

EFFECTO DE CUATRO RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO SOBRE LA PUDRICIÓN BASAL CAUSADA POR *Phytophthora capsici* EN PLANTAS DE CHILE DULCE (*Capsicum annuum*)

Carlos Ramírez*, Zorith Soto**, Leida Castro***, Luis Felipe Arauz****, Lorena Uribe-Lorio*****, Lidieth Uribe¹****

Palabras clave: *Phytophthora capsici*; Rizobacterias; zoosporas; control biológico; *Capsicum annuum*.

Keywords: *Phytophthora capsici*; Rhizobacteria; zoospores; biological control; *Capsicum annuum*.

Recibido: 03/03/15

Aceptado: 17/06/15

RESUMEN

La pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* es la enfermedad más importante del chile (*Capsicum annuum*) ya que en el mundo, y en Costa Rica causa grandes pérdidas económicas; son necesarias alternativas al control químico para evitar daños a la salud humana y al ambiente. Se evaluó el antagonismo de rizobacterias promotoras de crecimiento (RPC) sobre *P. capsici* y su capacidad de reducción del marchitamiento en plantas de chile. Las RPC, previamente aisladas de caña y arroz, fueron identificadas con el marcador ARNr 16S como *Pseudomonas fluorescens* PC4, *Stenotrophomonas rhizophila* PC9, *Pseudomonas fragi* PC11 y *Azospirillum lipoferum* PCJ2. Se evaluó la inhibición del crecimiento de *P. capsici* in vitro en presencia de las RPC. A nivel de invernadero se determinó el efecto de las 4 bacterias sobre plantas de chile inoculadas con *P. capsici* (100 zoosporas.planta⁻¹). Las cepas *P. fluorescens* PC4, *S. rhizophila* PC9 y *A. lipoferum* PCJ2, inhibieron in vitro el crecimiento del oomycete en un 54%, 30% y 50%, respectivamente, mientras que en

ABSTRACT

Effect of four growth-promoting rhizobacteria on crown blight caused by *Phytophthora capsici* in sweet pepper (*Capsicum annuum*). Crown blight, caused by *Phytophthora capsici*, is the most important disease of pepper (*Capsicum annuum*) in the world and causes great economic losses in Costa Rica. Alternatives to chemical control against this disease are crucial to prevent damage to human health and the environment. The antagonism of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) on *P. capsici*, and its ability to reduce wilt in pepper plants were evaluated. PGPR strains previously isolated from sugarcane and rice were identified, using 16S RNA gene sequence, as *Pseudomonas fluorescens* PC4, *Stenotrophomonas rhizophila* PC9, *Pseudomonas fragi* PC11 and *Azospirillum lipoferum* PCJ2. The inhibition of *P. capsici* growth was evaluated in vitro, in the presence of the PGPR. The effect of the four bacterial strains on pepper plants inoculated with *P. capsici* (100 zoospores.plant⁻¹) was evaluated in the greenhouse. *P. fluorescens* PC4, *S. rhizophila*

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: lidieth.uribe@ucr.ac.cr

* Área de Salud de Coronado, Costa Rica.

** Centro de Atención Integral en Salud de Cañas, Costa Rica.

*** Laboratorio de Microbiología Agrícola, Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica.

**** Centro de Investigación en Protección de Cultivos. Universidad de Costa Rica.

***** Laboratorio de Microbiología Ambiental, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Universidad de Costa Rica.

invernadero la inoculación con *S. rhizophila* aumentó en un 14% el peso fresco foliar de las plantas de Chile. Además, *A. lipoferum* y *S. rhizophila* redujeron la severidad de la enfermedad en la parte aérea y radical; las plantas inoculadas con *A. lipoferum* no mostraron síntomas de pudrición basal ya que indicaron que PC9 y PCJ2 son bacterias promisorias para el control de la enfermedad.

PC9 and *A. lipoferum* PCJ2, inhibited in vitro growth of the oomycete by 54%, 30% and 50 % respectively, while *S. rhizophila* PC9 increased by 14% shoot fresh weight of pepper plants at the greenhouse. Furthermore, PCJ2 and PC9 strains reduced the shoot and root severity of the disease, and PCJ2-inoculated plants showed no symptoms at all, indicating that PC9 and PCJ2 are promising rizobacteria for the control of crown blight in pepper.

INTRODUCCIÓN

El oomycete *Phytophthora capsici* Leonian vive como saprófito en el suelo y se considera un patógeno importante de muchos cultivos. Tiene una distribución mundial y es el agente causal de la enfermedad conocida como pudrición basal del tallo o maya en el Chile dulce (*Capsicum annuum* L.) (Solís 1989, Corrales et ál. 1990, Hausbeck y Lamour 2004, Silvar et ál. 2005, Kim et ál. 2008, Perveen et ál. 2010, Zhang et ál. 2010).

La enfermedad se caracteriza por un marchitamiento repentino de la planta como consecuencia de la pudrición de las raíces y la base del tallo. El patógeno puede infectar la raíz, corona y partes foliares de muchos hospederos ya sea por efecto del salpique o la irrigación. Los síntomas se desarrollan rápidamente durante períodos de alta humedad del suelo, asociados con lluvias prolongadas o irrigación frecuente (Kim et ál. 1997, Hausbeck y Lamour 2004, Kim et ál. 2008, Yang et ál. 2012).

Los métodos de control no han sido del todo efectivos debido a la persistencia en el suelo de las oosporas de *P. capsici* que son resistentes a la desecación, temperaturas frías y otras condiciones extremas, por lo que pueden sobrevivir por muchos años en la ausencia del hospedero (Hausbeck y Lamour 2004, Kim et ál. 2009, Yang et ál.

