daños a la raíz en diferentes cultivos (Duran-Ortiz 2001, Espinoza-López & Mendoza Zamora 2001, Rico-Guerrero et al. 2001, Guerrero-Aguilar et al. 2001, López-Vázquez et al. 2002). De estos resultados se sugiere que *Phytophthora* y *Fusarium* son los principales causantes del daño y *Rhizoctonia solani* solo es un hongo oportunista que se alimenta del tejido muerto. Una de las hipótesis que se está manejando es que *Phytophthora* es el patógeno que entra primero a la planta y facilita la entrada a los otros dos y que es probable que para obtener una variedad tolerante a este síndrome sea necesario conjuntar en ella resistencia a *Phytophthora capsici* y a *Fusarium* spp. (González-Chavira et al. 2002).

Bajo esta perspectiva, nosotros pensamos que la búsqueda de microorganismos autóctonos podría ser eficaz, en el control biológico de estos hongos y una alternativa principal a la utilización de productos químicos.

Los Actinomicetes y microorganismos relacionados, probablemente representan el grupo de bacterias más grande y diverso. El olor característico a tierra húmeda se debe a su actividad metabólica y a la producción de terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal y animal. El orden de los Actinomicetales comprende 63 géneros constituyendo, aproximadamente el 20-60% de la población microbiana del suelo. Este grupo está conformado por microorganismos gran positivos, unicelulares, en forma de bacilos y casi todos sus miembros desarrollan un micelio filamentoso. Además de la función ecológica de los Actinomicetes, estos microorganismos son

de suma importancia debido a que han demostrado ser la fuente más importante de metabolitos secundarios bioactivos de valor industrial y comercial (Bowen & Rovira 1999, Omura et al. 1999). Hasta la fecha se sabe que varios antifúngicos activos contra patógenos fúngicos se han aislado y caracterizado (Aizawa et al. 1982, Kim et al. 1999, Hwang et al. 2001, Rodríguez et al. 2002, Remsing et al. 2003), lo cual apoya las perspectivas prometedoras del uso de géneros de *Streptomyces* en el biocontrol de hongos patógenos de plantas.

El objetivo principal de este trabajo es el aislamiento y selección de microorganismos del género *Streptomyces* asociados de forma natural con las plantas de pimiento y su entorno, para seleccionar aquellos que inhiban el crecimiento de patógenos telúricos como *Phytophthora capsici* y que no sean perjudiciales para las plantas de pimiento. Los ensayos comenzarán con la optimización de las condiciones de cultivo de la pareja patógeno-antagonista in vitro, pues para establecer un programa de control biológico hay que optimizar sus requerimientos ambientales, de pH y cultivo para después aplicarlos a los ensayos en campo o invernaderos. Al mismo tiempo se realizarán ensayos para determinar los mecanismos de acción del antagonismo y para finalizar se analizarán los efectos del aislado antagonista, tanto en semillas, como en plantas de pimiento, en la reducción del marchitamiento causado por *P. capsici*.

## Material y métodos

### Material vegetal

La variedad de pimiento (*Capsicum annuum*, L.) objeto de estudio, es California Wonder, una variedad muy sensible al ataque del hongo *P. capsici*. La siembra se realizó con semillas desinfectadas en una disolución comercial de hipoclorito sódico al 2% (v/v) durante 5 minutos, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, y se pusieron a germinar en bandejas alveolares de 48 senos (4x4x14 cm), conteniendo una mezcla de turba, arena y vermiculita (3:1:1/2) esterilizada. Las bandejas se instalaron, en el invernadero de la Estación de Experimentación Agrícola

de la Universidad de Murcia (EEA-UMU). Las plantas se mantuvieron en estas condiciones hasta que alcanzaron la quinta o sexta hoja verdadera, momento en que se transplantaron a macetas o al suelo donde fueron inoculadas con *P. capsici* (Ezziyany et al. 2001).

### Patógeno

Es el oomiceto *Phytophthora capsici*, aislado 15, cepa extremadamente agresiva utilizada por nuestro equipo de investigación (Candela et al. 1995), y conservada en el medio PDA (patata-dextrosa-agar de Difco), en placas Petri.

Se cultivó también en frascos Erlenmeyer de 1000 ml con una mezcla formada por 150 g de vermiculita esterilizada y 200 ml de medio PDB (caldo-patata-dextrosa). La mezcla se esterilizó en autoclave y se sembró con cuatro discos de 5 mm de diámetro cortados del margen de la colonia miceliana de *P. capsici* crecida en medio PDA. El cultivo se incubó en estufa a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante tres semanas para la obtención del inóculo.

### Aislamiento y selección de microorganismos antagonistas

Para la selección de cepas de microorganismos autóctonos, potenciales agentes de biocontrol de *P. capsici*, se recolectaron plantas de pimiento y suelo de las zonas de cultivo deseado. Las raíces se lavaron con agua destilada estéril y el agua de lavado se homogeneizó a 200 rpm durante 60 min preparándose diluciones decimales desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-6}$  con PA (peptona-agua al 0,1%) como diluyente. Se sembraron cuatro placas de Petri con 1 ml a partir de cada dilución, cubriéndolas y mezclándolas con el medio NA (agar nutritivo standar, Merk). Las placas fueron incubadas en una estufa a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  de uno a tres días. Así mismo, trozos de raíces, hojas y tallos de aproximadamente 1 cm de longitud, se colocaron asépticamente en placas de Petri conteniendo el medio NA (agar nutritivo, Merk) y se incubaron a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en oscuridad durante tres o cuatro días.

Simultáneamente se introdujeron 100 g del suelo de la rizósfera en un frasco conteniendo 250 ml de PA, se agitó durante una hora y se prepararon diluciones decimales de  $10^{-2}$  hasta  $10^{-6}$ . Se sembraron cuatro placas con 100 ml de cada dilución y se incubaron en una estufa a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los microorganismos bacterianos crecidos se aislaron, se purificaron y se comprobó sus acciones antagonistas en PDA y Czapek-agar a  $\text{pH } 5,6 \pm 0,2$ . Los microorganismos

aislados se confrontaron in vitro con el patógeno *P. capsici* e in vivo con plantas de pimiento para analizar su capacidad antagonista frente al patógeno y su no patogenicidad frente a las plantas.

### Identificación del aislado antagonista

La identificación del aislado antagonista se hizo mediante la observación del crecimiento, la morfología microscópica y de la colonia, y el uso de las siguientes pruebas: la reacción Gram, la formación de esporas y cadenas, la movilidad, la reacción de catalasa, la reacción de oxidasa, la reducción de nitrato, la hidrólisis de gelatina y la producción de indol. Además de estos tests, se usaron los API 20E y API 50 CH (API, Vercieu, Francia). Los resultados obtenidos se analizaron siguiendo las claves de identificación de API y Bergey (Breed et al. 1957).

### Comprobación de la no patogenicidad del aislado

El tratamiento se realizó, empapando las raíces de las plantas de pimiento de dos meses de edad con suspensiones del aislado. Para ello, se prepararon cuatro concentraciones de [1] = 902, [2] = 4800, [3] = 9530 hasta [4] = 22460 UFC  $\text{ml}^{-1}$ . Diez mililitros de cada concentración se añadieron directamente alrededor del cuello de la planta. En los tallos, hojas y frutos se practicaron incisiones superficiales mediante un escalpelo estéril, que a continuación se pulverizaron con cada una de las suspensiones microbianas hasta que la planta quedó completamente mojada.

Las plantas de cada tratamiento se dispusieron al azar en bloques completos en el suelo de la EEA de la UMU, se regaron con agua corriente cada dos o tres días, abonándose con una solución de N, P, K cada dos semanas. La temperatura osciló entre 23 y  $30^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa entre 65 y 85%. Para cada tratamiento se utilizaron diez plantas y los ensayos se repitieron tres veces. A los tres meses se examinaron raíces, tallos, hojas y frutos.

### Confrontación «in vitro» del aislado bacteriano y *P. capsici*

Las acciones del antagonista se comprobaron, haciéndolo crecer en medios: PDA, Czapek-agar y A-A (Agua-agar al 2%). Los inóculos se obtuvieron tomando discos de 5 mm de diámetro del borde de la colonia miceliana de *P. capsici*. En los distintos medios de cultivo se dispusieron en puntos equidistantes, el patógeno y el antagonista. Éste se sembró mediante toques superficiales del medio de cultivo con una asa

estéril y las placas se incubaron en estufa a 23, 25, 27 y 30°C de temperatura. Como testigos se prepararon en los mismos medios, placas sembradas solo con *P. capsici*. La comprobación de los distintos mecanismos antagonistas se verificó de tres maneras, observación directa de la placa, microscopía óptica y microscopía electrónica. Para las pruebas con microscopio se tomaron trozos de agar de 2x2 mm de la zona de interacción.

### Microscopía electrónica de barrido

Las muestras para microscopía electrónica de barrido proceden de la zona de inhibición entre el aislado y *P. capsici*. Las muestras se prefijaron a 4°C durante dos horas por inmersión en una disolución compuesta por glutaraldehído (25%) al 3% en tampón cacodilato sódico (Prolabo, Barcelona) 0,1M a pH 7,2 y a continuación se lavaron tres veces con el mismo tampón durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente se fijaron por inmersión en tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas a 4°C en la oscuridad.

La deshidratación se efectuó en etapas de 15 minutos con disoluciones crecientes de etanol de 30, 50, 70, 90 y 100% secándose mediante el método del punto crítico (etanol/CO<sub>2</sub> líquido). Se montaron sobre un pedestal con pintura conductiva de grafito y se cubrieron con un metal pesado (oro o platino pálido) por los métodos de evaporación en «sputtering». El examen se hizo con un microscopio electrónico Jeol T- 6.100.

### Preparación de la suspensión del aislado bacteriano en vermiculita+ NB

Se realizó adicionando a frascos Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 150 ml de NB (caldo nutritivo), previamente esterilizado, un disco de 2 mm de diámetro cortado del borde de la colonia del aislado bacteriano crecido en medio NA. Los frascos se incubaron con agitación a 120 rpm a temperatura ambiente en el laboratorio. Con el fin de favorecer una alta producción de la bacteria, los frascos se retiraron del agitador al cabo de dos semanas y se mantuvieron en estufa a 28°C durante cinco días. En esas condiciones las colonias crecen por desarrollo de sus hifas y entonces se pasan de nuevo al agitador donde se mantienen durante cuatro o cinco días más. Las colonias bacterianas así obtenidas se separaron del caldo nutritivo por decantación y se transfirieron a frascos Erlenmeyer de 1.000 ml conteniendo una mezcla estéril de 150 g de vermiculita fina y 200 ml de NB. Se probaron rangos de crecimiento variando temperatura y pH. Las temperaturas analizadas fueron 23,

25, 27 y 30°C. El pH se ajustó analizando su incidencia en el crecimiento bacteriano y se probaron pHs de 4,5, 5, 5,5 y 6.

### Tratamiento de semillas con la suspensión del aislado bacteriano

Se utilizaron semillas de pimiento esterilizadas en una disolución de hipoclorito sódico (Domestos) al 20% (v/v) durante 20 minutos, seguidas de tres lavados de cinco minutos en agua destilada estéril. Las semillas se introdujeron en suspensión del aislado en agua sacarosa al 3% durante diez minutos, se retiraron y el exceso de agua se absorbió mediante un papel de filtro estéril en una placa de Petri, bajo corriente de aire en la Cámara de flujo laminar. Se sembraron 100 semillas tratadas, en bandejas de 27x17x4 cm desinfectadas, que contenían 60 g de vermiculita esterilizada. Las bandejas se instalaron en una cámara de cultivo a 25°C ± 2°C, se regaron con 80 ml de agua destilada por bandeja cada dos días y cada diez días se abonaron con 5 ml de una solución fertilizante (Combo, Barcelona, España) hasta la aparición de los primeros cotiledones. El control consistió en introducir semillas desinfectadas en una solución estéril de agua destilada-sacarosa al 3%.

Para hacer el recuento de la población inicial del antagonista adherido a cada semilla, se separan 5 semillas tratadas con el aislado y se molieron añadiendo 9 ml de PA en un mortero. A partir de la suspensión se prepararon una serie de diluciones decimales y se sembraron en el medio NA. Las placas se incubaron a 27°C en oscuridad y el recuento se hizo por microscopía después de 48 h.

### Tratamiento in vivo del patógeno con el aislado bacteriano crecido en vermiculita

1- En macetas: el sustrato utilizado, 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, 15 g del preparado del patógeno *P. capsici* crecido en vermiculita se agregaron directamente a las macetas para asegurar una buena infección. La población inicial determinada (NMP) osciló entre 1,2x10<sup>6</sup> ppg/g y 8,1x10<sup>7</sup> ppg/g. El inóculo del aislado bacteriano utilizado fue el preparado en vermiculita, y se inocularon dosis de 5, 10, 15 y 20 g/ maceta de concentración. De la mezcla inoculada se recogieron muestras de 100 g para hacer un recuento de la población inicial de cada antagonista, mediante diluciones decimales usando un

detergente no iónico. Las macetas se dispusieron al azar en bloques completos en la E.E.A. de la UMU. 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. Diez plantas fueron utilizadas por cada tratamiento y los ensayos se repitieron tres veces.

2- En suelo en la E.E.A. de UMU se realizaron dos ensayos para evaluar el potencial del aislado en el control del patógeno *P. capsici*. Las plantas se cultivaron como hemos indicado anteriormente. Alcanzados los tres meses de edad se trasplantaron al suelo para la inoculación.

Se prepararon hoyos distanciados 70 cm por 40 cm, en los que fue mezclada vermiculita inoculada previamente con el antagonista a razón de 15 g/hoyo, y se rehizo el hoyo en el que se colocó la planta. Pasados siete días del trasplante se removió el suelo a la altura de la rizósfera y formando un círculo alrededor de la planta, se infectaron éstas con *P. capsici* cubriéndose lo nuevo. El riego se hizo por goteo usando emisores auto-compensativos de 4 litro/hora y la fertilización se realizó cada tres semanas con un sistema de inyección de fertilizante (NPK) mediante un tanque de abonado (ATF0040, Novo Ris, Zaragoza, España) conectado a la red de riego. La lectura de los resultados se hizo al final del segundo mes a partir del trasplante, tanto en macetas como en suelo.

## Resultados y discusión

### Selección de uno de los aislados

De los 467 aislados obtenidos, veinticinco produjeron una zona de inhibición en el crecimiento vegetativo del patógeno y cinco de ellos mostraron un efecto antagonístico frente al patógeno. Tres de los aislados, una bacteria y dos hongos fueron patógenos de la planta de pimiento.

De los cinco aislados bacterianos que mostraron un mayor efecto antagonístico frente al patógeno in vitro, sólo hemos elegido y hemos trabajado con la cepa bacteriana *Streptomyces rochei* variedad o raza Ziyani. La confrontación in vitro del aislado Ziyani con el patógeno *P. capsici*, nos muestra que se producen variados mecanismos y modos de acción como antibiosis, micoparasitismo y lisis enzimática, con los que el antagonista controla el desarrollo del patógeno (Ezziyyani 2003).

### Confrontación in vitro del aislado de *Streptomyces* frente a *P. capsici*

La intensidad de inhibición de *P. capsici*, por el antagonista in vitro varió según el medio de cultivo, la temperatura y el pH. La inhibición fue generalmente intensa en PDA y Czapek-agar, mientras que en el medio AA, las interacciones fueron menos intensas.

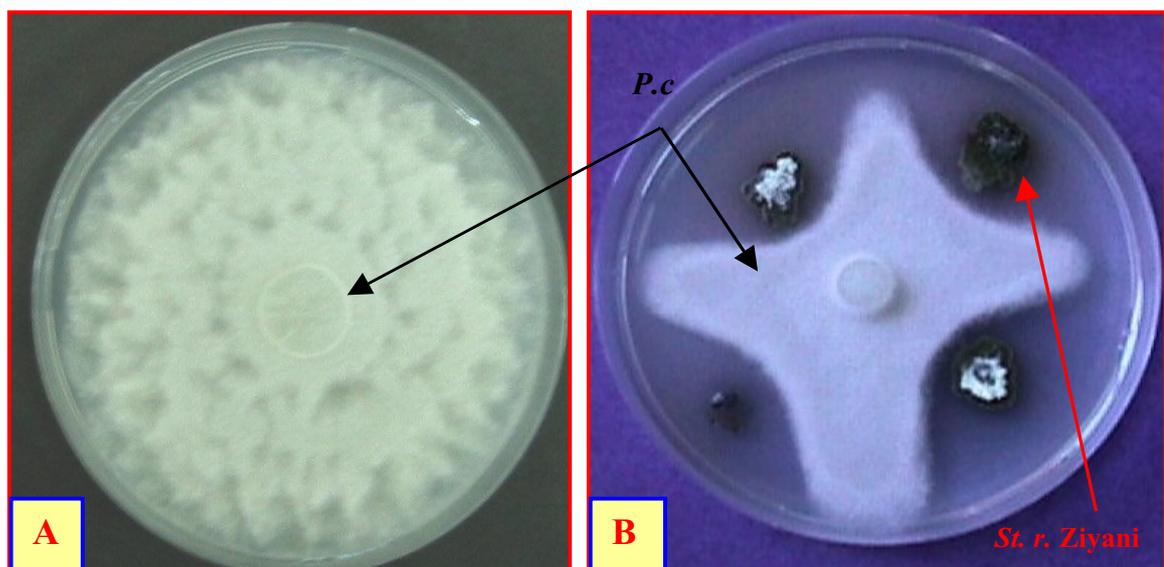


Figura 1. Confrontación de *Phytophthora capsici* frente a *Streptomyces rochei* Ziyani en medio PDA. [A]: *P. capsici* (Control). [B]: Inhibición del crecimiento vegetativo de *P. capsici* en presencia de *St. rochei* Ziyani.

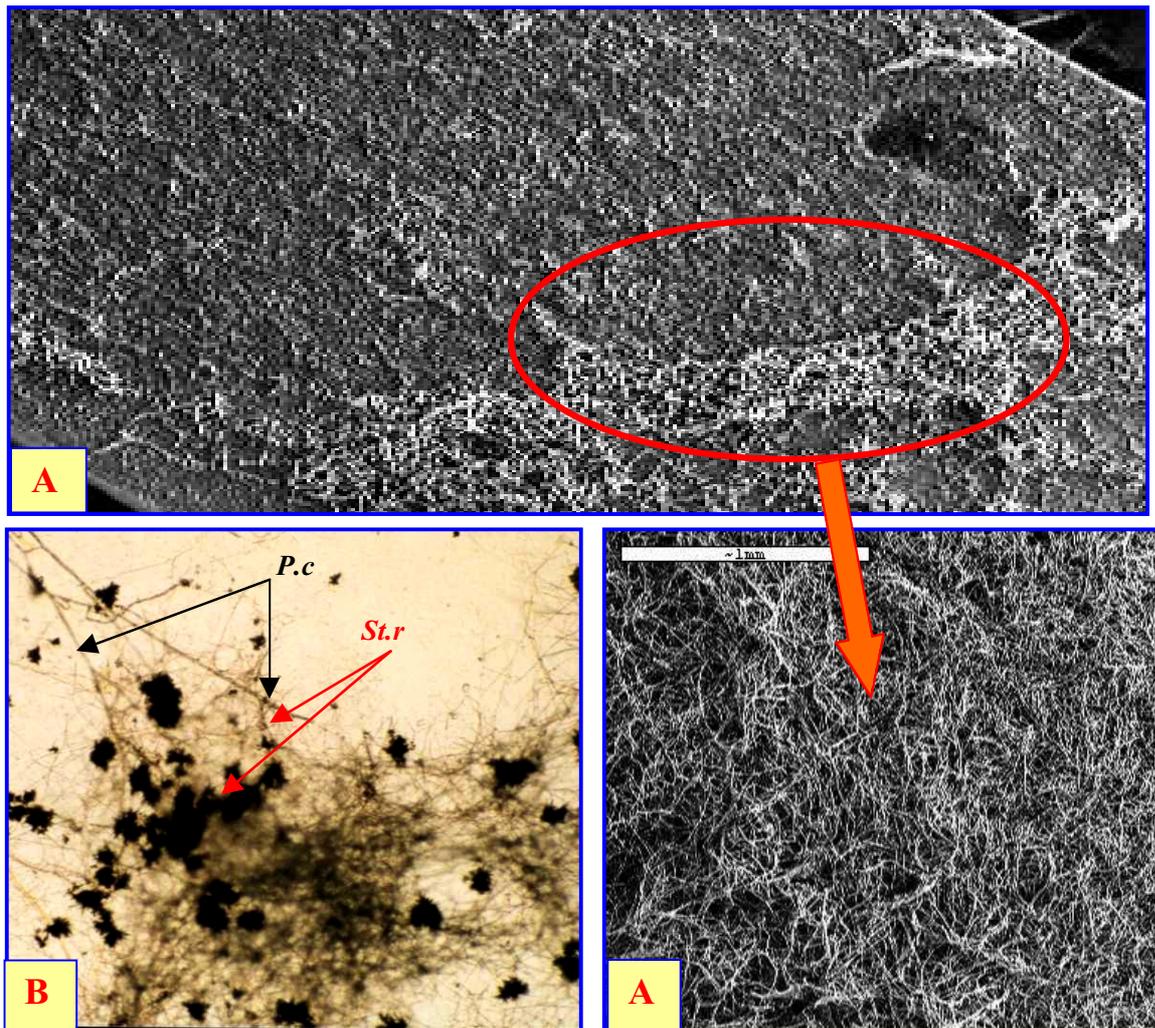


Figura 2. Confrontación de *Streptomyces rochei* Ziyani frente a *Pytophthora capsici* en PDA.

[A] Inhibición, desorganización, desintegración e invasión total de la colonia de *P. capsici* en presencia de *St. rochei* Ziyani y esporulación sobre la misma vistos al microscopio electrónico de barrido. [B]: Interacciones entre *St. rochei* Ziyani: Enrollamiento masivo de las hifas del antagonista alrededor de las de *P. capsici*, formando una red micoparasítica y provocando lisis y desintegración de las hifas del patógeno, vistos al microscopio óptico. Barra = 25  $\mu$ m.

Como se puede ver en la Fig. 1 se desarrolla una zona de inhibición producida por *St. rochei* –Ziyani–, frente al patógeno que aumenta a medida que transcurre el tiempo, incremento que va acompañado de la destrucción del micelio fúngico desarrollado hasta ese momento. También se observó que la colonia del patógeno presenta un aspecto mucho más seco, menos ondulada y fuertemente pegada al agar.

A los siete días de la confrontación, se puede observar visualmente que el antagonista ganó el espacio en la placa Petri, lo que muestra una mayor habilidad para luchar por un substrato común frente al patógeno.

Mediante microscopía óptica de la observación de las hifas del antagonista (Fig. 2.B) se comprobó que existe enrollamiento masivo alrededor de las de

*P. capsici* formando una especie de red, provocando lisis y desintegración de las hifas del patógeno. El estudio más profundo y cronológico de la interacción realizado mediante microscopía electrónica de barrido, en zonas de inhibición entre *St. rochei* –Ziyani– y *P. capsici* aparecen en la Fig. 2.A. En todos los casos se observa claramente el efecto micoparasítico de la bacteria filamentososa que produce vacuolización, deformación, enrollamiento, penetración y lisis de las hifas de *P. capsici*. Estas actuaciones alteran las funciones biológicas y fisiológicas del patógeno hasta que finalmente la bacteria destruye la colonia del *P. capsici* y esporula sobre la misma.

El resultado del antagonismo, determinado por observaciones macroscópicas y microscópicas en las interacciones de las hifas micoparasitismo, antibio-

Grado antagónico	Antagonista	Capacidad antagónica (Patógeno-antagonista)
0		Ninguna invasión de la superficie de la colonia de <i>P. capsici</i> .
1		Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia de <i>P. capsici</i> .
2		Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia de <i>P. capsici</i> .
3	<i>St. rochei</i> Ziyani	Invasión total de la superficie de la colonia de <i>P. capsici</i> .
4	<i>St. rochei</i> Ziyani	Invasión total de la superficie de la colonia de <i>P. capsici</i> y esporulación sobre ella.

Tabla 1. Evaluación del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) por *Streptomyces rochei* Ziyani.

PICR =  $(R1 - R2)/R1 \times 100$ . Donde R1 y R2 son los radios mayor y menor respectivamente de crecimiento radial de *Phytophthora capsici*.

Tratamientos	Podredumbre causada por <i>P. capsici</i>	
Control: (NT&NI)	0,00 a	0%
<i>P. capsici</i> : (NT&I)	5,00 c	100%
<i>St. rochei</i> Ziyani + <i>P. c</i> : (T&I) «Suelo»	2,25 b	55%
<i>St. rochei</i> Ziyani + <i>P. c</i> : (T&I) «Macetas»	1,75 a	65%
<i>St. rochei</i> Ziyani : (T&NI)	0,00 a	0%

Tabla 2. Efecto del tratamiento in vivo del antagonista cultivado en vermiculita, sobre la podredumbre de la planta de pimiento causada por *P. capsici*. Evaluación realizada usando una escala graduada de 0 (ningún síntoma) a 5 (planta muerta). Los valores de la podredumbre son las medias por planta y tratamiento obtenido mediante agrupaciones de los resultados de las tres repeticiones de cada tratamiento. Las medias seguidas por las mismas letras no son significativamente diferentes según el test LSD a  $P = 0,05$ .

sis y competencia por el sustrato se muestra en la tabla 1. Las medidas de los diámetros de crecimiento del patógeno y del antagonista en los cultivos duales, se realizaron con una escala de 0 a 5 donde se establece el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) en función de los radios mayor (R1) y menor (R2) de crecimiento de *P. capsici*. Se utiliza la fórmula  $PICR = (R1 - R2)/R1 \times 100$ .

Pasadas 48 horas de incubación, *St. rochei* –Ziyani– produjo un PICR de *P. capsici* de aproximadamente 40%, en la escala de capacidad antagónica. A partir de 96 horas el PICR fue de 81% y a partir de los siete días el aislado antagónico invadió totalmente el patógeno esporulando sobre el mismo.

Los resultados sobre la incidencia de la temperatura y el pH de incubación en la actividad antagónica del antagonista nos muestran que su efecto es notable y digno de tener en cuenta. En los medios Czapek y PDA la inhibición de *P. capsici* producida por *St. rochei* –Ziyani– a partir 25, 27 y 30°C fue superior a la que se produce a 23°C. A pH 4,5 se observó una notable reducción en la velocidad de crecimiento y en la densidad de la colonia de *P. capsici*, favoreciéndose la inhibición del crecimiento vegetativo del patógeno por el antagonista.

### Efecto del aislado de *Streptomyces* sobre la germinación y el crecimiento de plantas de pimiento

Las plántulas crecidas en vermiculita a partir de semillas tratadas con *St. rochei* –Ziyani– mostraron un incremento en el porcentaje de germinación. El estudio in vivo sobre la planta nos demuestra la no patogenidad del aislado seleccionado. Las concentraciones del aislado utilizadas son 902, 4.800, 9.530 y 22.460 UFC/ml y el tratamiento se realizó durante 30 días. Al cabo del mes las plantas fueron arrancadas, y ninguna de todas las concentraciones utilizadas provocaron enfermedad pues ningún tallo, hojas, frutos o raíces presentaron síntomas de infección. Es mas, la adición del aislado incluso ejerció un efecto positivo estimulando la germinación y el crecimiento de la planta (Merriman et al. 1974). El incremento del color verdoso de las hojas, puede ser debido a una inducción de la resistencia sistémica (Liu et al. 1995), pero en cambio no se detectó cambios ni en el peso seco ni en la longitud de las plántulas frente a las control.

El incremento de color y el cambio fisio-morfológico de las plántulas parece ser que varía según las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera, la

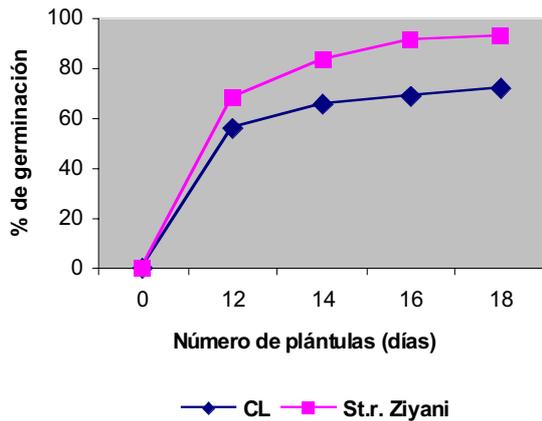


Figura 3. Porcentaje de germinación de semillas tratadas con *Streptomyces rochei* -Ziyani-. El control consiste en semillas sumergidas en una solución de sacarosa al 3%.

especie vegetal, el tipo de sustrato y las prácticas de cultivo (El-Tarabily et al. 2000). Es probable que las exudados de las raíces varíen según el sustrato donde crecen las plantas y esa variación tenga un efecto sobre la fisiología de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas y como consecuencia, se produzca una eventual producción por éstas, de moléculas con función de fitohormonas (Marc Ongena comunicación personal), o bien el efecto se deba a la capacidad de solubilizar algunos minerales para la planta.

#### Tratamiento con el aislado de *Streptomyces* sobre plantas afectadas con la «tristeza» causada por *P. capsici*

Basándonos en nuestros ensayos de infección de las plantas in vivo, hay que recordar (Ezziyyani 2003, Sid et al. 2003) que nuestra técnica de infección, con *P. capsici* creciendo en vermiculita, medio en el que el patógeno se encuentra en forma micelial y plena actividad virulenta, es más segura que utilizando el inóculo crecido en medios inductores de la producción de zoosporas. Esto se debe a que, aunque se utilice *P. capsici* en condiciones fisiológicas óptimas de crecimiento en el laboratorio, al pasarlo al suelo pierde agresividad, tal vez por factores ambientales o el estrés sufrido al pasar las zoosporas de un sustrato reducido al suelo.

El inóculo de *St. rochei* -Ziyani- más conveniente para el tratamiento de las plantas, es pues el realizado en vermiculita, pues resulta más económico, fácil de preparar y usar y de rápido crecimiento y longevidad. Así mismo su viabilidad con el paso del tiempo puede ser determinante a la hora de preparar una fórmula duradera, pero sobre todo su elección se

debe al elevado grado de inhibición contra el desarrollo de la «podredumbre» causada por *P. capsici* tanto en macetas como en el suelo. La determinación de la dosis óptima del antagonista *St. rochei* -Ziyani-, cultivado en vermiculita, y realizada en el suelo del invernadero se efectuó midiendo la podredumbre de la planta de pimiento causada por *P. capsici*. Se obtuvieron varios grados de reducción pero el mejor resultado se consiguió usando la bacteria a una concentración de 1.900 UFC/ml.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos desde 0 (ningún síntoma) a 5 (planta muerta). En las plantas no tratadas e inoculadas con *P. capsici* (NT&I) la podredumbre de la raíz alcanzó 5.0 sobre la escala usada. El tratamiento de las plantas con *St. rochei* Ziyani creciendo en vermiculita (T&I), redujo la enfermedad a 2,25 y 1,75 en suelo y en macetas respectivamente, lo cual equivale a una reducción porcentual del 55 y del 65 % mostrando diferencias significativas respecto al control. Este consistió en plantas no tratadas con el antagonista pero inoculadas con el patógeno (NT&I).

La utilización del aislado *St. rochei* -Ziyani- ha resultado decisivo en la reducción de la enfermedad y estos resultados están de acuerdo con los publicados por otros autores que achacan la inhibición a la producción de antibióticos (Ongena et al. 1999, Byung et al. 2001, Fayad et al. 2001). Como se puede observar en la Figura 2 el micoparasitismo ejercido por la red micelial desplegada por la bacteria contra el oomiceto patógeno es uno de los mecanismos de biocontrol a tener en cuenta en la interacción y estos resultados están en consonancia con los obtenidos por otros investigadores en el control de patógenos telúricos de plantas como *Phytophthora* (Homby 1990).

En este trabajo se ha demostrado la capacidad reductora de la podredumbre causada por *P. capsici* ejercida por la cepa bacteriana *St. rochei* -Ziyani- aislada por nosotros. También se ha visto su inocuidad sobre las plantas de pimiento y que entre los mecanismos desplegados está el micoparasitismo que produce una inhibición del crecimiento del patógeno que acaba en la desintegración micelial total. En las confrontaciones in vitro se produce una inhibición del crecimiento del patógeno que denota la existencia de antifúngicos vertidos al medio. Esto nos hace pensar que la producción y vertido de los compuestos con actividad antibiótica es la causa más importante de la inhibición del crecimiento del patógeno (Campos-Oliva et al. 2001). En busca de antibióticos bioactivos, otros autores han aislado nuevas cepas de *Streptomyces* de varios tipos de suelo, incluyendo arroz, fango de lago y bosque forestal, tropical, tierra bal-

día y suelos de cuevas (Broadbent et al. 1971, Shomura 1993, Xu et al. 1996, Kim et al. 2000, Innes & Allan 2001). Gomes et al. (2000), han demostrado usando los ecosistemas modelo, que el alto índice de la supervivencia de los griseoviriodis 6GL de *Streptomyces* en el suelo y su capacidad de controlar el desarrollo del fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, es debido a la actividad antifúngica causada por el antibiótico polyene del grupo del pentaene. Trabajos encaminados a identificar el antifúngico que haya podido producir nuestro aislado están en progreso.

## Agradecimientos

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

## Referencias

- Aizawa S, Seto H, & Otaka N. 1982. Capsimycin, an antibiotic active against phytopathogenic fungi. Kyoto: First International Congress of Pesticide Chemistry (IUPAC).
- Breed RS, Murray EG, Smith NR and 24 authors. 1957. *Bergey's Manual de Bacteriología Determinativa*. 7ª Ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Bowen G D & Rovira A D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advanced Agronomy*. 66: 1-99.
- Broadbent P, Baker KF & Waterworth Y. 1971. Bacterial and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in australian soil. *Australian Journal Biological Science* 24:925-944.
- Byung KH, Lim SW, Kim BS, Lee YJ & Moon SS. 2001. Isolation and In vivo and In vitro Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Applied Environmental Microbiology* 20: 3739-3745.
- Campos-Olivas R, Horr I, Bormann C, Jung G, & Gronenborn A M. 2001. Solution structure, backbone dynamic and chitin binding of the anti-fungal protein from *Streptomyces tendae* TU901. *Journal Molecular Biology* 308: 765-782.
- Candela ME, Alcázar MD, Espín A, Egea-Gilabert C & Almela L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44:116-123.
- Durán-Ortiz LJ, Pérez-Moreno L & Sánchez-Pale JR. 2001. Identificación de los hongos que ocasionan la marchitez del chile en la región del bajo. Querétano: XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología.
- El-Tarabily KA, Soliman MH, Nassar AH, Al-Hassani HA, Sivasithmparam K, Mckenna F & Hardy GE St J. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology* 49, 573-583.
- Espinoza-López LL & Mendoza Zamora C. 2001. Etiología de la pudrición de raíz y cuello del chile (*Capsicum annum* L.) ocasionado por el hongo *Phytophthora capsici* en la región de Valseguillo, Puebla, Mexico. *Fitopatología* 30: 47-55.
- Ezziyyani M. 2003. Biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) mediante una combinación de microorganismos antagonistas. Murcia: Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Ezziyyani M, Sid Ahmed A, Pérez Sánchez C, Egea-Gilabert C & Candela ME. 2001. Interacción de la planta de pimiento con *Streptomyces* sp. y su efecto sobre la necrosis del tallo causada por *Phytophthora capsici*. Badajoz: Actas de la XIV Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y Hispano-Luso.
- Ezziyyani M, Requena ME, Pérez-Sánchez C, Egea-Gilabert C & Candela ME. 2003. Mecanismos de biocontrol de la «tristeza» del pimiento (*Capsicum annum* L.) por microorganismos antagonistas. Palma de Mallorca: Actas de la XV Reunión de la sociedad Española & VIII Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal.
- Fayad KP, Simao-Beauvoir AM, Gauthier A, Leclerc ?, Mamady H, Beaulieu C, & Brzezinski R. 2001. Purification and properties of a  $\beta$ -1,6-glucanase from *Streptomyces* sp. Ef-14, an actinomycete antagonistic to *Phytophthora* spp. *Applied Microbiology Biotechnology* 57: 117-123.
- Gomes RC, Semedo LT, Sores RM, Alviano CS, Linhares LF & Coelho RR. 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letters Applied Microbiology* 30: 146-150.
- González-Chavira MM, Torres-Pacheco I & Guzmán Maldonado H. 2002. Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en colectas de Chile. Tampico: Proceedings of the 16th International Pepper.
- Guerrero-Aguilar Z, Sánchez-Delgadillo F, Guevara-Olivera L, Guevara-Gonzalez RG, Torres-Pacheco I & González-Chavira M M. 2001. Caracterización de aislados mexicanos de *Rhizoctonia solani* (Kuhn). Querétano: XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología.
- Hombly D. 1990. Biological control of soilborne plant pathogens. Oxford: Ed. CAB International.
- Hwang BK, Lee JY, Kim S & Moon SS. 2001. Isolation and in vivo and in vitro Antifungal activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces Humidus*. *Applied and Environmental Microbiology*.67: 3739-3745.

- Innes C. M. & Allan E. J. 2001. Induction, growth and antibiotic production of *Streptomyces viridifaciens* L-form bacteria. *Journal Applied Microbiology* 90: 301-308.
- Kim BS, Moon SS & Hwang BK. 1999. Isolation, anti-fungal activity, and structure elucidation of the glutarimide, streptimidone, produced by *Micromonospora coerulea*. *Journal Agricultural Food Chemistry* 47: 3372-3380.
- Kim BS, Moon SS & Hwang BK. 2000. Diversity of actinomycetes antagonistic to plant pathogenic fungi in cave and sea-mud soils of Korea. *Journal of Microbiology* 36: 86-92.
- Liu L, Klopfer JW & Tuzun S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant-promoting rhizobacteria: Duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85: 1064-1068.
- López-Vázquez MA, Martín González-Chavira M, Torres-Pacheco I, Delgadillo-Sánchez F, & Guevara-González RG. 2002. Patógenos involucrados en la pudrición de raíz del chile. Monterrey: XXIX Congreso Internacional de Fitopatología.
- Merriman PR, Price RD, Kollmorgen JF, Piggott T & Ridgeway EH. 1974. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on growth of cereals and carrots. *Australian Journal Biological Science* 25: 219-226.
- Omura S, Enomoto Y, Shinose M, Takahashi Y, Iwai Y & Shiomi K. 1999. Isolation and structure of viridomycin antibiotic new produced by *Streptomyces*. K96-0188. *Journal Antibiotic* 52: 61-64.
- Ongena M, Daayf F, Jaques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz T C, Comelis P, Koedam N & Belanger RR. 1999. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent *Pseudomonas*: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiotics. *Plant Pathology* 48: 66-76.
- Remsing L, González AM, Nur-e-Alam M, Fernández-Lozano MJ, Braña AF, Rix U, Oliveira MA, Méndez C, Salas JA & Rohr J. 2003. Mithramycin SK, a novel antitumor drug with improved therapeutic index generated by combinatorial biosynthesis in the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus*. *Journal American Chemistry Society* 125: 5745-5753.
- Rico-Guerrero L, Guerrero-Aguilar B Z, López-Vázquez A, Muñoz-Sánchez C I, Guevara-Olvera L, Guevara-González R G, Torres-Pacheco I & González-Chavira M M. 2001. Búsqueda de resistencia natural en plantas de Chile (*Capsicum* spp.) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz. Querétaro: XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología.
- Rodríguez L, Aguirrezabalaga I, Allende N, Braña AF, Méndez C, Salas J.A. 2002. Engineering deoxy-sugar biosynthetic pathways from antibiotic-producing microorganisms: A tool to produce novel glycosylated bioactive compounds. *Chemistry and Biology* 9: 721-729.
- Shomura T. 1993. Screening for new products of new species of *Dactylosporangium* and other actinomycetes. *Actinomycetology* 7: 88-98.
- Sid Ahmed A, Ezziyyani M, Egea-Gilabert C & Candela ME. 2003. Selecting bacterial strains for use in the biocontrol of diseases caused by *Phytophthora capsici* and *Alternaria alternata* in sweet pepper plants. *Biology Plantarum* 48: 47-52.
- Xu L H, Li Q R, & Jiang C L. 1996. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Applied Environmental Microbiology* 62: 244-248.