

Efecto del sustrato y la temperatura en el control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.)

Mohammed Ezziyiani, María Emilia Requena, Consuelo Pérez-Sánchez & 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 Septiembre 2005

Aceptado: 29 Noviembre 2005

El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de la temperatura y el pH sobre la capacidad antagonista in vitro e in vivo del hongo *Trichoderma harzianum* y las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Streptomyces rochei* Ziyani, sobre la tristeza causada por *Phytophthora capsici*. Los ensayos se realizaron en plantas de pimiento, crecidas a partir de semillas tratadas con cada antagonista. En ensayos in vitro se realizaron confrontaciones duales de cada antagonista con el patógeno *P. capsici* analizando macroscópicamente las interacciones y las capacidades antagonistas a temperaturas de 23 y 30°C y a distintos valores de pH. Utilizamos una escala de 0 a 4 donde 0 equivale a ninguna invasión de la superficie de la colonia de *P. capsici* y 4 significa la invasión total de la colonia del patógeno y esporulación sobre la misma. Con esa escala se obtuvo que la capacidad antagonista de los tres antagonistas fué 4. La temperatura óptima de antagonismo fue 30°C para las bacterias *St. rochei* Ziyani y *B. cepacia* y 25°C para el hongo *T. harzianum*. El pH 4,5 no afecta la acción inhibitoria de las bacterias, incluso la favorece, y en cambio, a ese pH la colonia de *T. harzianum* reduce su densidad y color aunque no se afecta su capacidad antagonista. Los trabajos in vivo se realizaron en cámara de cultivo preferentemente a 23°C porque aunque la agresividad y la velocidad de la necrosis en tallos infectados es mayor a 30°C, la respuesta defensiva de la planta está favorecida a 23°C. El efecto del pH en el crecimiento de las plántulas se realizó in vivo en suelos de pHs 5,61, 5,44, 4,95, 4,58, 4,20 y 3,48, obtenidos en mezclas de suelos formados por turba, arena y disolución de KCl 1M, en diferentes proporciones. En el invernadero la intensidad de inhibición varió según el pH del medio de cultivo y los antagonistas. La reducción efectiva de la enfermedad fue de un 3,25 (con el hongo *T. harzianum*), un 2,10 (con la bacteria *B. cepacia*) y un 1,85 (con la bacteria *St. rochei* Ziyani) lo cual equivale a una reducción porcentual del 37%, 42% y 65% respectivamente. El control se realizó en suelos de pH= 4,58 obtenidos con mezcla de turba en una disolución de KCl 1M, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Se usaron distintas concentraciones de las bacterias, pero no se observó diferencias en el grado de reducción de la tristeza. También se estudió la interacción en tallos a nivel estructural mediante microscopía electrónica de transmisión en la interacción *C. annuum*-*P. capsici*.

Palabras clave: Biocontrol, *Capsicum annuum*, pH, Temperatura, *Phytophthora capsici*, *Trichoderma harzianum*, *Burkholderia cepacia*, *Streptomyces rochei* Ziyani.

Abstract

Effect of substrate and temperature on the biological control of Phytophthora capsici in pepper (Capsicum annum L.)

The objective of this study was to compare the in vitro and in vivo effect of temperature and pH on the antagonistic capacity of the fungus *Trichoderma harzianum*, bacteria *Burkholderia cepacia* and *Streptomyces rochei* Ziyani on the wilt caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants grown from seeds treated with each antagonist. In the in vitro assays, the interactions and antagonistic capacities of each antagonist against the pathogen *P. capsici* at 23 and 30°C were analysed macroscopically and given a value of 4 on a scale of 0 (no superficial invasion of the *P. capsici* colony) to 4 (total superficial invasion and sporulating of the *P. capsici* colony). The optimal temperature was 30°C for the bacteria *St. rochei* Ziyani and *B. cepacia*, and 25°C for *T. harzianum*. A pH of 4.5 did not affect the inhibitory action of either bacteria, and even favoured it, but reduced the density and colour of *T. harzianum* colony without affecting its antagonistic capacity. In vivo experiments were carried out at 23°C in a culture chamber because the aggressiveness and velocity of the necrosis reaction in infected stems is greater than at 30°C. The effect of pH on platelet growth was studied in vivo at pH values of 5.44, 4.95, 4.58, 4.20 and 3.48 in mixtures of peat, sand and 1M KCl in different proportions. In greenhouse conditions, the intensity of inhibition varied with the pH of the culture medium and of the antagonists. The effective reduction of the disease was 3.25 with the fungus *T. harzianum*, 2.10 with the bacteria *B. cepacia* and 1.85 with the bacteria *St. rochei* Ziyani, which represent reductions of 37%, 42% and 65% respectively. Control was in the peat, sand and 1M KCl mixtures at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and pH 4.8. The different concentrations of bacteria used did not give rise to different degrees of reduction in wilt. The defensive response of the plant is also favoured the *C. annum-P. capsici* interaction at a structural level was studied by transmission electronic microscopy

