

Mejora de la capacidad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de un combinado de antagonistas compatibles frente a *Phytophthora capsici* Leonian

Mohammed Ezziyyani¹, Ahlem Hamdache², Ana Requena³, Catalina Egea-Gilbert³, Maria Emilia Candela⁴, Laura González-Ramiro⁴ & Maria Emilia Requena⁴

1 Université Hassan Premier Settat, Faculté Polydisciplinaire de Khouribga (FPK), Département de Biologie, El Hay El Jadid, El Byout. BP.: 145. Office Chérifien des Phosphates (OCP). Khouribga principale, 25000. Maroc. E-mail: m.ezziyyani@yahoo.fr

2 Université Abdelmalek Esaâdi, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, M'hannech II, BP 2121, 93002, Tétouan, Maroc.

3 Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48; 30203. Cartagena. España.

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

Resumen

Correspondencia

M.E. Candela

E-mail: mcandela@um.es

TEL: (+34) 868 884943

FAX: (034) 868 883963

Recibido: 21 febrero 2011

Aceptado: 3 junio 2011

Publicado on-line: 29 junio 2011

Se estudió la capacidad antagónica de la combinación de dos microorganismos compatibles entre sí, la bacteria *Burkholderia cepacia*, y el hongo *Trichoderma harzianum* sobre el patógeno *Phytophthora capsici*, agente causal de la podredumbre de pimiento. Se han realizado confrontaciones duales *in vitro* de los dos antagonistas frente al patógeno y entre ellos, en varios medios de cultivo, temperaturas y pHs. Los antagonistas interfieren en la supervivencia y el desarrollo del patógeno *P. capsici*. *B. cepacia* produce antibiosis y *T. harzianum* ejerce competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y lisis enzimática. El medio Avena-vermiculita produce un óptimo de biomasa. La dosis óptima de los antagonistas fueron 3.5×10^8 esporas/ml de *T. harzianum* y la 10^9 FCU/ml de *B. cepacia*, en un rango de pH 3.5-5.6 y temperaturas entre 20-30 °C. *In vivo*, el tratamiento con la combinación *B. cepacia*+*T. harzianum*+suelo de plantación, ha sido capaz de reducir hasta un 84% la incidencia de la "tristeza" causada por el patógeno *P. capsici* en plantas de pimiento.

Palabras clave: Compatibilidad, Biocontrol, *Burkholderia cepacia*, *Trichoderma harzianum*, Pimiento.

Abstract

Improving the antioomycete capacity in vivo and in vitro of a formula containing a combination of antagonists of Phytophthora capsici Leonian

The effectiveness was tested of a formulate containing mycelia of the fungus *Trichoderma harzianum* and colony of the bacterium *Burkholderia cepacia* to inhibit the growth of the pathogenic oomycete *Phytophthora capsici*, the causal agent of root rot in pepper. The antagonists were evaluated in dual confrontations *in vitro* in different culture media, temperatures and pH values. *B. cepacia* producing antibiosis and *T. harzianum* microparasitism and enzymatic lysis, while competing for space and nutrients. The formulate uses a base of vermiculite and oats, and the optimal

doses were 3.5×10^8 spores/ml of *T. harzianum* and 10^9 CFU/ml of *B. cepacia* in a pH range of 3.5-5.6. Experiments were carried out at 23-30 °C. *In vivo*, the use of a formulate with the combination *B. cepacia*+*T. harzianum* reduced by up to 84% the incidence of root rot caused by the *P. capsici* in pepper plants, and can be considered an alternative to the use of chemical products such as methyl bromide which are harmful to the environment and human health.

Key words: Compatibility, Biological control, *Burkholderia cepacia*, *Trichoderma harzianum*, Pepper.

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* Migula y *Bacillus* Cohn (Elad & Baker 1985, Leeman et al 1995, Kimer et al 1998, Loper & Henkels 1997, Sid Ahmed et al 2003a, 2003b, Ezziyyani et al 2004).

El género *Trichoderma* Persoon posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora* De Bary, *Rhizoctonia* Kühn, *Pythium* Pringsheim, y *Fusarium* Link ex Grey entre otros. Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa.

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidos por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas et al. 1982). Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos. Competición directa por el es-

pacio o por los nutrientes (Belanger et al. 1995), producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Sid Ahmed et al. 2000) y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia et al. 1999, Ezziyyani et al. 2007).

De acuerdo con la bibliografía consultada y los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, para establecer un programa de control biológico en cuanto a su relación con la temperatura, la humedad, nutrientes, pH, patógeno y antagonista, primero es preciso determinar *in vitro* los requerimientos del sistema patógeno-antagonista y antagonista-antagonista para establecer los factores óptimos a fin de considerarlos, para futuros ensayos en invernaderos.

Por último la utilidad de estos resultados constituye la base primaria para el empleo de la combinación de antagonistas, que se han seleccionado con diferentes potencialidades biológicas. Ello nos facilitará el diseño de las estrategias futuras de un control biológico eficaz del hongo patógeno *P. capsici* del suelo y posiblemente su transferencia para ampliarlo al control de otros patógenos.

Material y métodos

Material vegetal

La variedad de pimiento (*Capsicum annum* L.) objeto de estudio fue California Wonder, muy sensible al ataque del hongo *Phytophthora capsici* Leonian. 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 (4x4 x14cm), conteniendo una mezcla de turba, arena y vermiculita (3:1:1/2) esterilizada. Las bandejas fueron instaladas, en un módulo del

invernadero de la Estación de Experimentación Agrícola de la Universidad de Murcia (EEAU-MU). Se mantuvieron en estas condiciones hasta que desarrollaron la quinta o sexta hoja verdadera, con lo que ya estaban dispuestos para el trasplante a macetas o al suelo y la posterior inoculación con *P. capsici* (Candela et al. 1995).