2012). Por otro lado, las opciones de control de la enfermedad por medio de agroquímicos pueden causar resistencia, fitotoxicidad y contaminación del ambiente por lo que es necesario desarrollar estrategias ambientalmente sostenibles para el control de la marchitez (Sang et ál. 2008, Ko et ál. 2009, Zhang et ál. 2010, Yang et ál. 2012).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento (RPC) se han utilizado para promover el crecimiento y sanidad de cultivos como el Chile, maíz, tomate, leguminosas y gramíneas. Las RPC habitan la rizósfera de las plantas y la integran un grupo variado de géneros como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Lysobacter* entre otros (Podile y Kishore 2006, Ko et ál. 2009, Kaymak 2011), estas bacterias pueden ser utilizadas como biofertilizantes y biocontroladores (Khalid et ál. 2004, Reyes et ál. 2008).

Las RPC contribuyen a la protección de la planta contra patógenos radicales y foliares por medio de antibiosis, competencia por espacio y nutrientes e inducción de resistencia sistémica. Algunas enzimas que degradan la pared celular están involucradas en la actividad antagonista contra fitopatógenos, así mismo la producción de sustancias como fitohormonas, antibióticos, compuestos orgánicos volátiles, fitoalexinas y sideróforos; otros mecanismos bacterianos señalados

que contribuyen al biocontrol son la interferencia de señales de quorum sensing (QS), la inhibición en la formación de biopelículas y producción de toxinas por el patógeno (Howell y Stipanovic 1980, Shanahan et ál. 1992, Podile y Kishore 2006, Kim 2009, Ko et ál. 2009, Kaymak 2011, Bhattacharyya y Jha 2012, Singh y Singh 2013).

A su vez, estas bacterias pueden favorecer el crecimiento de la planta por medio de la fijación de nitrógeno, producción de sustancias reguladoras del crecimiento, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos e incremento en el desarrollo de la raíz (Amorin y Melo 2002, Hernández et ál. 2004, Khalid et ál. 2004; Kloepper et ál. 2004, Podile y Kishore 2006, Reyes et ál. 2008, Bhattacharyya y Jha 2012, Singh y Singh 2013).

Una gran diversidad de microorganismos rizosféricos se han descrito, caracterizado y en muchos casos evaluado por su actividad para el control biológico contra patógenos del suelo (Sang et ál. 2008, Kim et ál. 2009, Ko et ál. 2009). Para el control de *P. capsici* en Chile, se han evaluado con éxito cepas de *Pseudomonas* sp. (Lee et ál. 2003, Rajkumar et ál. 2005, Sharma et ál. 2007, Sang y Kim 2012), *Chryseobacterium* sp. (Sang y Kim 2012, Yang et ál. 2012), *Bacillus cereus* (Yang et ál. 2012), *Lysobacter antibioticus* (Ko et ál. 2009), *Paenibacillus polymyxa* (Kim et ál. 2009) y *Burkholderia cepacia* (Ezziyiani et ál. 2004).

Sang y Kim (2012) encontraron que la inoculación con RPC afectó la actividad y estructura microbiana de la rizosfera de Chile, efecto que pudo contribuir a la supresión de la marchitez observada con la inoculación de estas bacterias. Por su parte Yang et ál. (2012) reportaron que a partir de 1487 aislamientos bacterianos obtenidos de la rizosfera, filosfera, endorriza y endosfera de plantas de Chile, 232 (15,6%) desplegaron actividad antagónica contra *P. capsici* in vitro, de los cuáles, 92 aislamientos expresaron actividad proteolítica, 100 actividad celulolítica, 84 produjeron sideróforos y 4 mostraron actividad quitinolítica. De 16 bacterias elegidas por los autores, fueron eficaces 3 aislamientos (*B. cereus* B1301, *B.*

cereus PX35 y *Chryseobacterium* sp. R98) que exhibieron la mayor capacidad para reducir la severidad de la enfermedad en un 83,5%, 83,5% y 92,3% respectivamente. Estos trabajos indican que existe potencial para la utilización de RPC en el control de esta enfermedad.

En Costa Rica no se ha estudiado el uso de estas bacterias en el control biológico de *P. capsici*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el antagonismo de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento sobre *P. capsici* y su capacidad de reducción del marchitamiento en plantas de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y aislamiento de *P. capsici*

Se utilizaron 4 cepas bacterianas de la colección del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas previamente aisladas a partir de la rizósfera de caña y arroz. Las bacterias estuvieron almacenadas a -80°C en viales que contenían caldo nutritivo con glicerol al 20%.

Cada cepa bacteriana fue inoculada en placas de Petri con medio agar nutritivo y cultivada a 25°C durante 24 horas. Posteriormente colonias de cada bacteria se resuspendieron en un tubo con solución salina estéril al 0,85% hasta alcanzar una turbiedad igual al estándar 0,5 McFarland. Se determinó mediante recuento en plato la cantidad de bacterias presentes en la suspensión de cada una de las cepas utilizadas en los diferentes ensayos.

Se utilizó el oomycete *Phytophthora capsici* de la colección del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas previamente aislado a partir de plantas de Chile con síntomas de marchitez (Uribe et ál. 2014), la cepa se conservó en refrigeración y se cultivó en agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés).

Para los experimentos en invernadero se preparó una suspensión de 1×10^8 zoosporas.ml⁻¹ en la forma descrita en Uribe et ál. (2014).