Key word: Biocontrol, *Capsicum annum*, pH, Temperature, *Phytophthora capsici*, *Trichoderma harzianum*, *Burkholderia cepacia*, *Streptomyces rochei* Ziyani.

Introducción

El oomiceto patógeno *Phytophthora capsici* produce tristeza o seca, enfermedad mortal en plantas de pimiento, que además deja los suelos infectados e inhábiles para el cultivo de esta hortícola. Hasta ahora los suelos contaminados se desinfectaban con productos químicos como el bromuro de metilo (BrMe), pero este gas, es tóxico para el medio ambiente y prohibido a partir del 2005. En busca de alternativas, nuestro grupo de investigación inició una línea de trabajo sobre biocontrol para tratar de encontrar antagonistas de *P. capsici* y poder así cultivar pimientos aún en campos contaminados con el patógeno. El control

biológico tiene el inconveniente de que hay que utilizar microorganismos específicos contra el patógeno y que no sean lesivos para la planta cultivada. En estos últimos años se han identificado numerosos microorganismos capaces de suprimir patógenos de plantas. Concretamente nuestro grupo ha conseguido reducir la enfermedad causada por *P. capsici* en plantas de pimientos utilizando bacterias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y el hongo *Trichoderma harzianum* (*Th*). (Sid Ahmed et al. 2001, 2003a y 2003b). Otros investigadores han utilizado también microorganismos antagonistas frente a patógenos (Papavizas et al. 1980, Lahsen et al. 2001, Schmidt et al. 2004).

En este trabajo hemos ensayado tres microorganismos: (1) el hongo *T. harzianum* del cual conocemos la diversidad de modos de acción contra patógenos fúngicos como *Rhizoctonia solani* (Beagle-Ristaino & Papavizas, 1984), *Pythium* spp. (Besnard & Davet, 1993), *Sclerotium* (Clarkson et al. 2004) y también contra *P. capsici* (Ezziyyani et al. 2003); (2) la bacteria *Burkholderia cepacia* que produce numerosos antibióticos y sideróforos (Elad & Baker 1985, Bevivino et al. 1998, De la Fuente et al. 2001, Szczech & Shoda 2004), y que ha sido estudiada como un agente de biocontrol con éxito frente a oomycetos patógenos de guisantes (Heungens & Parke 2001) y de pimiento (Ezziyyani et al. 2005a); y (3) la bacteria *Streptomyces rochei* Ziyani, aislada por nuestro grupo de investigación, conociendo la capacidad de aislados de *Streptomyces* para inhibir patógenos fúngicos (Innes & Allan 2001, Hwang et al. 2001, Ezziyyani et al. 2004).

Material y Métodos

Material vegetal

Semillas y plántulas de pimiento (*Capsicum annum*) variedad California Wonder, muy sensible al ataque de *P. capsici*. Las semillas se desinfectaron en una disolución comercial de hipoclorito sódico al 2%, durante 5 minutos, se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Se introdujeron en 10 ml de una suspensión de cada uno de los antagonistas preparada en agua destilada-sacarosa al 3% durante diez min. a una concentración de 209 UFC/ml, de *St. rochei* Ziyani, 5×10^8 UFC/ml de *B. cepacia* y $2,2 \times 10^6$ esporas/ml del hongo *T. harzianum*. A los 10 minutos se retiraron, absorbiendo el exceso de agua con un papel de filtro estéril y dejándolas secar bajo corriente de aire en una cámara de flujo laminar. La germinación se realizó en bandejas alveolares (de 48 senos, 4x4x14 cm) con una mezcla estéril de turba comercial (Humus King, Floraska, Alemania) (pH 5,6) y arena (3:1 v/v) mas turba rubia comercial (pH 3,8) al 50%, que habían sido autoclavada a 121°C durante una hora, dos veces en dos días consecutivos. Las bandejas se instalaron, en el invernadero de la Estación de Experimentación Agrícola de la Universidad de Murcia (EEA-UMU) a 23-30°C, 65% de humedad y fotoperíodo de 12 horas. Los semilleros se mantuvieron en invernadero hasta que se desarrolló la quinta hoja verdadera y entonces se transplantaron a macetas y posteriormente se inocularon con el patógeno *P. capsici* (Ezziyyani et al. 2005b).