Material fúngico

Como patógeno se usó el oomiceto *P. capsici*, aislado 15, cepa extremadamente agresiva. El hongo se mantuvo en PDA (patata-dextrosa-agar) de Difco. Para los ensayos de biocontrol el hongo se cultivó también en el medio «vermiculita-PDB (caldo patata- dextrosa)» que se obtiene de la siguiente manera: Adición de 200 ml de medio PDB a un matraz Erlenmeyer de 1000 ml que contenía 150g de vermiculita, esterilizada previamente dos veces a 121 °C durante 30 min en dos días consecutivos. Esta mezcla se autoclavó, y en ella se agregaron cuatro discos de 5mm de diámetro que fueron cortados del margen de la colonia miceliana de *P. capsici*, crecida en medio PDA y transferidos asépticamente al matraz.

Éstos fueron incubados en estufa a 25 °C durante tres semanas, tiempo suficiente para la formación de abundante inóculo. Para conseguir gran cantidad de zoósporas se hizo crecer *P. capsici* en PDB en la oscuridad y con agitación en matraces de 250 ml a 25 °C durante 15 días. Posteriormente se separó y lavó el micelio, se introdujo de nuevo en agua destilada y se mantuvo en agitación durante 5 ó 6 días más en los que se formaron y liberaron las esporas. Como antagonista se utilizó el hongo *Trichoderma harzianum* Rifai, aislado 2413 de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) sita en Valencia (España), usado anteriormente por nosotros (Sid Ahmed et al. 2001, Ezziyyani et al. 2005) y conservado en medios PDA y Avy-3.

La cepa bacteriana del complejo *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes) Yabuuchi, 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). Dependiendo del tipo de ensayo a realizar la preparación de los inóculos y las suspensiones bacterianas en medios sólidos y líquidos para el tratamiento de las semillas y como componentes extracelulares metabolitos an-

tifúngicos del filtrado de los cultivos de *B. cepacia*, se obtienen mediante tres procedimientos según (Ezziyyani et al. 2004).

Confrontación *in vitro* de cada antagonista frente al patógeno *P. capsici*

Confrontación in vitro de cada antagonista frente al patógeno P. capsici

Las acciones del antagonista se comprobaron, haciéndolo crecer en medios: PDA, Czapek-Agar, (A-A) Agua-Agar al 2% y en medio PDA enriquecido con laminarina y glucosa (3:1, v/v). Los inóculos se obtuvieron de la colonia miceliana de *P. capsici*, tomando discos de 5 mm de diámetro para las confrontaciones, los discos de *P. capsici* se siembran en placas Petri en los medios de cultivo anteriores, y en puntos equidistantes respecto al antagonista, mediante toques superficiales del medio de cultivo con una asa. Las placas se incuban en estufa a varias temperaturas: 20°, 25°, 27° y 30 °C. La interacción se observó cada tres días.

Confrontación in vitro de los antagonistas entre ellos: B. cepacia frente T. harzianum

En los medios PDA, AA (agua-agar al 2%) y Czapek Agar, se siembra, en un extremo de la placa Petri, un disco de 5 mm de diámetro de la colonia miceliana crecidas en PDA de *T. harzianum*. Enfrente se inocula, mediante un toque superficial, un alícuoto de la bacteria a ensayar. La comprobación de la acción simbiótica de *B. cepacia*, se obtendrá al cabo de dos días de cultivo en estufa a 20°, 25°, 27°, y 30 °C al evaluar la compatibilidad del crecimiento del micelio fúngico *T. harzianum*, obtenido por acción de la bacteria.

Observaciones microscópicas

Las muestras analizadas mediante microscopía electrónica de barrido proceden de la zona de interacción de las confrontaciones entre patógeno y *B. cepacia* en el medio PDA. El procesamiento de las muestras se hizo según el siguiente método: Se prepararon cortes de agar de 2x2mm de la zona de interacción entre el antagonista y *P. capsici*. Las muestras se sumergieron en una solución acuosa de agar al 1% y se prefijaron 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, seguida de tres lavados con el mismo tampón durante 30 minutos en oscuridad. Se fijaron por in-

mersión 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% y se secaron mediante el método del punto crítico (etanol/CO₂ líquido). Los cortes se montaron sobre un pedestal con pintura conductiva de grafito y se cubrieron con oro por el método de pulverización catódica o evaporación en *sputtering*. El examen se hizo con un microscopio electrónico de barrido Jeol T- 6.100.

Las muestras analizadas mediante microscopía óptica proceden de la zona de interacción de las confrontaciones entre *P. capsici* y *T. harzianum* en el medio PDA sobre una porta de vidrio.

Preparación del inóculo de los antagonistas

Inóculo de *T. harzianum*

- En frascos Erlenmeyer de 1000 ml que contenían una mezcla de 8 g de avena molida, 150 g de vermiculita fina y 250 ml de agua destilada (medio Avy-3) y 5g de suelo de plantación.
- En frascos conteniendo 300 g de vermiculita y 200 ml de medio PDB.
- En frascos conteniendo 300 g de arena y 150 ml de medio Czapek líquido (Difco). Los frascos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 30 minutos dos veces en dos días consecutivos. Cuatro discos de 5 mm de diámetro cortados del margen de la colonia miceliana crecida en medio PDA se transfirieron asépticamente a los frascos conteniendo la mezcla preparada. Los frascos con avena, PDB y Czapek fueron incubados en una estufa a 25 °C durante, siete, quince días y más de un mes respectivamente.

Inóculo de *B. cepacia*

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 100ml de agua destilada estéril y se transfirió a un Erlenmeyer de 1.000 ml conteniendo 5 g de suelo, 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.