Identificación de las cepas promotoras de crecimiento

Para la identificación de las cepas se extrajo ADN a partir de cultivos en agar nutritivo de 24 horas de crecimiento de las cepas PC4, PC9, PC11 y PC2J, a través del procedimiento utilizado por Fontecha (2003). Un fragmento del gen ARNr 16S se amplificó mediante PCR (amplificación en cadena de la polimerasa) por medio de los imprimadores P1F 5' GAA GAG TTT GAT CAT GGC TC 3' y P2R 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3' (Brunel et ál. 1996). La mezcla de 50 µL de reacción de amplificación estuvo compuesta por tampón Taq ADN polimerasa con KCl y sin MgCl₂ a concentración final de 1X, 1,25 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada imprimador, 200 µM de cada desoxirribonucleosido trifosfato (Thermo Scientific™), 1 U de Taq polimerasa (Thermo Scientific™). El programa utilizado incluyó una desnaturalización a 94°C 4 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a dicha temperatura por 30 s, hibridización a 55°C por 30 s y extensión a 72°C por 90 s, y por último, una extensión a 72°C por 10 min. Los productos de la amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se purificaron y se secuenciaron en un ABI PRISM 3130 por medio de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied BioSystems, Foster City, California, Estados Unidos).

Las secuencias parciales del gen ARNr 16S fueron editadas con el empleo de Bioedit v 7.0.5.2 (Hall 1999) y comparadas individualmente con el software BLAST 2.2 (Altschul et ál. 1997), para encontrar similitudes con secuencias depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal X (Thompson et ál. 1997) y el análisis de la matriz de datos de secuencias de ADN fue realizado mediante el método del vecino más cercano asistido por el programa MEGA 6 (Tamura et ál. 2013).

Prueba de inhibición de *P. capsici* in vitro

En el centro de una placa de PDA de 4 mm de grosor, se colocó una sección de 5 mm de diámetro de agar que contenía micelio de *P. capsici*. Alrededor de la sección de agar se ubicaron 4 discos de papel de 0,5 cm de diámetro, distribuidos simétricamente. La unidad experimental consistió en el plato de PDA con los 4 discos. A partir de las cepas PC4, PC9, PC11 y PC2J, se prepararon suspensiones bacterianas en la forma previamente descrita. En cada disco se vertió 7 µL de una de las suspensiones. Para cada tratamiento se empleó 5 repeticiones. Se utilizó como control positivo el producto Acrobat MZ 69 WP el cual es un fungicida químico con acción sobre *P. capsici* y que tiene como principio activo dimetomorf; y como testigo se empleó solución salina estéril al 0,85%. Las placas con filtros fueron incubadas durante 7 días a 25°C y se determinó el radio de crecimiento de *P. capsici*. El antagonismo fue determinado en la forma descrita por Ko et ál. (2009) como porcentaje de actividad inhibitoria, igual a $[(A - B)/A] * 100$; donde A es el radio de crecimiento del micelio del oomicete, y B es el crecimiento de *P. capsici* en presencia de la bacteria.

El diseño experimental fue irrestricto al azar, los datos de crecimiento se analizaron con el programa INFOSTAT y se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), para la separación de medias se utilizó LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Determinación de la concentración óptima para la inoculación de *P. capsici* en plantas de chile

Se utilizó suelo proveniente de Chachagua, San Carlos (Cuadro 1); el suelo se trató con vapor a 96°C por 24 horas y se mezcló con vermicompost al 50%. La adición de este abono favoreció el desarrollo de la enfermedad en plantas de chile dulce en trabajos previamente realizados en el Laboratorio de Microbiología Agrícola (Uribe et ál. 2014).

Cuadro 1. Análisis químico del suelo, Chachagua, San Carlos, Alajuela, Costa Rica. 2012.

pH		cmol(+).l ⁻¹				%		mg.l ⁻¹				%
H ₂ O	ACIDEZ	Ca	Mg	K	CICE	SA	P	Zn	Cu	Fe	Mn	MO
6,5	0,15	4,5	0,89	0,01	5,6	3	ND	1,6	8	54	14	1,9
5,5	0,50	4,0	1,00	0,20	5,0		10	3,0	1	10	5	

Los valores debajo de cada elemento corresponden con los Niveles Críticos generales para la solución extractora usada.

Se emplearon plantas de chile *Capsicum annuum* var. Natalie, de aproximadamente 21 días de edad. Las mismas se trasplantaron a macetas de 8 x 8 cm que contenían 250 gramos de suelo. La unidad experimental consistió en 2 plantas de chile colocadas en recipientes de mayor tamaño. Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento.

Se evaluó la inoculación de diferentes concentraciones de zoosporas de *P. capsici*, a saber, 0, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 zoosporas. ml⁻¹. Se inoculó 1 ml de cada suspensión cerca de la base de la plántula al día 21 (Primer brote apical lateral). El riego se aplicó por medio de una lámina de 4 cm de agua en el recipiente en el que se colocó la maceta. Treinta días después se cosechó el experimento y se evaluó la severidad

con el apoyo de la escala de síntomas presentada en las Figuras 1 y 2. En cada una de las plantas con síntomas de la enfermedad se corroboró la presencia de *P. capsici*, tras el aislamiento del patógeno después de colocar secciones de la lesión en medio PDA durante 10 días a temperatura ambiente. A cada unidad experimental se le asignó un valor, de acuerdo con la escala de síntomas, de 0 a 3 en el caso de la parte aérea, y de 0 a 4 en la parte radical. Los datos de severidad correspondientes a las repeticiones de las concentraciones evaluadas se analizaron con el programa INFOSTAT, mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con un arreglo irrestricto al azar. Para la separación de medias se utilizó la prueba LSD Fisher ($p \leq 0,05$).



Fig. 1. Escala de severidad de la parte aérea de las plantas de Chile *Capsicum annuum* var. Natalie. [A]: Planta sana (0). [B]: Planta con hojas amarillas (1). [C]: Plantas con presencia de hojas marchitas (2). [D]: Planta muerta (3).