Para hacer el recuento de la población inicial del antagonista adherida a cada semilla, se separaron 5

semillas tratadas con cada aislado y se molieron en un mortero estéril añadiendo 9 ml de un disolvente de peptona-agua (P-A) al 0,1% (p/v). A partir de la suspensión obtenida se prepararon diluciones decimales que, sembradas en placas con medio PDA, en el caso de *T. harzianum* y NA (Caldo nutritivo-agar de Merk) en el caso de las bacterias se incubaron a 25°C en oscuridad y el recuento se hizo bajo el microscopio a las 48h.

Material microbiológico

El patógeno utilizado fué *P. capsici* aislado 17 (Candela et al. 1995) que se cultiva y mantiene en medio patata-dextrosa-agar (PDA, Difco) a 25°C. Para las infecciones se usaron colonias de 5 días de las que se extrajeron discos de 5 mm de diámetro cortados al borde de la colonia miceliana en crecimiento. Como antagonistas se usaron el hongo *T. harzianum* aislado 2413 de la Colección española de cultivos tipo (CECT) de Valencia conservado en medio PDA; la cepa bacteriana *B. cepacia*, aislado 322 de (CECT) conservada en medio King's B agar (KBA estándar II, Merk) y el aislado bacteriano *St. rochei* Ziyani, depositado en el CECT con el número 3363, conservado en medio NA (Caldo nutritivo-agar de Merk). Para el tratamiento de las semillas y las plántulas de pimiento in vivo, se prepararon tanto las suspensiones como los inóculos de los tres antagonistas a base de vermiculita según (Ezziyyani et al. 2005a).

Método de infección y evaluación del efecto de la temperatura, sobre la longitud de la necrosis en los tallos de pimiento frente a *P. capsici*

Se inocularon plántulas de pimiento de cinco hojas verdaderas mediante un test conocido como inoculación por decapitación (Pochard & Chambonnet 1971), el cual adaptado a nuestro material vegetal, consiste en seccionar el tallo con un bisturí estéril por encima de la última hoja adulta, a continuación se taladra un bloque de agar de 5 mm de diámetro en una placa Petri, donde previamente había crecido el patógeno *P. capsici*, y se coloca en la sección practicada en el tallo, cubriéndose con dedos de papel de aluminio durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se retira el agar y el capuchón y se deja que avance la infección fúngica. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones a 30°C y a 23°C.

Para evaluar el desarrollo de la infección, se midió la longitud de la zona necrótica a los tres y nueve días después de la inoculación con el patógeno. Las medidas se expresaron en milímetros con una apreciación de ± 1 mm. La extensión del micelio en el

tallo se analizó estadísticamente mediante el análisis de la varianza y la comparación de las medias usando el test LSD a $P = 0,05$.

Control microscópico

A los nueve días de la inoculación por decapitación de las plantas de pimiento con *P. capsici* (Ezziyyani et al. 2005c), se cortaron y se compararon la zona necrosada del tallo infectado y la correspondiente zona del tallo control. Muestras de 2 mm. de las zonas mencionadas fueron procesadas mediante microscopía electrónica de transmisión según (Alcázar et al. 1993).

Preparación de sustratos para la siembra de semillas y plántulas de pimiento

Los sustratos de suelos utilizados tanto en las bandejas alveolares para la siembra como en las macetas para el trasplante, se esterilizaron a 121°C durante una hora dos veces, en dos días consecutivos. El control de los suelos se consiguió combinando mezclas de sustratos, con agua destilada, o con disolución de cloruro potásico (KCl 1M). Una muestra de suelo se desmenuza bien y luego se disuelve en agua destilada o en disolución de KCl 1M (v/v) al 50%. Una relación de los tipos de sustratos analizados y el pH obtenido se muestra en la Tabla 1.

Tratamiento in vivo de las plántulas de pimiento con cada antagonista cultivado en vermiculita y su infección con *P. capsici*.

Las plántulas crecidas de semillas tratadas con cada uno de los antagonistas y desarrolladas en bandejas alveolares con los sustratos anteriormente citados, se transplantaron a macetas de (16,5x17 cm), a las que se agregaron los correspondientes inóculos crecidos en vermiculita (Ezziyyani. et al 2004). Las concentraciones fueron: [1] 3×10^4 , 2×10^6 , 7×10^8 y 1×10^9 UFC/ml, de *B. cepacia*, [2] 907, 2103, 3088 y 5906

UFC/ml de *St. rochei* Ziyani y [3] 9×10^3 , 8×10^5 , 2.1×10^6 y 2.2×10^7 esporas/ml de *T. harzianum*. Al cabo de 10 días, se infectaron con el patógeno *P. capsici* crecido en vermiculita a razón de $1,2 \times 10^6$ ppg/g, que se agregó directamente a las macetas con el fin de asegurarnos una buena infección.

A estas plantas se denominaron tratadas e inoculadas (T&I). Para el control, se incorporaron plantas en un sustrato tratado y no inoculado (T&NI), plantas en un sustrato no tratado e inoculado (NT&I), plantas en un sustrato no tratado y no inoculado (NT&NI). Las macetas de cada tratamiento se dispusieron al azar, en un campo protegido bajo plástico en la estación de Experimentación Agrícola de la Universidad de Murcia. Se enriquecieron con una solución de KNP cada dos semanas. La temperatura osciló entre 25 y 30°C y la humedad relativa entre 65 y 85%. Diez plantas fueron utilizadas para cada tratamiento y los ensayos se repitieron tres veces. Al final del segundo mes después del trasplante, se hizo la lectura de los resultados.

Resultados y discusión

Evaluación de las confrontaciones in vitro de los antagonistas con *P. capsici*

Los resultados del test del antagonismo de cada microorganismo utilizado frente al patógeno, determinados por observaciones macroscópicas en las interacciones muestran varios mecanismos de acción que son: antibiosis, producción por parte de *St. rochei* Ziyani y *B. cepacia* de antibióticos tóxicos para *P. capsici*; micoparasitismo y lisis enzimática por parte del hongo *T. harzianum* y *St. rochei* Ziyani, que utilizan al patógeno como alimento, junto con una notable competición por el espacio y por los nutrientes ejercida por cada antagonista frente al patógeno. A partir de una semana los tres antagonistas invadieron totalmente la colonia del patógeno *P. capsici* esporulando sobre el mismo y alcanzando el grado 4, teniendo como referencias para las evaluaciones, la escala propuesta por Elías y Arcos en 1984 que se muestran

Tabla 1. Valores de pH en distintos sustratos disueltos en agua destilada o en disolución de cloruro potásico (KCl 1M).

| Tipo del sustrato | Disolución | Valor del pH |
|---|----------------|--------------|
| turba y arena (3:1 v/v) | agua destilada | pH 5,61 |
| turba comercial y arena (3:1 v/v) | KCl 1M | pH 5,44 |
| 50% de turba y arena (3:1 v/v) + 50% de turba rubia | agua destilada | pH 4,95 |
| 50% de turba y arena (3:1 v/v) + 50% de turba rubia | KCl 1M | pH 4,58 |
| turba rubia | agua destilada | pH 4,20 |
| turba rubia | KCl 1M | pH 3,48 |

Tabla 2. Grado de la capacidad antagonística de los microorganismos de biocontrol respecto a la colonia del patógeno.

| Grado antagonístico | Capacidad antagonística (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 | Invasión total de la superficie de la colonia de <i>P. capsici</i> . |
| 4 | Invasión total de la superficie de la colonia de <i>P. capsici</i> y esporulación sobre ella. |