Tratamiento *in vivo* del patógeno por cada antagonista y con el combinado de *T. harzianum*-*B. cepacia* crecidos en vermiculita

Se realizaron ensayos en suelos del campo de la estación de Experimentación Agrícola de la Universidad de Murcia (EEA-UMU) para evaluar el potencial de cada antagonista y el combinado en el control del patógeno *P. capsici*.

En todos los ensayos 15 g del patógeno *P. capsici* crecido en vermiculita-PDB se agregó directamente a las macetas con el fin de asegurarnos una buena infección. La población inicial determinada (NMP) oscila entre 1,2x10⁶ pp/g y 8,1x10⁷ pp/g.

Las plantas se cultivaron como hemos indicado

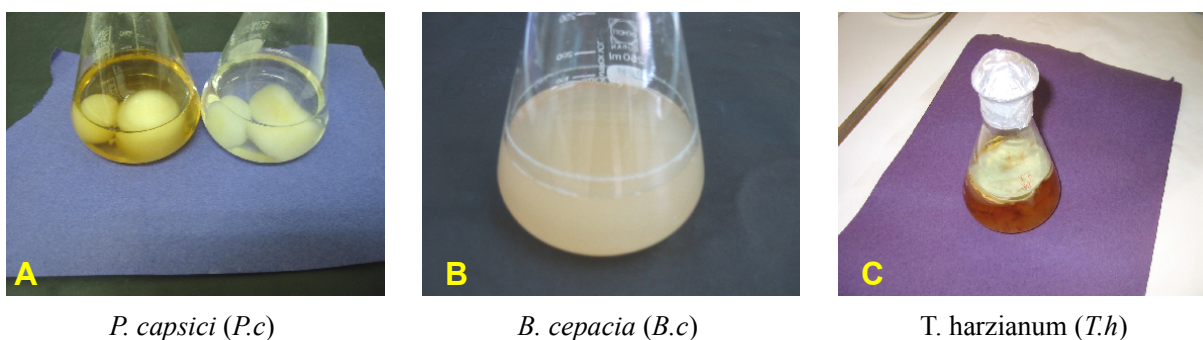


Figura 1. Cultivos del patógeno y los antagonistas . **A.** Hongo patógeno: *Phytophthora capsici* en el medio PDB (Control) . **B.** Hongo antagonista: *Trichoderma harzianum* en el medio PDB (Control) . **C.** Bacteria antagonista: *Burkholderia cepacia* en el medio NB (Control) .
 Figure 1. Cultures of the pathogen and antagonists. **A.** Pathogenic fungus: *Phytophthora capsici* in PDB medium (Control) . **B.** Antagonist fungus: *Trichoderma harzianum* in PDB medium (Control) . **C.** Antagonist bacteria: *Burkholderia cepacia* in NB medium (Control) .

anteriormente. El inóculo de los antagonistas utilizado fue el preparado en vermiculita, avena y agua (Avy3) más suelo de plantación, con las concentraciones siguientes: 5, 10, 15 y 20 g/maceta. De la mezcla inoculada se recogieron muestras de 100 g para hacer un recuento de la población inicial del antagonista, mediante diluciones decimales usando un detergente no iónico

Se prepararon hoyos distanciados 70cm por 40cm, en los que fue mezclada vermiculita inoculada previamente con cada antagonista e el combinado de los dos antagonistas 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 nivel de la rizosfera, formando un círculo alrededor de la planta, se infectaron las plantas con *P. capsici* y se cubrió con el suelo. El riego se hizo por goteo usando emisores autocompensativos de 4 l/ 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 plantas control como en las tratadas. La temperatura osciló entre 25° y 30 °C. Cien plantas fueron utilizadas por cada tratamiento y los ensayos se repitieron tres veces.

Resultados y discusión

En las confrontaciones *in vitro* de *B. cepacia* (Fig.1B) frente al patógeno *P. capsici* (Fig.1A), la inhibición varía según el medio de cultivo, fue efectiva en PDA (Fig. 2A) 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. 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 *Burkholderia cepacia* (de-

nominada en este trabajo como *Pseudomonas cepacia*) y detectaron antibióticos como pirrolnitrina y pioluteorina, con un amplio espectro antifúngico. La incidencia de la temperatura y el pH de incubación en la actividad antagonica del 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 *B. cepacia* 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 donde se observa deformación morfológica, desorganización (Fig. 3C) y formación de hipertrofias esféricas sobre las hifas de *P. capsici* La desintegración de las paredes miceliales (Fig. 3D), 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.

T. harzianum demostró un claro efecto antagónico contra *P. capsici* en los cultivos duales realizados previamente *in vitro* en Agar (Fig. 2B), sobre todo en medio PDA enriquecido con laminarina-glucosa (3:1v/v), aumentando su actividad antifúngica mediante la secreción del enzima hidrolítico (β -1,3-glucanasa) (Ezziyyani 2004) y posiblemente otros, sobrecreciendo y reduciendo totalmente la colonia del patógeno. La intensidad de inhibición de *P. capsici*, por *T. harzianum* *in vitro* varió según el medio de cultivo, la temperatura y el pH. La inhibición fue intensa en PDA, mientras que en el medio A-A, las interacciones fueron menos intensas o débiles. La zona de inhibición producida por *T. harzianum*, frente al patógeno, aumenta a medida que transcurre el tiempo, aumento que va acompañado de la destrucción del micelio fúngico desarrollado hasta ese momento. Lo que se observa en primer lugar es una zona de inhibición progresiva, en parte por la mayor velocidad de crecimiento de *T. harzianum*. Después aparece un marcado efecto hiperparasítico, que se manifiesta por la inhibición del crecimiento micelial no sólo por compartir el mismo sustrato sino también porque *T. harzianum* produce antibióticos y enzi-