Fig. 2. Escala de severidad de las lesiones de raíz de las plantas de Chile *Capsicum annuum* var. Natalie. [A]: Raíz sana (0). [B]: Raíz que presenta una lesión superficial de 2-4 mm (1). [C]: Raíz que presenta una lesión de 2-9mm (2). [D]: Raíz con una lesión profunda, necrosada mayor a 10mm (3). [E]: Raíz con lesión necrosada alrededor de parte radical basal (4).

Evaluación del efecto de cuatro cepas bacterianas en la protección de plantas de chile inoculadas con *P. capsici*

Las plantas de chile se sembraron en macetas con el suelo tratado con vapor a 96°C por 24 horas y mezclado con vermicompost al 50%. La unidad experimental consistió en 2 plantas de chile de 21 días de edad colocadas en un mismo recipiente. Se evaluó la inoculación con 3 cepas que presentaron antagonismo in vitro y una cepa que no presentó inhibición, para lo cual se establecieron los siguientes tratamientos: *P. capsici*, *P. capsici* + *P. fluorescens* PC4, *P. capsici* + *S. rhizophila* PC9, *P. capsici* + *P. fragi* PC11, *P. capsici* + *A. lipoferum* PCJ2 y testigo, como testigo se usó solución salina estéril (SSE). Todas las plantas con excepción del testigo, fueron inoculadas con 1 ml de una suspensión de 100 zoosporas de *P. capsici* al día 21 (Primer brote apical lateral). Se utilizó un diseño irrestricto al azar con 10 repeticiones por cada tratamiento. Posteriormente cada planta fue inoculada en la zona basal con 1 ml de la cepa bacteriana correspondiente ajustada a una concentración de 1×10^8 bacterias.ml⁻¹. El riego se aplicó con una lámina de 4 cm de agua en el recipiente en el que se colocó la maceta. Se realizaron 3 aplicaciones de las rizobacterias, a los días 28, 35 y 42 días, en la etapa fenológica de formación de brotes laterales, con el objetivo

de mantener una población adecuada de rizobacterias durante el crecimiento de la planta hasta la aparición de los síntomas de la enfermedad.

Se evaluó la severidad de la enfermedad a los 51 días, en la fase de aparición del órgano floral. Se determinó el peso fresco y seco aéreo, así como el peso fresco y seco radical. Los datos se analizaron con el programa INFOSTAT, mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con un arreglo irrestricto al azar. Para la separación de medias se utilizó LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de las RPC

Las cepas bacterianas utilizadas en el estudio fueron identificadas como *Pseudomonas fluorescens* PC4, *Stenotrophomonas rhizophila* PC9, *Pseudomonas fragi* PC11 y *Azospirillum lipoferum* PCJ2 (Cuadro 2). Las cepas PC4, PC9 y PC11 fueron aisladas de la rizosfera de caña y la PCJ2 de la rizosfera de arroz. Cepas de *P. fluorescens* (Khalid et ál. 2004, Podile y Kishore 2006, Bhattacharyya y Jha 2012, Kaymak 2011), *P. fragi* (Selvakumar et ál. 2009, Bashan et ál. 2014), *S. rhizophila* (Hayward et ál. 2010, Schmidt et ál. 2012) y *A. lipoferum* (Shah et ál. 1992, Mehnaz y Lazarovits 2006, Hungría et ál. 2010,

Cuadro 2. Bacterias promotoras de crecimiento evaluadas por su posible actividad antagonista sobre *Phytophthora capsici*. Montes de Oca, 2014.

Código colección	Secuencia más cercana en Genbank	% de identidad	Cultivo de procedencia
PC4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain LMG 14677 (GU198127)	100	Caña de azúcar
PC9	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> DSM14405T (AJ293463)	99	Caña de azúcar
PC11	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420 (AB685632)	99	Caña de azúcar
PCJ2	<i>Azospirillum lipoferum</i> strain ATCC 29707T (NR_116846)	98	Arroz

Veresoglou y Menexes 2010, Kaymak 2011, Bashirzadeh et ál. 2012, Bashan y de-Bashan 2010, Bashan et ál. 2014) han sido previamente reportadas como promotoras de crecimiento.

Prueba de inhibición de *P. capsici* in vitro

Las cepas *P. fluorescens* PC4, *S. rhizophila* PC9 y *A. lipoferum* PCJ2, lograron inhibir a nivel

in vitro el crecimiento del oomicete en un 54%, 30% y 50% respectivamente (Cuadro 3, Figura 3). El radio de crecimiento de *P. capsici* en contacto con las cepas PC4 y PCJ2 fue significativamente menor que el observado en el control positivo. Oh et ál. (2011) encontraron que de 11 RPC evaluadas in vitro, 9 inhibieron el crecimiento de *P. capsici* mientras que Kim et ál. (2009) reportaron

Cuadro 3. Diámetro de crecimiento de *Phytophthora capsici* enfrentado a diferentes cepas de rizobacterias. Montes de Oca, 2012.

Tratamiento	Radio de crecimiento del micelio (cm)	Porcentaje de inhibición (%)
*Testigo	3,77 e	
Control positivo	2,47 c	35
Phy-PC4	1,74 a	54
Phy-PC9	2,65 d	30
Phy-PC11	3,79 e	-2
Phy-PCJ2	1,87 b [†]	50

[†] Cada cifra representa el promedio de 5 repeticiones.

* Testigo (*P. capsici* -SSE al 0,85%), Control positivo (*P. capsici*-Acrobat MZ 69 WP), Phy-PC4 (*P. capsici* – *P. fluorescens*), Phy-PC9 (*P. capsici* + *S. rhizophila*), Phy-PC11 (*P. capsici* –*P. fragi*), Phy-PCJ2 (*P. capsici* – *A. lipoferum*).

Valores con letras distintas son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD Fisher, p<0,05.