Tabla 3. Efecto del tratamiento in vivo con los antagonistas sobre la podredumbre causada por *P. capsici* en plantas de pimiento. Las plántulas crecieron de semillas tratadas en un sustrato de una mezcla de turba rubia y comercial de pH= 4,58. La evaluación se realizó en una escala de 0 (ningún síntoma) a 5 (planta muerta). Los resultados de la podredumbre son los valores medios por planta y tratamiento. Las medias seguidas por las mismas letras no tienen diferencias significativas según el test LSD a $P = 0.05$.

| Tipos de tratamiento | Podredumbre causada por <i>P. capsici</i> | % de la de la podredumbre |
|-----------------------------------|---|---------------------------|
| Control: (NT&NI) | 0,00 a | 0% |
| <i>P. capsici</i> : (NT&I) | 5,00 c | 100 % |
| <i>B. cepacia</i> : (T&NI) | 0,00 a | 0 % |
| <i>T. harzianum</i> : (T&NI) | 0,00 a | 0 % |
| <i>St. rochei</i> . Ziyani (T&NI) | 0,00 a | 0 % |
| <i>B. cepacia</i> : (T&I) | 2,10 a | 42% |
| <i>T. harzianum</i> : (T&I) | 3,25 b | 65% |
| <i>St. rochei</i> . Ziyani (T&I) | 1,85 a | 37% |

Plantas: T= tratadas con los antagonistas; NT= no tratadas; I= Inoculadas con el patógeno; NI= no inoculadas.

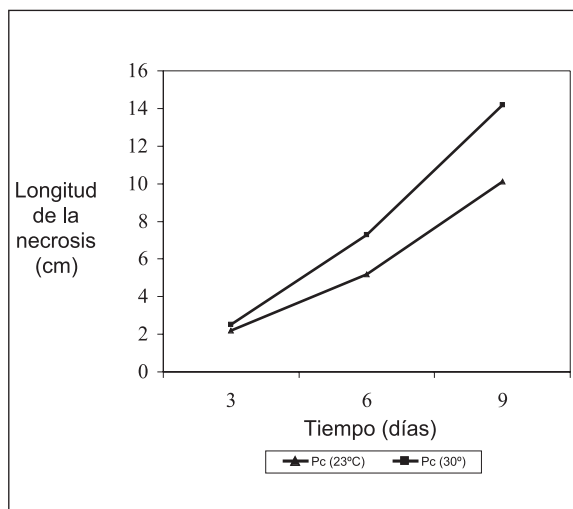


Figura 1. Agresividad del patógeno *Phytophthora capsici* (Pc) a distintas temperaturas a los 3, 6 y 9 días después de la inoculación. Se analiza la respuesta de la planta de pimiento mediante el desarrollo de la longitud de la necrosis en los tallos inoculados por decapitación.

en la Tabla 2. Los resultados de las confrontaciones demuestran la particular habilidad parásita y destructiva de cada antagonista frente al oomiceto patógeno *P. capsici*.

Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de la necrosis en tallos de pimiento decapitados e infectados con *P. capsici*

Para estudiar el desarrollo de la infección en el tallo, se realizaron tres controles a los 3, 6 y 9 días después de infectar por decapitación con *P. capsici*. A partir del tercer día después de la inoculación la progresión de la necrosis muestra diferencias en los tallos de las plantas sometidas a temperaturas de 23°C y 30°C. Las diferencias en la extensión de la necrosis en relación con la temperatura demuestran que a 23°C, a partir del tercer día, las células vivas adyacentes al tejido necrótico ponen en marcha las defensas que determinan las resistencias y a partir del noveno día solo se puede considerar un control relativo. Si relacionamos los datos obtenidos de la longitud de la necrosis con respecto al tiempo de infección, obtenemos un gráfico significativo de la velocidad del avance de la necrosis entre los tallos a 23°C y 30°C que nos mide la reacción de la planta, frente al ataque del patógeno (Figura 1).