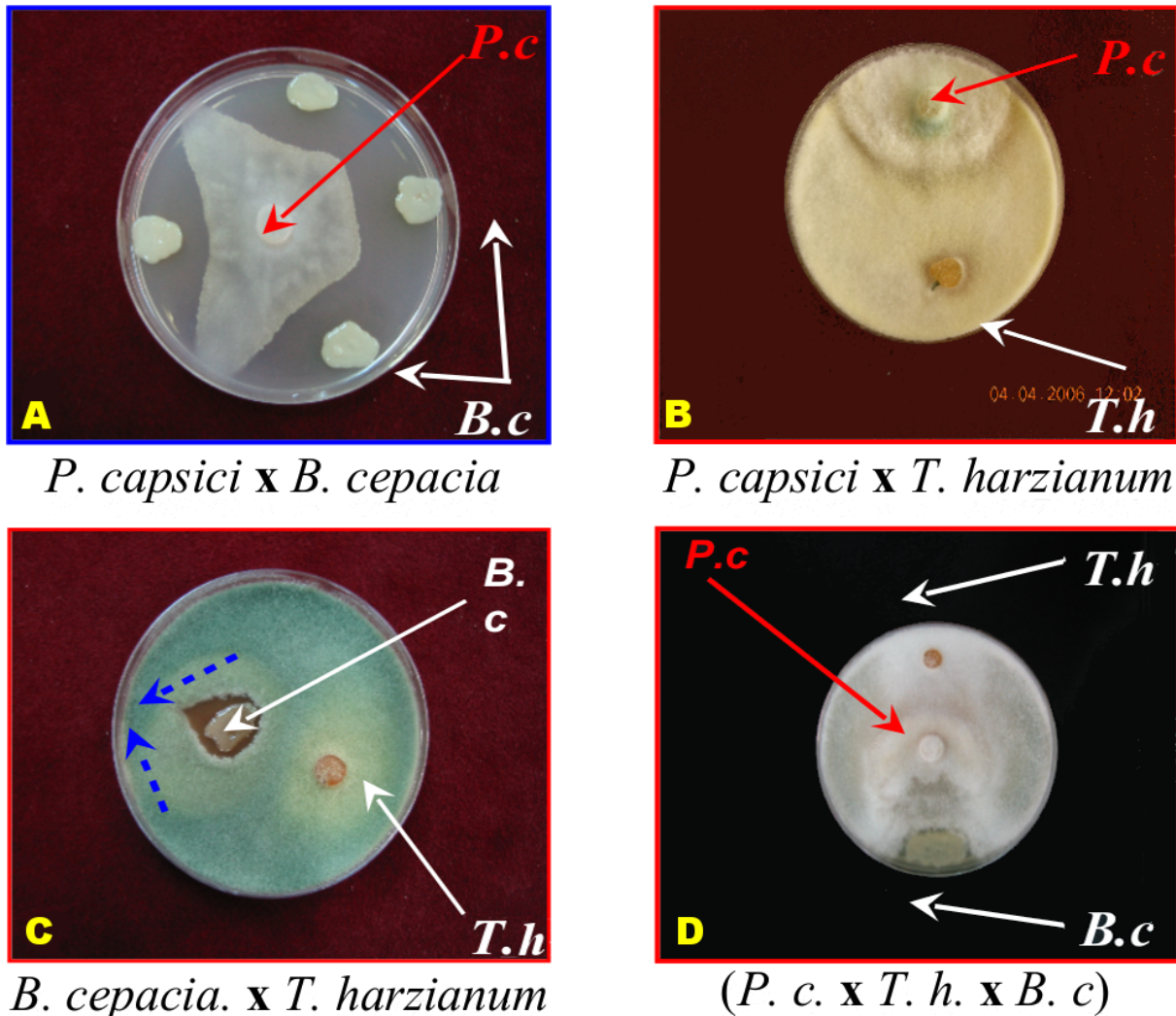


Figura 2. Confrontación de *P. capsici* frente a los antagonistas y los antagonistas entre sí. **A.** Inhibición del crecimiento vegetativo de *P. capsici* en presencia de *B. cepacia* en el medio PDA. Antibiosis y destrucción de la colonia de *P. capsici*. **B.** Inhibición del crecimiento vegetativo de *P. capsici* en presencia de *T. harzianum* en el medio PDA. *T. harzianum* forma una red micoparasítica provocando lisis y desintegración de las hifas del patógeno. **C.** Confrontación de los antagonistas entre ellos: Compatibilidad total entre *B. cepacia* y *T. harzianum*. **D.** Confrontación de los antagonistas y el patógeno: *T. harzianum* realiza hiperparasitismo, invadiendo totalmente la superficie de la colonia de *P. capsici* esporulando sobre la misma (centro). Detención del crecimiento vegetativo del patógeno, los antagonistas juntos ejerciendo una multiplicidad de modos de acción (micoparasitismo, antibiosis y lisis enzimática), y se aprecia una compatibilidad total entre *B. cepacia* y *T. harzianum*.

Figure 2. Confrontation between *P. capsici* and antagonists and between the antagonists themselves. **A.** Inhibition of vegetative growth of *P. capsici* in the presence of *B. cepacia* in PDA medium. Antibiosis and destruction of the colony of *P. Capsici*. **B.** Inhibition of vegetative growth of *P. capsici* in the presence of *T. harzianum* in PDA medium. *T. harzianum* forms a micoparasitic network that provokes the lysis and disintegration of the pathogen's hyphae. **C.** Confrontation between the antagonists: total compatibility between *B. cepacia* and *T. harzianum*. **D.** Confrontation between antagonists and pathogen: *T. harzianum* provokes micoparasitism, totally invading the surface of the *P. capsici* colony, sporulating over the same (centre). Detention of vegetative growth of pathogen, antagonists showing multiple modes of action (micoparasitism, antibiosis and enzymatic lysis). Total compatibility between *B. cepacia* and *T. harzianum*.