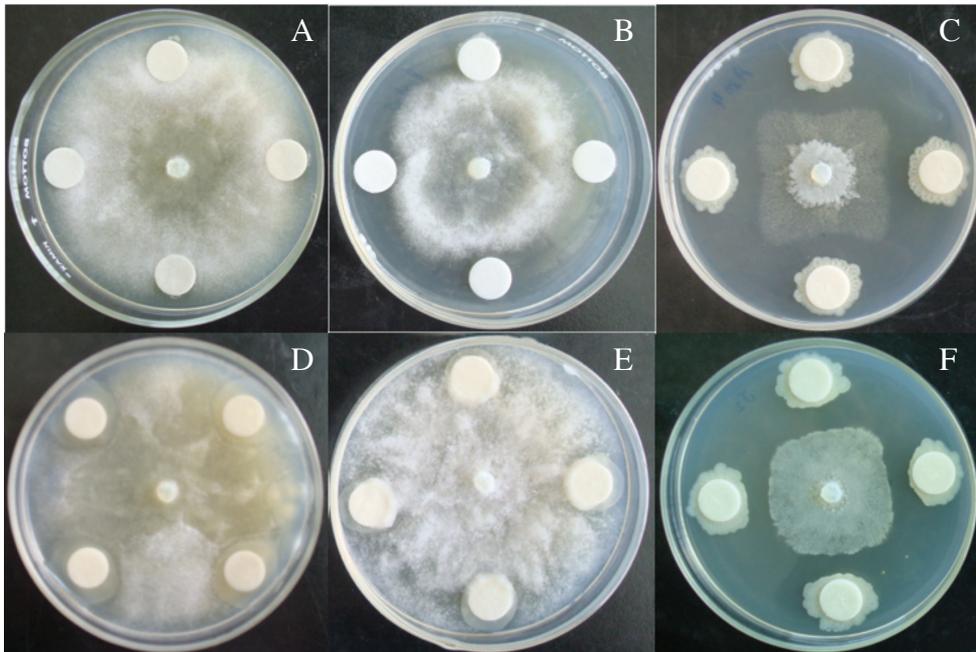


Fig. 3. Crecimiento del micelio de *P. capsici* en contacto con [A]: SSE 0,85 % (testigo), [B]: Acrobat MZ 69 WP (control positivo) [C]: PC4, [D]: PC9, [E]: PC11 y [F]: PCJ2.

al estudiar 25 cepas de *P. polymyxa*, 15 cepas con actividad fuerte, 5 con actividad débil y 5 sin actividad antimicrobiana.

El efecto inhibitorio in vitro puede deberse a la producción de antibióticos, sideróforos o enzimas por parte de las cepas. Ko et ál. (2009) indican que *L. antibioticus* HS124 produce enzimas líticas como quitinasa y b-1,3-glucanasas, lipasas, proteasas y antibióticos que pueden ser responsables de la inhibición mostrada por esta bacteria en ensayos in vitro contra *P. capsici*. Los autores identificaron el compuesto antibiótico como ácido 4-hidroxifenilacético. Oh et ál. (2011) identificaron los compuestos antifúngicos surfactinas, iturinas y fengicinas producidos por la cepa de *Bacillus* SB10 antagonista a *P. capsici*. Se ha observado que cepas de *S. rhizophila* aisladas de la rizosfera, producen antibióticos activos contra hongos y bacterias (Hayward et ál. 2010, Schmidt et ál. 2012). En el caso de *Azospirillum* spp. Bashan y de-Bashan (2010) indican que se ha reportado actividad antagónica causada por la producción de sideróforos, HCN, bacteriocinas y ácido fenilacético por bacterias de este género, específicamente algunas cepas de *A. lipoferum* producen bacteriocinas (Oliveira 1987) y sideróforos con actividad antimicrobiana (Shah et ál. 1992).

En estudios realizados por Paul y Sarma (2006) cepas de *P. fluorescens* inhibieron el crecimiento micelial de *P. capsici* in vitro, mientras que metabolitos producidos por la bacteria afectaron la producción de esporangios y la liberación y germinación de zoosporas. Los autores identificaron el compuesto volátil HCN y los antibióticos pioluteorina y pirrolnitrina. En otro estudio, Lee et ál. (2003) purificaron y evaluaron el sideróforo pioverdina producido por la cepa 2112 de *P. fluorescens* que mostró acción antagónica contra *P. capsici* in vitro y en plantas de chile dulce.

Determinación de la concentración óptima para la inoculación de *P. capsici* en plantas de chile

Si bien se observaron síntomas en la parte aérea de algunas de las plantas de chile

con la inoculación de las concentraciones 100, 500 y 1000 zoosporas.ml⁻¹ (plantas con hojas amarillas, plantas con hojas marchitas y planta muerta), no hubo diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Índice de severidad en plantas de chile *Capsicum annuum* var. Natalie expuestas a diferentes concentraciones de zoosporas de *Phytophthora capsici*. Montes de Oca, 2012.

Zoosporas.ml ⁻¹	Severidad ¹ Parte Aérea	Severidad Parte radical
0	0,0 a	0,0 a
10	0,0 a	0,3 a
50	0,0 a	0,5 a
100	0,2 a	1,0 b
500	0,3 a	1,4 b
1000	0,3 a	1,4 b
5000	0,0 a	1,4 b
10000	0,0 a	2,0 b

¹ La severidad corresponde al valor promedio de las 10 repeticiones de cada tratamiento según el valor asignado en la escala de síntomas de las Figuras 1 y 2.