De los resultados obtenidos, se deduce que la respuesta de las plantas a 23°C frente al ataque del patógeno *P. capsici* es una reacción de hipersensi-

bilidad y que la efectividad se debe probablemente a la síntesis y/o incremento de sustancias defensivas que se sintetizan en las células adyacentes al frente de infección, así como a su velocidad de formación. Entre las sustancias defensivas se encuentran compuestos fenólicos (Candela et al. 1995) y proteínas-PR, con actividad glucanasa, quitinasa y peroxidasa (Egea et al. 1996, Ongena. et al. 2000, Ezziyyani et al. 2001, Ezziyyani et al. 2005a). El resultado más concluyente es que en ningún caso, al someter las plantas a distintas temperaturas 23°C y 30°C se impidió la infección del tallo después de una inoculación directa. A partir de los catorce días fue imposible seguir midiendo el desarrollo de la necrosis en el tallo porque se produjo la muerte de la planta.

En la figura 2A se muestra el aspecto de una sección semifina transversal de tallo sano. En ella se aprecian las distintas capas celulares. Las alteraciones a nivel estructural que se producen en el tejido necrótico se muestran en la figura 2B. En esta zona del tallo las células están deformadas y desorganizadas, extendiéndose esta degradación fuera del contacto con las hifas del hongo. En la sección semifina, se aprecia que el crecimiento del hongo es mayoritariamente extracelular y su presencia se pone de manifiesto, en muchos casos, por la coloración más intensa en muchos espacios intercelulares.

Evaluación in vivo del efecto de los sustratos y los tratamientos con cada antagonista sobre la podredumbre causada por *P. capsici*

El valor de pH es de vital importancia, ya que la concentración de iones hidrógeno modifica la disponibilidad de nutrientes. Generalmente los suelos ácidos no son favorables para el desarrollo de la mayoría de los cultivos, por lo que en nuestros ensayos in vivo observamos que tanto el porcentaje de germinación, como el desarrollo morfológico de las plántulas crecidas a partir de semillas tratadas, con cada antagonista en un sustrato de turba rubia, presentaban un aspecto amarillento en los extremos de los cotiledones. Se debe a que a un pH menor que 4 es demasiado ácido y por tanto crea un ambiente desfavorable. De las cuatro concentraciones de los antagonistas mencionadas anteriormente se inocularon las plántulas con 10^9 UFC/ml, de *B. cepacia*, 2103 UFC/ml de *St. rochei* Ziyani y $2,2 \times 10^7$ esporas/ml de *T. harzianum*, comprobando que la aplicación de dosis más altas de las requeridas no aumenta la eficacia en el biocontrol del patógeno.

Los resultados se muestran en la Tabla 3 donde se observa que los tratamientos in vivo de las plántulas crecidas a partir de semillas y tratados con los

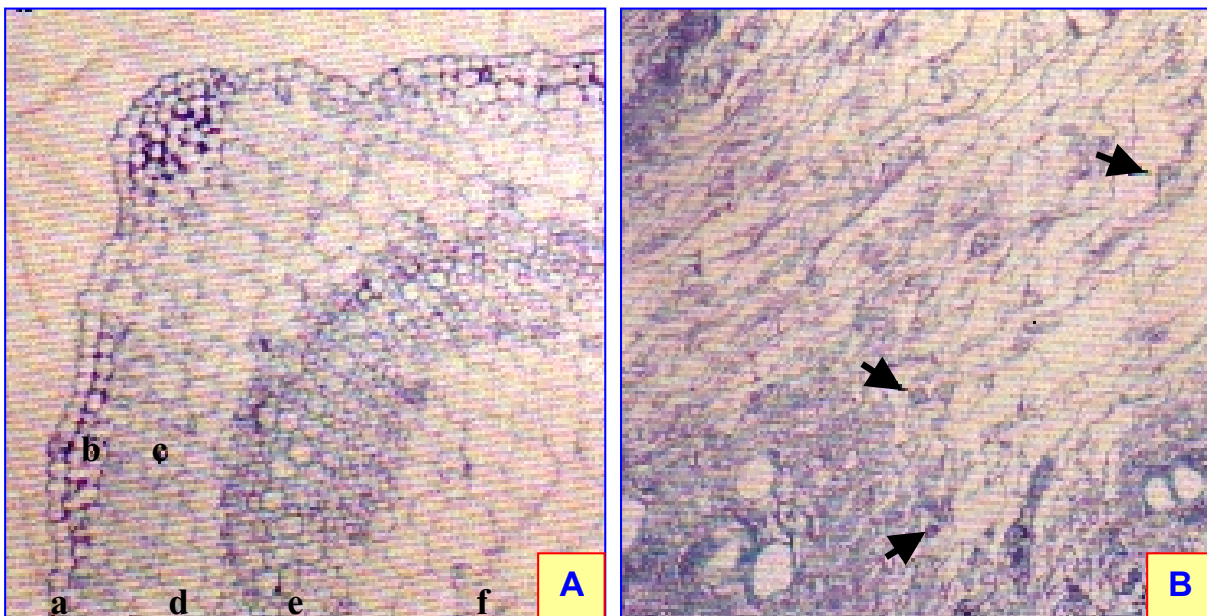


Figura 2. Secciones semifinas de tallos de pimentero teñidos con azul de toluidina. A) sano (100X) donde se observan las distintas zonas a: epidermis, b: colénquima, c: córtex, d: sistema vascular, e: médula. B) necrótico tras la inoculación con el patógeno (400X) donde las flechas indican las hifas de *P. capsici*.

antagonistas separadamente producen varios grados de reducción de la enfermedad, que variaba significativamente entre los ensayos y entre las plántulas del mismo tratamiento en el mismo ensayo. La mayor reducción de la enfermedad se debe al efecto del aislado bacteriano *St. rochei* Ziyani. Este resultado está en consonancia con lo aportados por otros investigadores confirmando la importancia del biocontrol con bacterias del genero *Streptomyces* (El-Tarabily et al. 2000, Hwang et al. 2001).

La reducción máxima se obtuvo con el aislado *St. rochei* Ziyani cuando las plantas crecieron en la mezcla de pH 4,58 [(turba + arena) + (turba rubia) 1:1], en disolución de KCl 1M (Tabla 3). En definitiva las plantas crecidas a partir de semillas tratadas con los antagonistas, en la mezcla de turbas de pHs 3,58 y 5,6 han sido capaces de reducir, la pudrición de las raíces causada por el patógeno *P. capsici* hasta un 3,25 con el hongo *T. harzianum*, a 2,10 con la bacteria *B. cepacia* y a 1,85 con la bacteria *St. rochei* Ziyani lo cual equivale a una podredumbre del 37%, 42% y 65% respectivamente, en comparación con las del control. El peso seco de las plántulas en los distintos tratamientos con las bacterias y las plantas de control no mostró diferencias. Las plántulas crecidas a partir de semillas tratadas con el hongo *T. harzianum* en turba de pH 5,61 crecieron más que las plantas control.

La medida del pH del suelo es una determinación sencilla, de gran valor, pues todos los microelementos necesarios para los cultivos, se encuentran en las formas absorbibles por las plantas cuando el pH es ácido. Pero no convienen valores extremos de acidez ya que algunos microelementos son tóxicos a concentraciones altas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte con el Proyecto 057PCMC/02 de la Fundación Seneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. M. Ezziyyani ha sido becario MAE durante la realización de este trabajo.

Referencias

- Alcázar MD, Espín A & Candela ME. 1993. Estudio ultraestructural de tallos de *Capsicum annum* con distinta sensibilidad a *Phytophthora capsici*. *Fitopatología*: 28, 77-85.
- Alcazar MD, Egea C, Espin A & Candela ME. 1995. Peroxidases isoenzymes in the defense response of *Capsicum annum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 94: 736- 742
- Beagle-Ristaino J & Papavizas GC. 1984. Reduction of *Rhizoctonia solani* in soil with fermentor preparations of *Trichoderma* and *Gliocadium*. *Phytopathology* 74: 836-841.
- Besnard O & Davet P. 1993. Mise en évidence de souches de *Trichoderma* spp. à la fois antagonistes de *Pythium ultimum* et stimulatrices de la croissance des plantes. *Agronomie* 13: 413-421.
- Bevivino A, Sarrocco S, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Cantale C & Chiarini L. 1998. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiology Ecology* 27: 225-237.
- 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.
- Clarkson JP, Mead A, Payne T & Whipps JM. 2004. Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathology* 53: 353-362.
- De la Fuente L, Bajsa N, Bagnasco P, Quagliotto L, Thomashow L & Arias A. 2001. Antibiotic production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from forage legume rhizosphere. *Journal of Applied Microbiology* 90: 421-429.
- Egea C, Alcázar MD & Candela ME. 1996. ?-1,3-glucanase and chitinase as pathogenesis-related proteins in the defense reaction of two *Capsicum annum* cultivars, infected with *Cucumber Mosaic Virus*. *Biologia Plantarum* 38: 437-443
- Elad Y & Baker R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamidospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75: 1053-1059.
- El-Tarabily KA, Soliman MH, Nassar AH, Al-Hassani HA, Sivasithparam K, Mckenna F & Hardy GE. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology* 49: 573-583.
- Ezziyyani M, Sid Ahmed A, Pérez-Sánchez C, Egea C & Candela ME. 2001. Interacción de la planta de pimiento (*Capsicum annum* L.) con *Streptomyces rochei* Ziyani y su efecto sobre la necrosis en el tallo causado por *Phytophthora capsici*. *Actas de la XIV Reunión de la Soc. Española de Fisiología Vegetal & VII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal*. Badajoz, España.
- 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. *Actas de la XV Reunión de la Sociedad Española & VIII*

- Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal. Palma de Mallorca, España.
- Ezziyyani M, Pérez Sánchez C, Requena ME, Rubio L, & Candela ME. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* Ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78.
- Ezziyyani M, Requena ME, Rubio L, Egea-Gilabert C and Candela ME. 2005a. Biocontrol of pepper (*Capsicum annuum* L.) root rot caused by *Phytophthora capsici* using combination *Trichoderma harzianum* and *Burkholderia cepacia*. *Proceeding del congreso Iberoamericano de Ciencias Hortícolas*. Oporto, Portugal 64 – 69.
- Ezziyyani M, Pérez Sánchez C, Sid Ahmed A, Requena ME & Candela ME. 2005b. Evaluación del efecto de pH y la temperatura en el biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) Acte du Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire. Fes, Marruecos, pp. 279-284.
- Ezziyyani M, Pérez Sánchez C, Sid Ahmed A, Requena ME & Candela ME. 2005c. Inducción de la resistencia en la planta de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum* y su efecto sobre el avance de la necrosis del tallo causada por *Phytophthora capsici*. Acte du Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire. Fes, Marruecos, pp. 473-480.
- Heungens K & Parke JL. 2001. Postinfection biological control of Oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. *Phytopathology* 91: 383-391.
- Hwang BK, Lee JY, Kim BS & 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 CM & Allan EJ. 2001. Induction, growth and antibiotic production of *Streptomyces viridifaciens* L-form bacteria. *Journal Applied Microbiology* 90: 301-308.
- Lahsen HA, Soler A, Rey M, De la Cruz J, Monte E & Lobell A. 2001. An antifungal Exo- α -glucanase (AGN1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5833-5839.
- Ongena M, Daayf F, Jaques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC. & Bélanger RR. 2000. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with Fluorescent pseudomonads. *Plant Pathology* 49: 523-530.
- Papavizas GC. & Lumsden RD. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology* 18: 389-413.
- Pochard E & Chambonnet D. 1971. Methodes de selection du piment pour la resistance au *Phytophthora capsici* et au virus du concombre. *Annuaire de la Faculté des Sciences Agronomique Université de Torino* 7: 270-281.
- Schmidt CS, Agostini F, Simon AM, Whyte J, Townend J, Leifert C, Killham K & Mullins C. 2004. Influence of soil type and pH on the colonisation of sugar beet seedlings by antagonistic *Pseudomonas* and *Bacillus* strains, and on their control of *Pythium* damping-off. *European Journal of Plant Pathology* 110: 1025-104.
- Sid Ahmed A, Pérez Sánchez C, Ezziyyani M & Candela ME. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* treatments on systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* and its relation with capsidiol accumulation. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens*. IOBC/wprs. 24 (3): 265-269.
- 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 annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109: 418-426.
- Sid Ahmed A, Ezziyyani M, Egea Gilabert C & Candela ME. 2003b. Selecting bacterial stains for use in the biocontrol of diseases caused by *Phytophthora capsici* and *Alternaria alternata* in sweet pepper plants. *Biología Plantarum* 48: 47-52.
- Szczeczek M & Shoda M. 2004. Biocontrol de Rhizoctonia camping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. *Journal of Plant Pathology* 152: 549-556.