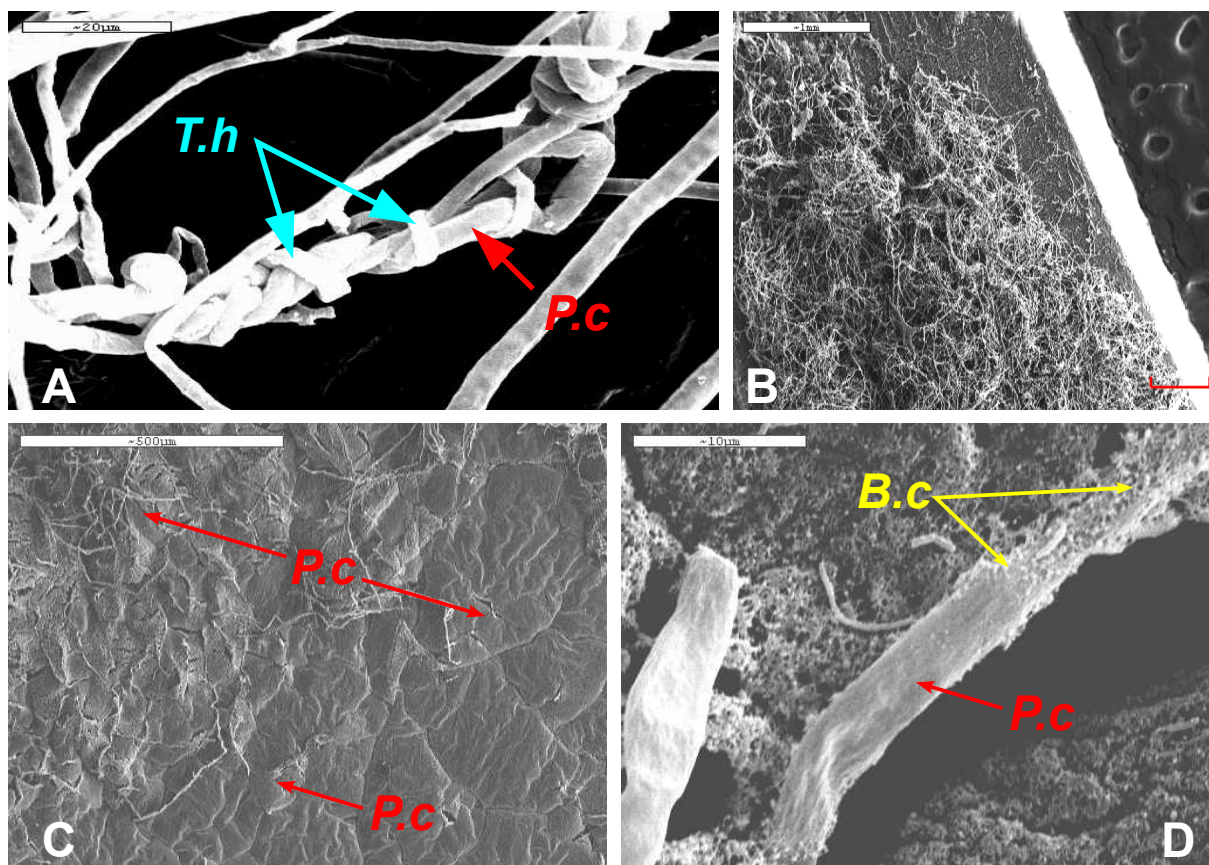


Figura 3. **A.** Interacciones entre *T. harzianum* frente a *P. capsici*. Enrollamiento masivo de las hifas de *T. harzianum*, alrededor de las de *P. capsici*. **B.** Interacciones entre *T. harzianum* frente a *P. capsici*. Aspecto del micoparasitismo ejercido por *T. harzianum* sobre *P. capsici*, esporulando sobre el mismo. **C.** Zona de inhibición de la confrontación de *B. cepacia* y *P. capsici*. Antibiosis: desorganización y desintegración de las hifas de *P. capsici*. **D.** Hipertrofia de las hifas de *P. capsici*. Adhesión, proliferación y formación de hipertrofias esféricas sobre las hifas de *P. capsici*. Se aprecia una desintegración seguida de la destrucción total del micelio. MEB.

Figure 3. **A.** Interactions between *T. harzianum* and *P. capsici*. Massive rolling of hyphae of *T. harzianum*, around those of *P. capsici*. **B.** Interactions between *T. harzianum* and *P. capsici*. Aspect of microparasitism exercised by *T. harzianum* on *P. capsici*, over which it sporulates. **C.** Inhibition area of confrontation between *B. cepacia* and *P. capsici*. Antibiosis: disorganization and disintegration of hyphae of *P. capsici*. **D.** Hypertrophy of hyphae of *P. capsici*. Adhesion, proliferation and formation of spherical hypertrophies over hyphae of *P. capsici*. SEM.

mas: (β -1,3- glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa) degradadores de la pared celular que juegan un importante papel en el micoparasitismo. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por otros autores (Wong 1992, Lorito et al. 1993, Herrera et al. 1999, Sid Ahmed et al. 2000). Finalmente *T. harzianum* no sólo inhibe la expansión de *P. capsici* creciendo en su campo de acción, sino que a los siete días la colonia del patógeno *P. capsici* se quedó totalmente reducida en comparación con el control, continuó creciendo hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo patógeno e incluso esporulando sobre el mismo. Se puede analizar en preparaciones del microscopio de transmisión y electrónica de barrido, donde se observan las hifas de *T. harzianum* enrollando a las del patógeno (Fig. 3A) e impi-

diendo su crecimiento (Fig. 3B).