Se observó un rápido incremento en la severidad en la parte radical al aumentarse el número de esporas inoculadas hasta el nivel de 500 zoosporas.ml⁻¹, las plantas de los tratamientos a los que se les adicionó más de 100 zoosporas.ml⁻¹ presentaron una severidad significativamente mayor que aquellas que fueron expuestas a 0, 10 y 50 zoosporas.ml⁻¹ (Cuadro 4), lo que indica que una mayor concentración de zoosporas asegura mayor contacto con las raíces, sin embargo, a partir de 100 zoosporas.ml⁻¹, no se observó un aumento significativo en la severidad. Al respecto Tuset et ál. (2001), en estudios realizados con zoosporas de *P. cinnamomi* en plantas de *Quercus* sp., indican que si las zoosporas enquistadas se acumulan masivamente en zonas puntuales de la corteza radical, se puede impedir que los tubos germinativos alcancen los tejidos superficiales de la planta. Se eligió usar

la dosis de 100 zoosporas.ml⁻¹ por tratarse de la concentración por encima de la cual ya no se observa un aumento significativo en la severidad de los síntomas.

Evaluación del efecto de cuatro rizobacterias sobre la supresión de *P. capsici* en plantas de Chile *C. annuum* var. Natalie

Como se observa en el Cuadro 5 el peso fresco y seco de la parte aérea en el tratamiento

inoculado con el patógeno (Phy) no se diferenció significativamente del testigo, mientras que las plantas inoculadas con la cepa PC9 presentaron un peso fresco de la parte aérea significativamente mayor que los tratamientos Phy, testigo y Phy-PC4. No hubo diferencias significativas en la variable peso seco entre los tratamientos inoculados con las bacterias y los tratamientos testigo y Phy. Sin embargo, el tratamiento inoculado con la cepa PC9 fue significativamente mayor que el tratamiento Phy-PC4.

Cuadro 5. Peso fresco y seco e índice de severidad de raíces y parte aérea causados por *Phytophthora capsici* en plantas de Chile *Capsicum annuum* var. Natalie tratadas con 4 cepas bacterianas promotoras de crecimiento. Montes de Oca, 2012.

Tratamiento*	Peso fresco aéreo	Peso seco aéreo	Peso fresco raíz	Peso seco raíz	Severidad ¹ parte aérea	Severidad raíz
*Phy-PC4	55,4 a	7,37 a	18,4 a	2,14 ab	1,1 c	0,6 b
Phy-PC9	69,9 c	8,46 b	22,3 b	2,31 b	0,5 b	0,1 a
Phy-PC11	63,7 bc	8,00 ab	18,3 a	1,97 a	1,3 c	0,7 bc
Phy-PCJ2	66,6 bc	8,45 b	23,2 b	2,06 ab	0,0 a	0,1 a
Phy	60,0 ab	7,64 ab	22,2 b	2,21 ab	1,5 c	1,0 c
Testigo	60,4 ab	7,84 ab	26,9 c	3,04 c	0,0 a	0,0 a

* Phy-PC4 (*P. capsici* + *P. fluorescens*), Phy-PC9 (*P. capsici* + *S. rhizophila*), Phy-PC11 (*P. capsici* + *P. fragi*), Phy-PCJ2 (*P. capsici* + *A. lipoferum*), Phy (*P. capsici*), Testigo (SSE al 0,85%).

¹ La severidad corresponde al valor promedio de las 10 repeticiones de cada tratamiento según el valor asignado en la escala de síntomas de las Figuras 1 y 2.

Con respecto al peso radical, en todos los tratamientos en los que se inoculó *P. capsici* se observó un menor peso fresco y seco que en el tratamiento testigo, aunque el tratamiento Phy-PC11 fue el que presentó menor peso. La inoculación del oomycete causó en la mayoría de los tratamientos, síntomas en la parte aérea y/o en la raíz de la planta, Mendoza y Pinto (1985) mencionan que lesiones en la parte terminal de la raíz principal afectan la absorción de agua y nutrientes hacia el resto de la planta, y por consiguiente causan marchitez en el tallo y hojas de las mismas. En los tratamientos en los que se inocularon las cepas PC9 y PCJ2 se observó una menor

severidad en la parte aérea y radical que en el tratamiento inoculado con el patógeno, mientras que las plantas inoculadas con la cepa PC4, presentaron una severidad de la infección en la raíz significativamente menor que las inoculadas con *P. capsici*, sin embargo, la aplicación de esta cepa no redujo la severidad de los síntomas en la parte aérea. La cepa PC11 no logró reducir la severidad de la infección en las plantas.

Aunque los resultados obtenidos para la cepa PC11 en medio de cultivo y en planta coincidieron, la mayor actividad in vitro presentada por la cepa PC4 no correspondió con lo observado a nivel de invernadero. Los resultados

discrepantes entre la actividad antagonista en pruebas “in vitro” e “in vivo” pueden deberse a los procedimientos utilizados en los ensayos y al tiempo para evaluar la actividad contra el oomycete; la técnica en placa excluye además, mecanismos como la colonización de la raíz, la competencia y parasitismo a nivel de rizosfera, o la modulación por parte de las bacterias de actividades realizadas por la planta (Sharma et ál. 2007, Kim et ál. 2008). No obstante, Kim et ál. (2008) consideran que el método de cultivo dual aún es útil para el tamizaje de cepas antagonistas. Por el contrario, Rajkumar et ál. (2005) proponen ensayos con plántulas de chile como una técnica rápida y precisa para la selección de agentes de biocontrol promisorios.

En este trabajo se observaron diferencias entre cepas en su efectividad para la protección del cultivo; así, de las cepas evaluadas *S. rhizophila* PC9 y *A. lipoferum* PCJ2, presentaron potencial para la protección de plantas de chile al reducir significativamente la severidad de la enfermedad lo que podría brindar una alternativa al uso de agroquímicos para el control de este patógeno. Kim et ál. (2009) también observaron una reducción en la severidad de la enfermedad a nivel de invernadero con *P. polymyxa* GBR-462, mientras que Ezziyyani et ál. (2004) demostraron actividad antagonista de *B. cepacia* en estudios in vitro, a nivel de invernadero y de campo. Resultados exitosos fueron también obtenidos por Lee et ál. (2003) quienes atribuyen la acción antagonista a sideróforos producidos por *P. fluorescens* cepa 2112.

Cabe destacar que la cepa *S. rhizophila* PC9 aumentó el peso fresco de la planta en un 14%; Schmidt et ál. (2012) también observaron promoción de crecimiento en plantas de chile dulce y algodón utilizando la cepa *S. rhizophila* DSM14405T, los autores sugieren un efecto indirecto vía eliminación de microorganismos patógenos. Según Singh y Singh (2013), *S. rhizophila* tiene una gran potencial para la aplicación en biotecnología y control biológico debido a su capacidad para promover el crecimiento y proteger la planta de stress biótico y abiótico.

Así mismo, Ko et ál. (2009) indicaron que a nivel de invernadero plantas inoculadas con *L. antibioticus* HSI24 presentaron un mayor crecimiento, resultado de un efecto protector contra *P. capsici*. Sang et ál. (2008) en estudios en campo y Park et ál. (2013) utilizando *Bacillus vallismortis* encontraron cepas que además de reducir la marchitez, aumentaron la producción de frutos. Un efecto similar fue observado por Oh et ál. (2011) quienes señalaron que la cepa de *Bacillus* SB10 redujo la marchitez y aumentó el vigor de *C. annuum*.

Si bien el tratamiento de las plantas con cepas bacterianas promotoras de crecimiento ha llevado en algunos casos al control biológico como una alternativa efectiva contra patógenos presentes en el suelo (Guo et ál. 2004), debe considerarse que la supresión de enfermedades a través de agentes protectores y antagonistas depende de la interacción entre la planta, el patógeno, el agente usado como biocontrol y el ambiente por lo que es necesario continuar con estudios a nivel químico y molecular para profundizar en los mecanismos de acción empleados por las RPC, así como estudiar si estas características se mantienen en diferentes genotipos y en condiciones de campo.

LITERATURA CITADA

- ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHAFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research* 25(17):3389-3402.
- AMORIM E.D.R., MELO I.D. 2002. Ação antagonista de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. *Revista Brasileira de Friticultura* 24(2):565-568.
- BASHAN Y., de-BASHAN L.E. 2010. Chapter 2. How the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum* promotes plant growth-A critical assessment. *Advances in Agronomy* 108:77-136.
- BASHAN Y., de-BASHAN L.E., PRABHU S.R., HERNANDEZ J.P. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil* 378(1-2):1-33.
- BASHIRZADEH Z., SHARIFI R.S., SEDGHI M., KHAVAZI K. 2012. Evaluation of rate and seed

- filling period of barley to co-inoculation with plant growth promoting bacteria (PGPR) and nitrogen fertilizer. *Research Journal of Agricultural Science* 44(3):3-8.
- BHATTACHARYYA P.N., JHA D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(4):1327-1350.
- BRUNEL B., GIVAUDAN A., LANOIS A., AKHURST R.J., BOEMARE N. 1996. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology* 63(2):574-580.
- CORRALES O., VARGAS E., MOREIRA M.A. 1990. Efecto de la materia orgánica en el combate de la pudrición basal del chile dulce (*Capsicum annuum*) causada por *Phytophthora capsici*. *Agronomía Costarricense* 14(1):9-14.
- EZZIYYANI M., PÉREZ C., REQUENA M.E., AHMED A.S., CASTILLO M.E.C. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología* 26:61-68.
- FONTECHA G. 2003. Análisis comparativo de las comunidades de procariontes intestinales de *Rothschildia lebeau* (Lepidoptera) mediante los polimorfismos en los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP) del gen ARNr 16S. Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 139 p.
- GUO J.H., QI H.Y., GUO Y.H., GE H.L., GONG L.Y., ZHANG L.X., SUN P.H. 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control* 29(1):66-72.
- HALL T. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41:95-98.
- HAUSBECK M.K., LAMOUR K.H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Disease* 88(12):1292-1303.
- HAYWARD A.C., FEGAN N., FEGAN M., STIRLING G.R. 2010. *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology. *Journal of Applied Microbiology* 108(3):756-770.
- HERNÁNDEZ A., RIVES N., CABALLERO A., HERNÁNDEZ A.N., HEYDRICH M. 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo de maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología* 6(1):6-13.
- HOWELL C.R., STIPANOVIC R.D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* 70(8):712-715.
- HUNGRIA M., CAMPO R.J., SOUZA E.M., PEDROSA F.O. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil* 331(1-2):413-425.
- KAYMAK H.C. 2011. Potential of PGPR in agricultural innovations, pp. 45-79. In: D.K. Maheshwari (ed). *Plant growth and health promoting bacteria*. Microbial Monographs vol 18.
- KHALID A., ARSHAD M., ZAHIR Z.A. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology* 96(3):473-480.
- KIM H.S., SANG M.K., JEUN Y.C., HWANG B.K., KIM K.D. 2008. Sequential selection and efficacy of antagonistic rhizobacteria for controlling *Phytophthora* blight of pepper. *Crop Protection* 27(3-5):436-443.
- KIM K.D., NEMEC S., MUSSON G. 1997. Control of *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper with composts and soil amendments in the greenhouse. *Applied. Soil Ecology* 5(2):169-179.
- KIM S.G., KHAN Z., JEON Y.H., KIM Y.H. 2009. Inhibitory effect of *Paenibacillus polymyxa* GBR-462 on *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight in chili pepper. *Journal of Phytopathology* 157(6):329-337.
- KLOPPER J.W., RYU C.M., ZHANG S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11):1259-1266.
- KO H.S., JIN R.D., KRISHNAN H.B., LEE S.B., KIM K.Y. 2009. Biocontrol ability of *Lysobacter antibioticus* HS124 against *Phytophthora* blight is mediated by the production of 4-Hydroxyphenylacetic acid and several lytic enzymes. *Current Microbiology* 59(6):608-615.
- LEE E.T., LIM S.K., NAM D.H., KHANG Y.H., KIM S.D. 2003. Pyoverdine 2112 of *Pseudomonas fluorescens* 2112 inhibits *Phytophthora capsici*, a red-pepper blight-causing fungus. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 13(3):415-421.
- MEHNAZ S., LAZAROVITS G. 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology* 51(3):326-335.
- MENDOZA C., PINTO B. 1985. Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos. Universidad Autónoma Chapingo, México. 311 p.
- OH B.T., HUR H., LEE K.J., SHANTHI K., SOH B.Y., LEE W.J., MYUNG H., KAMALA S. 2011. Suppression of *Phytophthora* blight on pepper (*Capsicum annuum* L.) by bacilli isolated from brackish