Nuestros resultados están de acuerdo con los publicados por otros autores (Elad et al. 1982, Bara et al. 2003) que usando laminarina como sustrato, en los medios de cultivos para cepas de *Trichoderma*, obtuvieron un aumento de la actividad β -1,3-glucanasa hasta del 67% y una mayor acción lítica sobre patógenos como *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu & Kimbr (= *Sclerotinia rolfsii*) y *Rhizoctonia solani* Kühn respectivamente. En ensayos de antagonismo realizado *in vitro*, Rey et al. (2002) realizaron transformaciones a partir de protoplastos con dos genes de glucanasas, bgn 16.2 y bgn 13.1. La cepa transformada con genes de hidrolasas, muestra una capacidad antifúngica sobre el hongo patógeno *R. solani* superior a la de la estirpe silvestre. Otros autores (Lahsen et al. 2001, Sousa et al. 2002), han clonado genes en cepas de *T. harzianum* con alta expresión antifúngica para

Phytophthora cinnamomi Rands y *Rosellinia necatrix* Berl. ex Prill.

En las confrontaciones de los antagonistas *B. cepacia* y *T. harzianum*, realizadas en PDA nos muestran que produjeron un porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) del micelio *T. harzianum* al 0%. El crecimiento de *T. harzianum* se mantuvo aumentando hasta el cuarto día y continuaba creciendo hasta rodear totalmente la colonia de *B. cepacia* (Fig. 2C), lo cual es manifestación macroscópica y microscópica de su compatibilidad total. Tampoco se observó inhibición cultivando la bacteria en placas en medio NA agua-agar al 2% y Czapek las interacciones fueron nulas. Las observaciones macroscópicas muestran que la colonia de *T. harzianum* frente a la bacteria crece de una manera regular y al final del sexto día el micelio rodea las bacterias mostrando una compatibilidad entre ellos. El examen de la microscopia óptica mostró que las hifas de *T. harzianum* crecen uniformemente y no presentan ni deformaciones ni desorganización (Fig. 2D). La temperatura no afectó la acción simbiótica entre los tres antagonistas pasando de la temperatura ambiente hasta 30 °C. En cambio el pH 4,5 afectó solamente a la velocidad del crecimiento vegetativo y la pigmentación del hongo *T. harzianum* del color verde al blanco. Por ello, la relación que se establece entre los dos antagonistas seleccionadas: *T. harzianum* y *B. cepacia*, puede ser definido como una simbiosis antagónica por lo que son compatibles para ser usado juntos frente al patógeno *P. capsici*.

Evaluación del efecto de distintos tratamientos *in vivo* sobre la tristeza causada por *P. capsici*

De los resultados obtenidos con los dos tipos de inoculación con el patógeno, con zoosporas o con vermiculita infectada, la mejor técnica de infección es la desarrollada por nosotros, con *P. capsici* crecido en vermiculita. Ello se debe a que la vermiculita con PDB es un medio en el que el patógeno se encuentra en forma micelial y plena actividad virulenta, mientras que las zoosporas de *P. capsici*, aunque se adicionen a la rizosfera de la planta en condiciones fisiológicas óptimas de crecimiento en el laboratorio, el inóculo pierde agresividad, tal vez por factores ambientales o debido al estrés sufrido al pasar las zoosporas de un sustrato reducido al suelo. El inóculo de los antago-

nistas utilizado para el tratamiento de las plantas fue el preparado en medio Avy3 más suelo de plantación, (Fig. 4), que resultó más económico, fácil de preparar y usar, así como por su viabilidad, abundancia y rápido crecimiento. Pero sobre todo, por su alto grado de inhibición contra el desarrollo de la podredumbre causada por *P. capsici*. El biopreparado Avy3 más suelo de plantación, ha sido el mejor al compararlo con vermiculita-PDB (Ezziyyani et al. 2009). Ya que la adición de las partículas del suelo de plantación tanto a la vermiculita como a los medios de cultivos líquidos ha conseguido la adaptación de los antagonistas al mismo y también para evitar el estrés de los microorganismos al pasarlos a los viveros, el preparado que los contenía fue diluida al 20% para que estos estén mas adaptados y que sean competitivos.

El mejor resultado (Tabla 1) se consiguió usando *B. cepacia* a 1×10^9 UFC/ml y *T. harzianum* a 3.5×10^8 esporas/ml. En las plantas (NT&I) con *P. capsici* la podredumbre de la raíz alcanzó 5,0 sobre la escala usada. El tratamiento de las plantas con *T. harzianum* y *B. cepacia* (T&I), redujo la enfermedad a 3.00 y 2.13, respectivamente, lo cual equivale a una reducción del 51,59%. La má-

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> : (T&NI)	0.00 a
<i>T. harzianum</i> : (T&NI)	0.00 a
<i>T. harzianum</i> + <i>B. cepacia</i> : (T&NI)	0.00 a
<i>T. harzianum</i> + <i>P. capsici</i> : (T&I)	3.00 b
<i>B. cepacia</i> + <i>P. capsici</i> : (T&I)	2.13 a
<i>T. harzianum</i> + <i>B. cepacia</i> + <i>P. capsici</i> : (T&I)	1.17 a

Tabla 1. Efecto del tratamiento *in vivo* con los antagonistas sobre la podredumbre de la planta de pimiento causada por *P. 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. (T=tratadas; NT=no tratadas; I=Inoculadas; NI=no inoculadas). Las medias seguidas por las mismas letras no son significativamente diferentes según el test LSD, $p=0.05$.

Table 1. Effect of *in vivo* treatment with the antagonists on rot in the pepper plants caused by *P. capsici*. Evaluation on scale from 0 (no symptom) to 5 (plant death). The rot values are the means per plant and treatment. (T=treated; NT=not treated; I=Inoculated; NI=not inoculated). Means followed by the same letter are not significantly different according to LSD test, $p=0.05$.

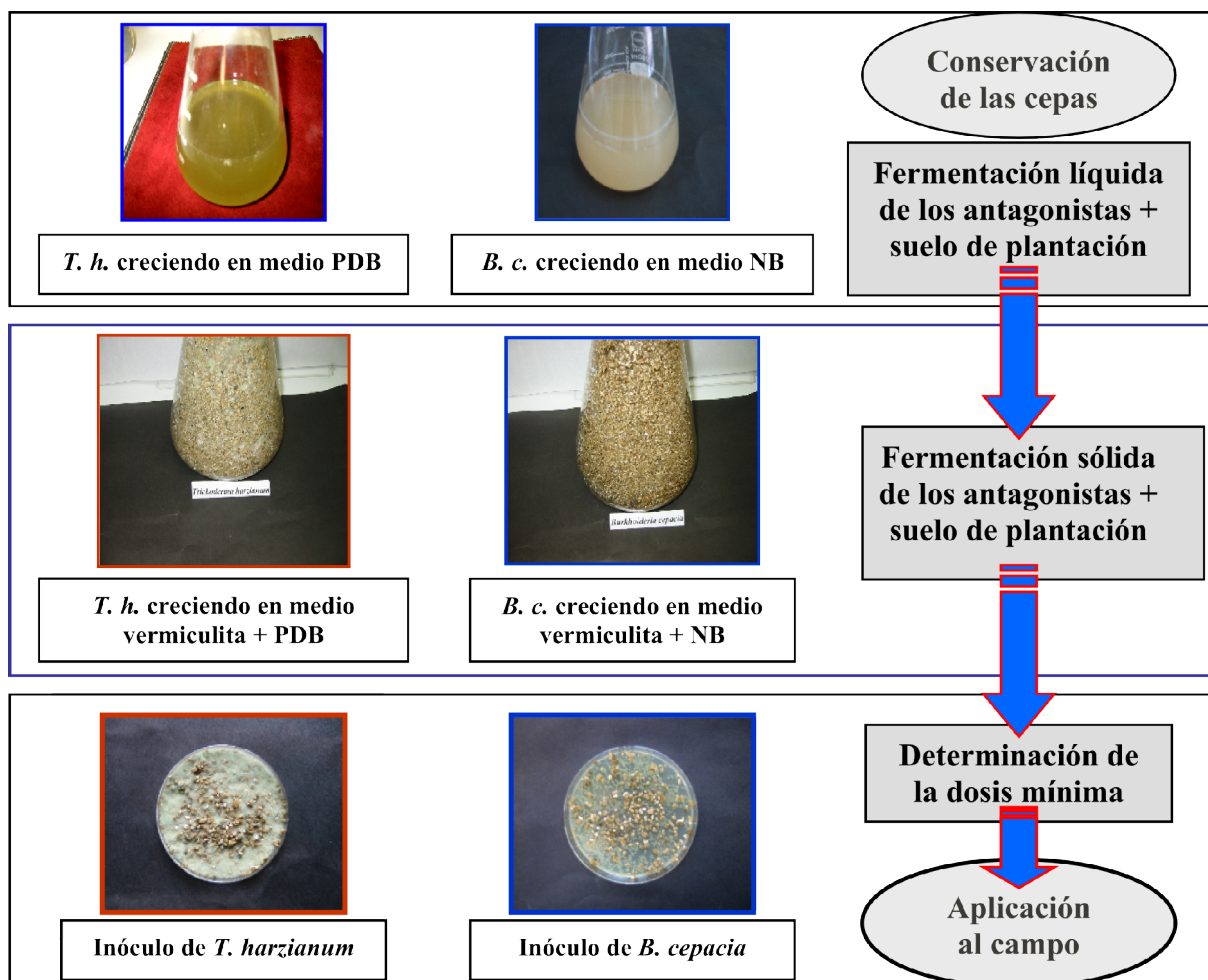


Figura 4. Esquema y protocolo de la preparación del biopreparado de los antagonistas propuesta, por M. Ezziyani, con él que se realiza el tratamiento de las plántulas de pimienta "in vivo".

Figure 4. Schema and protocol proposed by M. Ezziyani for preparing the bio-preparation of both antagonists used to treat pepper seedlings "in vivo".

xima reducción de la enfermedad, a 1,17, se logró cuando las raíces fueron tratadas con el combinado de los dos antagonistas (*T. harzianum*+*B. cepacia*+suelo de plantación), consiguiendo una reducción del 84%. El análisis de la varianza de clasificación de rangos múltiples (ANOVA) mostró diferencias significativas para la interacción de dos factores (tiempo de mortalidad y cepa antagonista). Lo más llamativo fue la tardanza de la aparición de los síntomas del marchitamiento en las plantas tratadas e inoculadas con el patógeno (T&I), ya que incluso algunas plantas llegaron a dar frutos.

El tratamiento de las plantas con Avy3 más suelo de plantación, dio un buen resultado en la reducción de la podredumbre, sin embargo los resultados de control del patógeno con el antagonista en plantas inoculadas con vermiculita-PDB y arena-Czapek líquido, en suelo no han sido tan sa-

tisfactorios. Hecho que está de acuerdo con Szejnberg et al. (1987), para quienes la incorporación de *T. harzianum* al campo no fue efectiva probablemente por un inadecuada aplicación del antagonista ya que según (Ezziyani et al. 2007) la mejor técnica de tratamiento y/o infección con un biopreparado es la desarrollada con base sólida.

Ello se debe a que la vermiculita con PDB o NB es un medio en el que el antagonista se encuentra en forma micelial o colonial y en plena actividad virulenta, mientras que las colonias de *B. cepacia* y colonias de *T. harzianum*, aunque se adicionen a la rizosfera de la planta en condiciones fisiológicas óptimas de crecimiento en el laboratorio, el inóculo pierde efectividad, tal vez por factores bióticos y/o abióticos o debido al estrés sufrido al pasar las suspensiones microbianas de un sustrato reducido al suelo, por lo que estamos de acuerdo con Szczech & Shoda (2006) en que

el modo de aplicación de los microorganismos antagonistas al suelo es uno de los condicionantes para la eficacia óptima del agente de biocontrol.

Y no estamos de acuerdo con Herrera López et al. (1999), los cuales argumentan que el establecimiento y la reducción de población de *T. harzianum* en suelo puede deberse a que el antagonista utiliza su energía en la producción de metabolitos secundarios más que en su propia reproducción. Bajo esas perspectivas se confirma lo observado por otros autores (Sid Ahmed et al. 1999) respecto a que la selección previa del antagonista mediante cultivos duales es útil, pero no garantiza el buen comportamiento de ésta en invernadero. El efecto antagonista se ha visto reducido en nuestro experimento desde, prácticamente un 100% *in vitro*, a entre 51%, 59% y 84% *in vivo*. Ante estos resultados pensamos que una buena estrategia para el futuro sería optimizar la formulación del biopreparado incorporando enmiendas orgánicas junto con actuaciones físicas como la solarización, que conformen una completa lucha integrada y logren inhibir el desarrollo del patógeno invasor. Actuaciones en este sentido están siendo probadas en una investigación en curso de este equipo investigador.

Referencias

- Bara F, Lima A, Ulhoa L & Cirano J. 2003. Purification and characterization of an $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$ produced by *Trichoderma asperellum*. FEMS Microbiology Letters 219: 81-85.
- Belanger R, Dufour N, Caron J & Benhamou N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. Biocontrol Science Technology 5: 41-54.
- Candela ME, Alcázar MD, Espín A, Egea-Gilabert C & Almela L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. Plant Pathology 44: 116-123.
- De la Fuente L, Balsa 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.
- Elad Y, Chet I & Henis Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology 28: 719-725.
- Elander RP, Mabe JA, Hamill RH & Gorman M. 1968. Metabolism of tryptophans by *Pseudomonas aureofaciens*. Production of pyrrolnitrin by selected *Pseudomonas* species. Applied Microbiology 16: 753-758.
- Ezziyyani M, Pérez-Sánchez C, Requena ME, Sid Ahmed A. & Candela ME, 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. Anales de Biología 26: 61-68.
- Ezziyyani M, Requena ME, Perez-Sanchez C & Candela ME, 2005. Efecto del sustrato y la temperatura en el control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anal Biol. 27: 119-126.
- Ezziyyani M, Requena ME, Egea Gilabert C & Candela ME, 2007. Biological Control of *Phytophthora* root rot of pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination Journal of Phytopathology 155: 342-349.
- Ezziyyani M, Requena ME, Egea Gilabert C, Lamarti A & Candela ME. 2009. Biological control of *Phytophthora capsici* root rot of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants using *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma harzianum*. Journal of Applied BioSciences. 13: 745-754.
- Herrera-López J, Pérez-Jiménez M, Llobel A, Monte-Vázquez E & Zea-Bonilla T. 1999. Estudios *in vivo* de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 261-265.
- 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: 939-943.
- 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.
- Lahsen HA, Soler A, Rey M, De la Cruz J, Monte E & Llobel A. 2001. An antifungal Exo- α -glucanase (AGN1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 67: 5833-5839
- 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.
- 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.
- Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Transmo A, Woo SL, Di Pietro A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitinase. Phytopathology 83: 302-307.

- Papavizas GC, Lewis JA & Abd-Elmoity TH. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 126-132.
- Papavizas GC & Lumsden RD. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology* 18: 389-413.
- Rey M, González L, Monte E & Llobell A, 2002. Genómica funcional de estirpes antagonistas del género *Trichoderma*. León: Actas del XXV Congreso de la SEBBM, España.
- 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 Gilabert C & Candela ME. 2003b. Selecting bacterial strains for use in the biocontrol of diseases caused by *Phytophthora capsici* and *Alternaria alternata* in sweet pepper plants. *Biología Plantarum* 47: 569-574.
- Sid Ahmed A, Pérez Sánchez C & Candela ME, 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology* 106: 817-824.
- Sid Ahmed A, Pérez-Sanchez C, Ezziyyani M & Candela ME. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* treatments on systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annum*) to *Phytophthora capsici* and its relation with capsidiol accumulation. *IOBC WPRS Bulletin* 24: 265-269
- Sid Ahmed A, Pérez-Sanchez C, Egea C & Candela ME. 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology* 48: 58-65.
- Sousa S, Rey M, Monte E & Llobell A. 2002. Clonación y análisis de los promotores de dos genes con alta expresión en *Trichoderma harzianum*. León: Actas del XXV Congreso de la SEBBM, España
- Szczeczek M & Shoda M. 2006. The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. *J Phytopathol* 154: 370-377.
- Szteinberg A, Freeman S, Chet I & Katan J. 1987. Control of *Rosellinia necatrix* in soil and apple orchard by solarisation and *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 71: 365-369.
- Wong, K.K.Y. & Saddler, J.N., 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and applications. *Critical Review in Biotechnology* 12: 413-435.
- Yedidia I, Benhamou N & Chet I. 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.