- environment. *Biocontrol Science and Technology* 21(11):1297-1311.
- OLIVEIRA R.G.B., DROZDOWICZ A. 1987. Inhibition of producing strains of *Azospirillum lipoferum* by their own bacteriocin. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 142(5):387-391.
- PARK J.W., BALARAJU K., KIM J.W., LEE S.W., PARK K. 2013. Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. *Biological Control* 65(2):246-257.
- PAUL D., SARMA Y.R. 2006. Antagonistic effects of metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strains on the different growth phases of *Phytophthora capsici*, foot rot pathogen of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 39(2):113-118.
- PERVEEN R., FANI I., CHOCHAN S., HAIDER S., NAZ S. 2010. Effect of nitrogen and carbon from different organic supplements on pathogenic potential of *Phytophthora capsici* in the collar rot of chillies. *European Journal of Scientific Research* 43(1):107-112.
- PODILE A.R., KISHORE G.K. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria, pp.195-230. In: S.S. Gnanamanickam (ed.). *Plant-Associate bacterias*. Springer Netherlands.
- RAJKUMAR M., LEE W.H., LEE K.J. 2005. Screening of bacterial antagonists for biological control of *Phytophthora* blight of pepper. *Journal of Basic Microbiology* 45(1):55-63.
- REYES I., ALVAREZ L., EL-AYOUBI H., VALERY A. 2008. Selección y evaluación de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* 20(1):37-48.
- SANG M.K., CHUN S., KIM K.D. 2008. Biological control of *Phytophthora* blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biological Control* 46(3):424-433.
- SANG M.K., KIM K.D. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria suppressive to *Phytophthora blight* affect microbial activities and communities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annum* L.) in the field. *Applied Soil Ecology* 62:88-97.
- SCHMIDT C.S., ALAVI M., CARDINALE M., MÜLLER H., BERG G. 2012. *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils* 48(8):947-960.
- SELVAKUMAR G., JOSHI P., NAZIM S., MISHRA P.K., BISHT J.K., GUPTA H. S. 2009. Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984), a psychrotolerant bacterium isolated from a high altitude Himalayan rhizosphere. *Biologia* 64(2):239-245.
- SHAH S., KARKHANIS V., DESAI A. 1992. Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity from *Azospirillum lipoferum* M. *Current Microbiology* 25(6):347-351.
- SHANAHAN P., O'SULLIVAN D.J., SIMPSON P., GLENNON J.D., O'GARA F. 1992. Isolation of 2, 4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology* 58(1):353-358.
- SHARMA A., PATHAK A., SAHGAL M., MEYER J.M., WRAY V., JOHRI B.N. 2007. Molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria that enhance peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities in chile (*Capsicum annum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Archives of Microbiology* 188(5):483-494.
- SILVAR C., DUNCAN J.M., COOKE D.E.L., WILLIAMS N.A., DÍAZ J., MERINO F. 2005. Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *European Journal of Plant Pathology* 112(1):43-52.
- SINGH J.S., SINGH D.P. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Microbes in Sustainable Agriculture, pp. 361-385. In: A. Malik, E. Grohmann and M. Alves (eds.). *Management of Microbial Resources in the Environment*. Springer Netherlands.
- SOLÍS V.C. 1989. Índice de enfermedades de los cultivos agrícolas de Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería, San José. 112 p.
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12):2725-2729.
- THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F., HIGGINS D.G. 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25(24):4876-4882.
- TUSET J.J., COTS F., HINAREJOS C., MIRA J.L. 2001. Suspensión de zoosporas de *Phytophthora cinnamomi* que causan la "seca" en cinco especies de *Quercus* mediterráneos. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 27(1):103-115.
- URIBE L., CASTRO L., ARAUZ L.F., HENRÍQUEZ C., BLANCO M. 2014. Pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile tratadas con vermicompost. *Agronomía Mesoamericana* 25(2):243-253.
- VERESOGLOU S.D., MENEXES G. 2010. Impact of inoculation with *Azospirillum* spp., on growth properties and seed yield of wheat: A meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant and Soil* 337(1-2):469-480.

YANG M.M., XU L.P., XUE Q.Y., YANG J.H., XU Q., LIU H.X., GUO J.H. 2012. Screening potential bacterial biocontrol agents towards *Phytophthora capsici* in pepper. European Journal of Plant Pathology 134(4):811-820.

ZHANG S., WHITE T.L., MARTINEZ M.C., McINROY J.A., KLOEPPER J.W., KLASSEN W. 2010. Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of *Phytophthora* blight on squash under greenhouse conditions. Biological Control 53(1):129-135.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr