

EVALUACIÓN, DIAGNÓSTICO Y BIOCONTROL DE FITOPATÓGENOS DE *CAPSICUM FRUTESCENS* (SOLANACEAE) EN GUACARÍ, VALLE DEL CAUCA.

Leidy Mayerli Zambrano Orozco

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

Correo electrónico: leidy.zambrano@correounivalle.edu.com

Celina Torres González

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

Correo electrónico: celina.torres@correounivalle.edu.com

RESUMEN

El cultivo de ají tabasco (*Capsicum frutescens*) en los últimos años ha comenzado a expandirse y cobrar gran importancia debido a su alta rentabilidad, producción y posibilidades para exportación; sin embargo en Colombia los graves problemas fitosanitarios presentados, han limitado la productividad afectando los rendimientos y elevando los costos de producción. En esta investigación se caracterizaron los microorganismos patógenos presentes en una plantación de ají tabasco en Guacarí – Valle, identificándose veintisiete especies fúngicas: seis de *Alternaria*, ocho de *Fusarium*, cuatro de *Nigrospora*, dos de *Curvularia*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum* sp., *Exserohilum* sp. y dos morfoespecies. Ocho especies bacterianas: dos de *Bacillus*, *Bacillus megaterium*, *Erwinia* sp., *Kocuria halotolerans*, tres de *Xanthomonas*. Los microorganismos fueron sometidos a pruebas de patogenicidad, con el fin de determinar su carácter patógeno, llevándose a cabo la caracterización molecular de aquellos que produjeron a nivel de invernadero los mayores niveles de daño. Los géneros *Curvularia*, *Exserohilum* y las especies *Kocuria halotolerans*, *Bacillus megaterium* no reportadas como patógenos del género *Capsicum*, dieron positiva la prueba de patogenicidad. Finalmente se llevaron a cabo pruebas de antagonismo de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* contra catorce especies de hongos patógenos y las ocho especies de bacterias patógenas. Se encontró que *B. subtilis* inhibió el crecimiento del género *Alternaria*, *Kocuria halotolerans* y *Bacillus* sp.3, sin embargo *T. harzianum* presentó los mejores resultados al inhibir todas las bacterias patógenas y los hongos patógenos excepto, *Colletotrichum* sp y *Curvularia* sp.1. La mayor inhibición se presentó en *Colletotrichum truncatum* con PICR de 84,1%.

Palabras clave: Bacterias patógenas, *Bacillus subtilis*, caracterización molecular, hongos patógenos, pruebas de antagonismo, *Trichoderma harzianum*.

ABSTRACT

The crop of *Capsicum frutescens* in the last years has begun to expand and has a big importance due to its profitability, production and potential of export. However, in Colombia this plantation has phytosanitary problem, which limit the production affecting performance and raising the cost of production. In this investigation were characterized pathogens microorganisms of a crop of *Capsicum frutescens* in Guacarí-Valle. Twenty-seven fungi microorganisms were isolated: six *Alternaria* sp., eight *Fusarium* sp., four *Nigrospora* sp., two *Curvularia* sp., one *Aspergillus* sp., one *Cladosporium* sp., *Colletotrichum truncatum*, one *Colletotrichum* sp. and two morph species. Eight bacterial microorganisms: *Bacillus megaterium*, two *Bacillus* sp., *Kocuria halotolerans*, one *Erwinia* sp. and

three *Xanthomonas* sp. pathogenicity test were performed for determine the character pathogen of microorganisms, carrying out molecular characterization of those who presented in greenhouse the higher levels of damage. The gender *Curvularia*, *Exserohilum* and the species *K. halotolerans*, *B. megaterium* not reported as pathogen of *Capsicum*, gave positive the pathogenicity test. Finally antagonism test were performed using antagonist *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* against fourteen pathogens fungi and eight pathogens bacteria, was found that *B.subtilis* inhibited the growth of gender *Alternaria*, *K. halotolerans* and *Bacillus* sp.3. *Trichoderma harzianum* inhibited the growth of all pathogens bacteria and fungi, except *Curvularia* sp.1 and *Colletotrichum* sp. most inhibition was presented by *Colletotrichum truncatum* with a PICR of 84,1%.

Key words: antagonim test, *Bacillus subtilis*, molecular characterization, pathogens microorganims, *Trichoderma harzianum*.

INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* perteneciente a la familia Solanaceae es originario de Mesoamérica y comprende 25 especies silvestres y cultivadas, estas últimas son: *C. annum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. chinenses* y *C. pubescens* (Shruti *et al.* 2014). *Capsicum frutescens* es un arbusto perenne, pero cultivado comercialmente como si fuera anual, con una altura entre 1 – 1,5 m, los frutos son bayas de color rojo-anaranjado en la madurez, con pocas o muchas semillas lenticulares de color blanco o amarillo (FDA 1994 y Francis 2004). La importancia del ají está dada por sus múltiples usos, en la industria alimentaria, medicinal y agrícola. En la industria alimentaria debido a su alto contenido de ácido ascórbico, vitamina A, B1, B2, y la pungencia (Sánchez 2008). En la medicina tradicional el género es empleado en el tratamiento de tifo, fiebre, hidropesía, dispepsia, gota, cólera, dolor estomacal, antiinflamatorio, antidiarreico, antineurálgico, antiséptico. En la industria agrícola debido a acción

alelopática contra algunas plagas de interés agrícola (Moreno *et al.* 2012 y Waizel & Camacho 2011).

A nivel mundial según la FAO los principales países productores de ají son China y México. En Colombia las zonas de producción comercial de *Capsicum* se ubican en los departamentos de Santander, Valle del Cauca y Costa Atlántica (Melgarejo *et al.* 2004). La importancia de realizar estudios fitosanitarios en cultivos como *Capsicum frutescens* radica en que como se afirma por Melgarejo *et al.* (2004) en Colombia los cultivos de *Capsicum* son relativamente recientes y han comenzado a expandirse debido a su alta rentabilidad, producción y posibilidades para exportación. Factores que se han visto limitados por los problemas fitosanitarios que se presentan, los cuales limitan la productividad afectando los rendimientos y elevando los costos de producción (Rugeles *et al.* 2010).

Estudios hechos por Escalona *et al.* (2006); FDA (1994); González *et al.* (2002) y Katoch & Kapoor (2014) han reportado para el género *Capsicum* las

siguientes enfermedades. Causadas por hongos: Damping off (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp.), marchitez por *Sclerotium* (*Sclerotium rolfsii*), marchitez fungosa (*Fusarium oxysporum*), mancha cercospora (*Cercospora capsici*), tristeza (*Phytophthora capsici*), antracnosis (*Colletotrichum capsici*), oidiopsis (*Leveillula taurica*), podredumbre gris (*Botryotinia fuckeliana*), podredumbre blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*), *Phytium* sp., *Verticillium* sp., mancha foliar (*Alternaria* sp.), tizón (*Choanephora cucurbitarum*), mancha foliar gris (*Stemphium solani*), moho gris (*Botrytis cinerea*). Causadas por bacterias: sarna bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), podredumbre blanda (*Erwinia carotovora*), marchitez (*Ralstonia solanacearum*).

El control de plagas y enfermedades depende principalmente del uso de agroquímicos sintéticos, lo cual ha incrementado la población de organismos fitopatógenos resistentes provocando un aumento significativo de los costos de producción y graves problemas de contaminación ambiental, lo anterior sumado a la creciente demanda de alimentos, ha hecho que en los últimos años los métodos de control biológicos cobren importancia (Moreno *et al.* 2012). Debido a la importancia que ha adquirido en los últimos años el ají en Colombia como un producto para exportación, es necesario mejorar las

condiciones fitosanitarias del cultivo, con el propósito de incrementar la producción y el rendimiento. El objetivo de este proyecto fue caracterizar las bacterias y hongos causantes de enfermedades detrimentales en una plantación de *Capsicum frutescens* en Guacarí-Valle del Cauca, determinando su carácter patógeno por medio de pruebas de patogenicidad. Posteriormente se evaluó la eficacia de los antagonistas *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* como controladores biológicos *In vitro* de los microorganismos patógenos caracterizados. Adicionalmente se realizó la identificación molecular de los patógenos que produjeron a nivel de invernadero los mayores niveles de daño.

MÉTODOS

1. Zona de estudio:

La fase de campo se llevó a cabo en la vereda Guacas, Municipio de Guacarí, Valle del Cauca, con una altitud de 900 m.s.n.m. La plantación tiene un área de 7600 m² y se encuentra distribuida en 8 módulos, con un promedio de 10,5 surcos cada módulo.

2. Fase de campo

2.1 Toma de muestras: se realizaron tres muestreos aleatorios en los módulos 2 (M2), 4 (M4), 7 (M7) y 8 (M8), donde se evaluaron 10 plantas de cada surco impar, tomando muestras de aquellas

donde se evidenciara algún tipo de daño causado por microorganismos fitopatógenos, descartando síntomas que posiblemente fueran producto de estrés fisiológico o daño por insectos. Los muestreos se llevaron a cabo al mes, tres meses y seis meses de establecido el cultivo. Las muestras de tejido vegetal (hojas, tallos y frutos) fueron tomadas con ayuda de una tijera estéril, y guardadas en toallas de papel al interior de bolsas ziploc debidamente rotuladas, para posteriormente ser transportadas en una nevera de icopor con gel refrigerante al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM) del departamento de biología de la Universidad del Valle.

2.2 Incidencia y severidad: Se determinó la incidencia ($\text{Incidencia} = (\text{plantas enfermas} / \text{total de plantas}) * 100$) y severidad en cada módulo evaluado, para la severidad se empleó una escala descriptiva de cero a cinco: cero sin ningún daño; uno (1% - 5%); dos (6% - 12%); tres (13% - 25%); cuatro (26% - 50%) y cinco (51% - 100%) según el área de afectada (Barone & Coley 2002).

3. Fase de laboratorio

El aislamiento y purificación de los microorganismos dependió del tipo de microorganismo a identificar (hongos o

bacterias). En general se realizó la desinfestación del material vegetal (pequeños trozos que presentaran tejido enfermo y tejido sano) con etanol al 70% durante 30 segundos, hipoclorito de sodio al 3 % durante 30 segundos, lavado con agua destilada estéril (ADE) durante un minuto (dos veces) y secado en toallas de papel.

3.1 Aislamiento, purificación e identificación de hongos: para el aislamiento se tomaron cinco trozos de tejido vegetal desinfestado por cada síntoma encontrado y se sembraron en agar papa dextrosa (PDA) (dos repeticiones por síntomas). Una vez se observó crecimiento micelial se procedió a purificar cada colonia fúngica sembrando en PDA, también se utilizaron medios específicos como agar avena, medio V8, agar papa zanahoria, agar maíz dependiendo de los requerimientos nutricionales de cada microorganismo. Para la identificación se realizaron observaciones macroscópicas, la cual consistió en una descripción morfológica: textura, color, topografía, crecimiento, presencia de pigmentos; y observaciones microscópicas, para lo cual se realizó el montaje de improntas con azul de lactofenol para observar las estructuras somáticas y reproductivas: conidias, conidióforos, tipos de hifas y coloraciones. Para la caracterización e identificación de los hongos

se trabajó con las claves morfológicas (Barnett & Hunter 1996; Nelson *et al.* 1983)

3.2 Aislamiento, purificación e identificación de bacterias: para el aislamiento por síntoma se maceraron varios trozos de tejido vegetal desinfectados con 10 mL de ADE, se tomaron 100 µL de la solución, y con perlas de vidrio estériles se extendieron sobre agar nutritivo (AN) (2 repeticiones por síntoma), posteriormente se purificaron las colonias desarrolladas en AN. Para la caracterización de las bacterias se procedió según lo propuesto por Escalona *et al.* (2006) determinando las características culturales, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de cada bacteria. En cuanto a las características culturales se determinó la elevación, borde, consistencia y color de las cepas; para las características morfológicas se observó al microscopio óptico la forma de la célula; se realizó tinción de gram y KOH al 3% y en cuanto a las características fisiológicas y bioquímicas se realizaron las pruebas de: catalasa, citrato de Simmons, indol, lisina-hierro, oxidasa, rojo de metilo, TSI y urea, además se sembraron en agar MacConkey. Para la identificación de bacterias fitopatógenas se siguió el esquema de Schaad (1988).

3.3 Caracterización molecular: se realizó la extracción de ADN genómico a los microorganismos que presentaron la mayor severidad resultado de las pruebas de patogenicidad utilizando el *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MO BIO), el ADN extraído se amplificó para las bacterias con dos cebadores universales: 27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' y 1492R 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT3', y para el caso del hongo con los cebadores ITS15' TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' y ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3'. El coctel de la PCR se preparó con base a las concentraciones finales: buffer (10x), MgCl₂ (1.75 µm), dntp's (20 µm), primer (4 µm), taq polimerasa (1 unidad). En el termociclador se empleó el siguiente programa para bacterias: fase de desnaturalización 95°C (5 min); fase de extensión 95°C (30 seg), 54°C (40seg), 72°C (40 seg) y la extensión final 72°C (10 min), para el hongo se empleó el mismo programa solo que la temperatura de 54°C se modificó a 52°C. Las secuencias se determinaron mediante procedimientos estándares del servicio suministrado por la compañía Macrogen (USA). Con el fin de eliminar y corregir los errores que se pudieran presentar en el proceso de

secuenciación automática, las secuencias obtenidas se editaron de forma manual con el programa bioedit en el caso de las bacterias y el programa Sequencher para el hongo. posteriormente se compararon directamente con las secuencias depositadas en las bases de datos del GenBank y del Ribosomal Database Project, por medio de la herramienta BLAST. Del GenBank se extrajeron secuencias muy similares a la secuencia de estudio, y se construyó el árbol filogenético usando el modelo que el programa jmodeltest 2.1.7 definió como el mejor. El árbol se construyó con ayuda del programa MEGA 6.

4. Prueba de patogenicidad

Con el fin de determinar cuáles de los microorganismos identificados eran patógenos de *Capsicum frutescens*, se realizó en el LIM la preparación de inóculos puros de hongos y bacterias, para su posterior inoculación en el invernadero de la estación experimental de biología de la universidad del Valle por medio del método de punción en plantas de ají tabasco sanas con una edad comprendida entre los dos y cinco meses, sembradas en bolsas plásticas con suelo de jardín. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- 4.1** preparación de inóculos: para los hongos se realizó con ayuda de la cámara de Neubauer,

calculando una concentración entre 1×10^7 - 1×10^8 esporas/ml, para lo cual se adiciono 10 mL de ADE a cada caja de petri (dos cepas por hongo identificado) y con ayuda de un asa estéril se raspo el micelio, la solución obtenida se filtró con una gasa estéril. Para la preparación de los inóculos bacterianos se empleó el método de turbidimetria, mediante un espectrofotómetro se midió la densidad óptica (D.O), o absorbancia. Para los inóculos se utilizó una concentración de 1×10^8 UFC/mL (UFC: unidades formadoras de colonias), equivalente a una densidad óptica de 600 nm a 1 (D.O600 = 1,0). Para ello las cepas bacterianas puras fueron sembradas en 25 mL de caldo nutritivo, y transcurridas 6 horas se empezaron a realizar mediciones cada 3 horas, una vez la colonia alcanzaba la concentración deseada se guardó en la nevera y cuando todas las cepas estuvieron listas, se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se descartó y al pellet se le adiciono una cantidad igual del sobrenadante descartado de solución salina al 0.9%.

- 4.2** inoculación: Se inocularon dos plantas sanas por cada microorganismo a evaluar; Se empleó el método de punción, que consiste en inocular con ayuda de una jeringa el inoculo en hojas, tallo y raíz, incluyendo el sustrato (suelo), los testigos

fueron inoculados con ADE. Finalizado el proceso las plantas se cubrieron con bolsas plásticas durante 24 horas con el propósito de crear un microclima favorable para el (los) patógeno (s).

4.3 Evaluación: Las plantas inoculadas se evaluaron a los 7, 14 y 21 días, para determinar la presencia o ausencia de síntomas.

4.4 Reaislamiento de microorganismos inoculados: se tomó tejido vegetal de las plantas que presentaron algún tipo de daño y se procedió a aislar y purificar los microorganismos y determinar las características macro y microscópicas, con el propósito de verificar si coincidían con las del microorganismo inoculado, confirmando de esta forma su carácter fitopatógeno.

5. Prueba de antagonismo *In vitro*

A los microorganismos que se determinaron fitopatógenos, se les sometió a una prueba de antagonismo mediante enfrentamientos con los microorganismos antagonistas *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*, ingredientes activos de los productos comerciales Trichox y Bactox respectivamente, proporcionados por semillas del Valle.

5.1. Bacterias fitopatógenas contra *Bacillus subtilis*: se sembraron en 15 mL de caldo

nutritivo las bacterias patógenas y antagonista, transcurridas 24 horas en AN se dispersaron con ayuda de perlas de vidrio estériles 100 µL de suspensión de la bacteria fitopatógena y en el centro de la caja de petri se depositó un disco de papel filtro de 5 mm de diámetro impregnado con 15 µL de la bacteria antagonista, se utilizó como control 15 µL de ampicilina a una concentración de 50 µg/ µL impregnada en un disco. Se revisó a las 24 horas, evaluando la formación o no de un halo inhibitorio y su diámetro, se emplearon tres replicas por bacteria patógena.

5.2. Bacterias fitopatógenas contra *Trichoderma harzianum*: sembró en el centro de la caja petri con AN el hongo antagonista y transcurridas 48 horas se sembró a cada lado y a una distancia de 3 cm del centro de la caja, una línea de la bacteria fitopatógena. La revisión se hizo a las 24, 48 y 72 horas, evaluando el crecimiento del hongo antagonista y del patógeno, se emplearon tres replicas por bacteria patógena.

5.3. Hongos patógenos contra *Bacillus subtilis*: se sembró en el centro de la caja Petri con AN el hongo patógeno y transcurridas de 48 a 72 horas dependiendo la velocidad de crecimiento de los fitopatogenos se procedió a sembrar a cada lado una línea de *Bacillus subtilis*. Las revisiones se

realizaron a las 24, 48 y 72 horas, evaluando el crecimiento del hongo patógeno y de la bacteria antagonista, se utilizaron tres replicas por hongo patógeno y un control.

5.4. Hongos patógenos contra *Trichoderma harzianum*: se emplearon cultivos duales, se sembró en un extremo de la caja Petri con PDA el hongo patógeno y transcurridas 24 a 48 horas de la siembra dependiendo la velocidad de crecimiento de los fitopatógenos se procedió a sembrar el hongo antagonista en el otro extremo de la caja Petri. Se utilizaron tres replicas por hongo fitopatógeno y un control sin hongo antagonista. Las revisiones se hicieron a los 3, 5, 7 y 15 días de sembrado el antagonista, midiendo el área del micelio del patógeno en enfrentamiento. El área se calculó con el programa Image J1.45 disponible en la red y se evaluó el antagonismo mediante dos mecanismos:

A) Evaluación del efecto antibiótico mediante el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) a los siete días, empleando la fórmula de Ezziyyani *et al.* (2004), $PICR = ((R1 - R2)/R1) * 100$, donde R1 es la cobertura del patógeno testigo y R2 es la cobertura del patógeno en enfrentamiento.

B) Competencia por sustrato mediante la escala

de clases de Bell *et al.* (1982), donde 1= *Trichoderma* coloniza el 100% de la superficie del medio y crece sobre el fitopatógeno; 2= *Trichoderma* coloniza dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y limita el crecimiento del fitopatógeno; 3= *Trichoderma* y el fitopatógeno colonizan cada uno la mitad de la superficie, ningún hongo domina; 4= El fitopatógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio y limita el crecimiento de *Trichoderma*; y 5= El fitopatógeno coloniza el 100% de la superficie del medio y crece sobre *Trichoderma*.

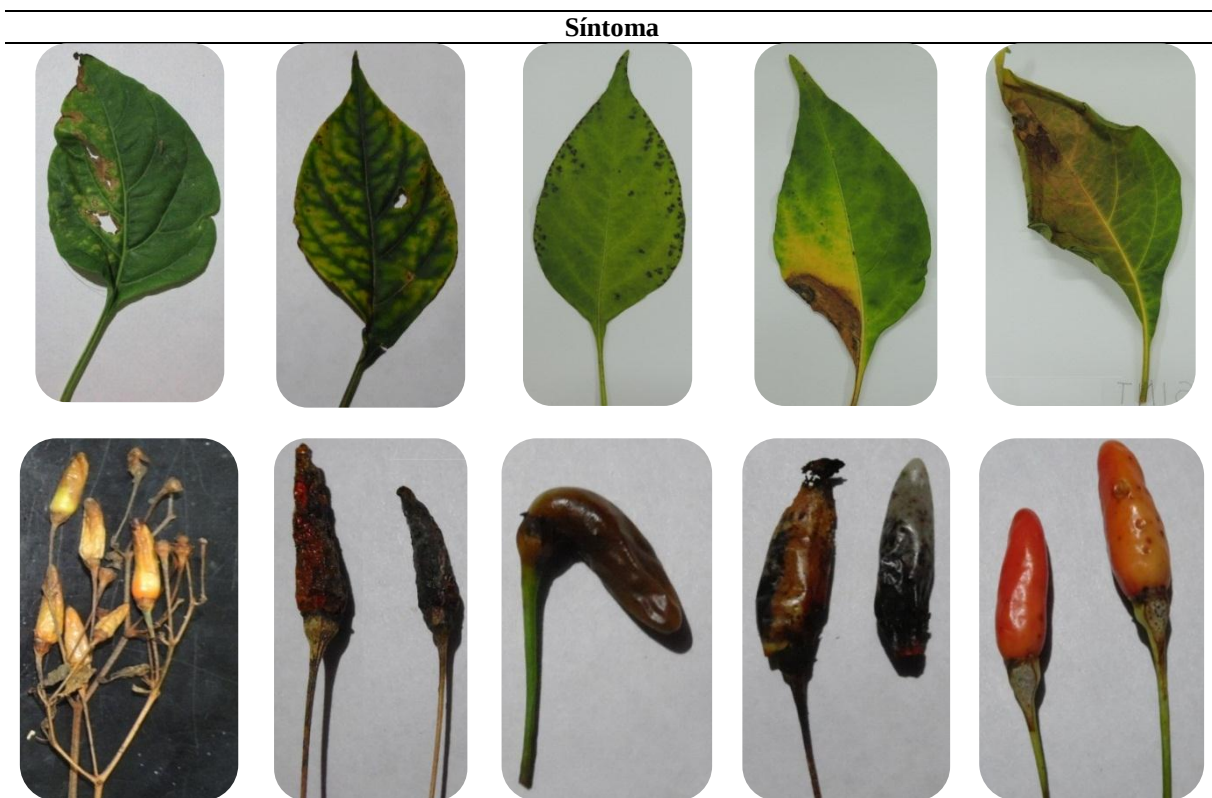
RESULTADOS

La incidencia y severidad se determinó para cada módulo evaluado en los tres muestreos realizados. En el primer muestreo se determinó la incidencia para M2, M4, M7 Y M8 siendo de 15, 20, 24 y 25% respectivamente, con una severidad escala uno en los cuatro casos. En el segundo muestreo se presentó una incidencia de 18, 30, 31 y 36% en los módulos M2, M4, M7 Y M8 respectivamente y una severidad en la escala descriptiva de dos para M2, M4, M7 y tres para M8. En el tercer muestreo se presentó la mayor incidencia con valores de 96 y 97% para los módulos M2 y M4 y del 100% para los módulos M7 y M8. La severidad fue escala cinco en los cuatro módulos

evaluados, el aumento de la incidencia y severidad deja en evidencia la baja eficiencia de los métodos de control químicos empleados. en la tabla 1 se muestran

los síntomas causados por los microorganismos patógenos a planta de ají tabasco en el cultivo.

Tabla 1. Sintomatología presentada en los tres muestreos realizados a plantas de *Capsicum frutescens*, donde se observa daño del tejido en hojas, peciolo, tallos y frutos.

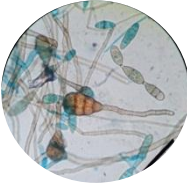
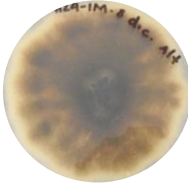
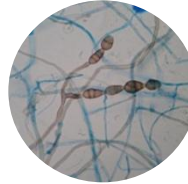
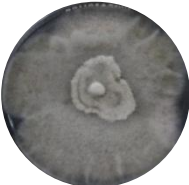
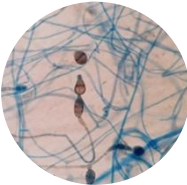
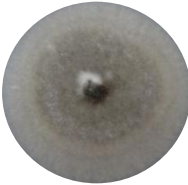
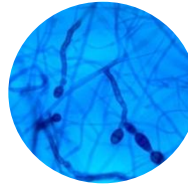
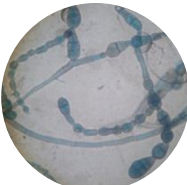
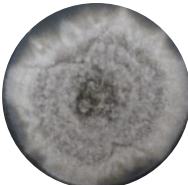
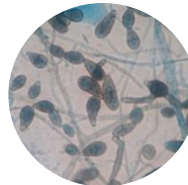
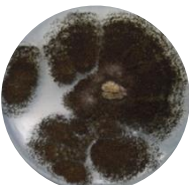
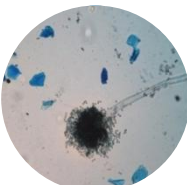
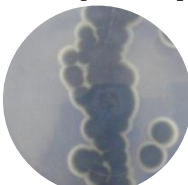
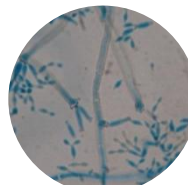
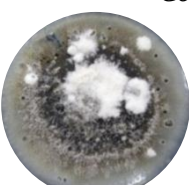
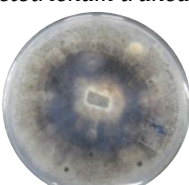
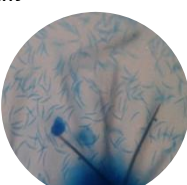
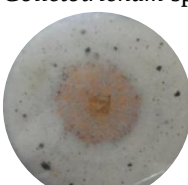
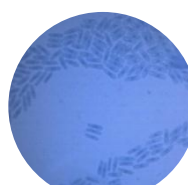
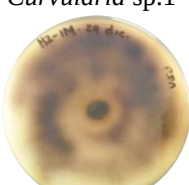
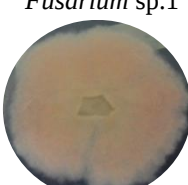


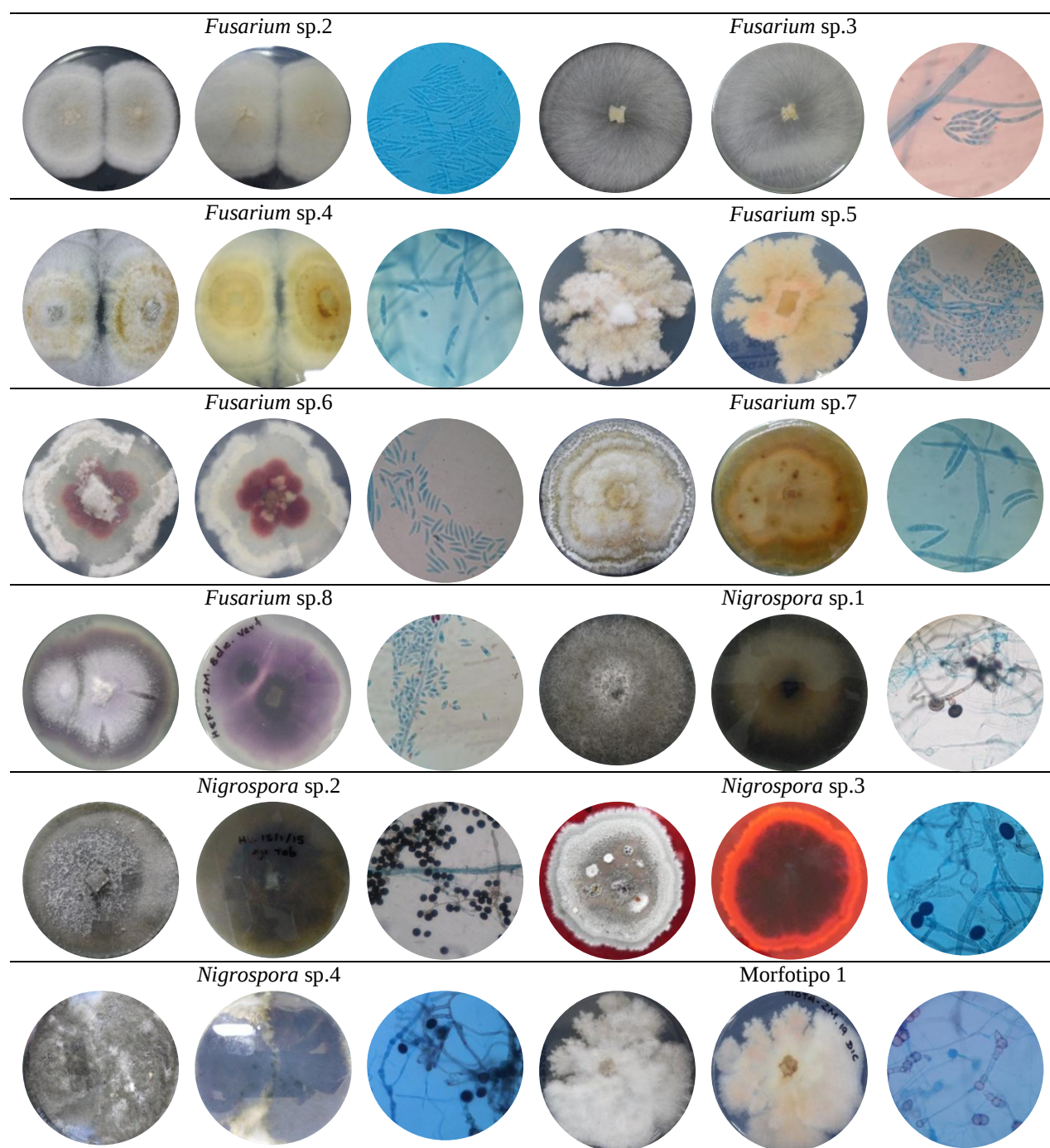
En la tabla 2 se muestran los microorganismos fúngicos aislados e identificados de los tres muestreos realizados a la plantación de ají tabasco (*Capsicum frutescens*) en Guacari – Valle del Cauca. Los hongos identificados comprenden 6 especies pertenecientes al género *Alternaria*, 8 especies al género *Fusarium*, 4 especies al género *Nigrospora*, 2 especies al género *Curvularia*, *Aspergillus* sp,

Cladosporium sp., *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum* sp., *Exserohilum* sp., y 2 morfotipos no identificados.

Los microorganismos fúngicos y bacterianos identificados fueron inoculados en plantas de ají tabasco con el fin de determinar si presentaban carácter patógeno.

Tabla 2. Hongos identificados de los tres muestreos realizados a plantas de *Capsicum frutescens* en Guacari (Valle del cauca). Izq. (visión macroscópica del anverso de la colonia), centro (visión macroscópica del reverso de la colonia), der. (visión microscópica de las estructuras somáticas y reproductivas de la colonia).

<i>Alternaria sp.1</i>			<i>Alternaria sp.2</i>		
					
<i>Alternaria sp.3</i>			<i>Alternaria sp.4</i>		
					
<i>Alternaria sp.5</i>			<i>Alternaria sp.6</i>		
					
<i>Aspergillus sp.</i>			<i>Cladosporium sp.</i>		
					
<i>Colletotrichum truncatum</i>			<i>Colletotrichum sp.</i>		
					
<i>Curvularia sp.1</i>			<i>Curvularia sp.2</i>		
					
<i>Exserohilum sp.</i>			<i>Fusarium sp.1</i>		
					



En la tabla 3 se muestran los síntomas que ocasionaron los microorganismos que dieron positiva la prueba de patogenicidad, lo que implicó observación de síntomas y reisolamiento del microorganismo inoculado, estos microorganismos

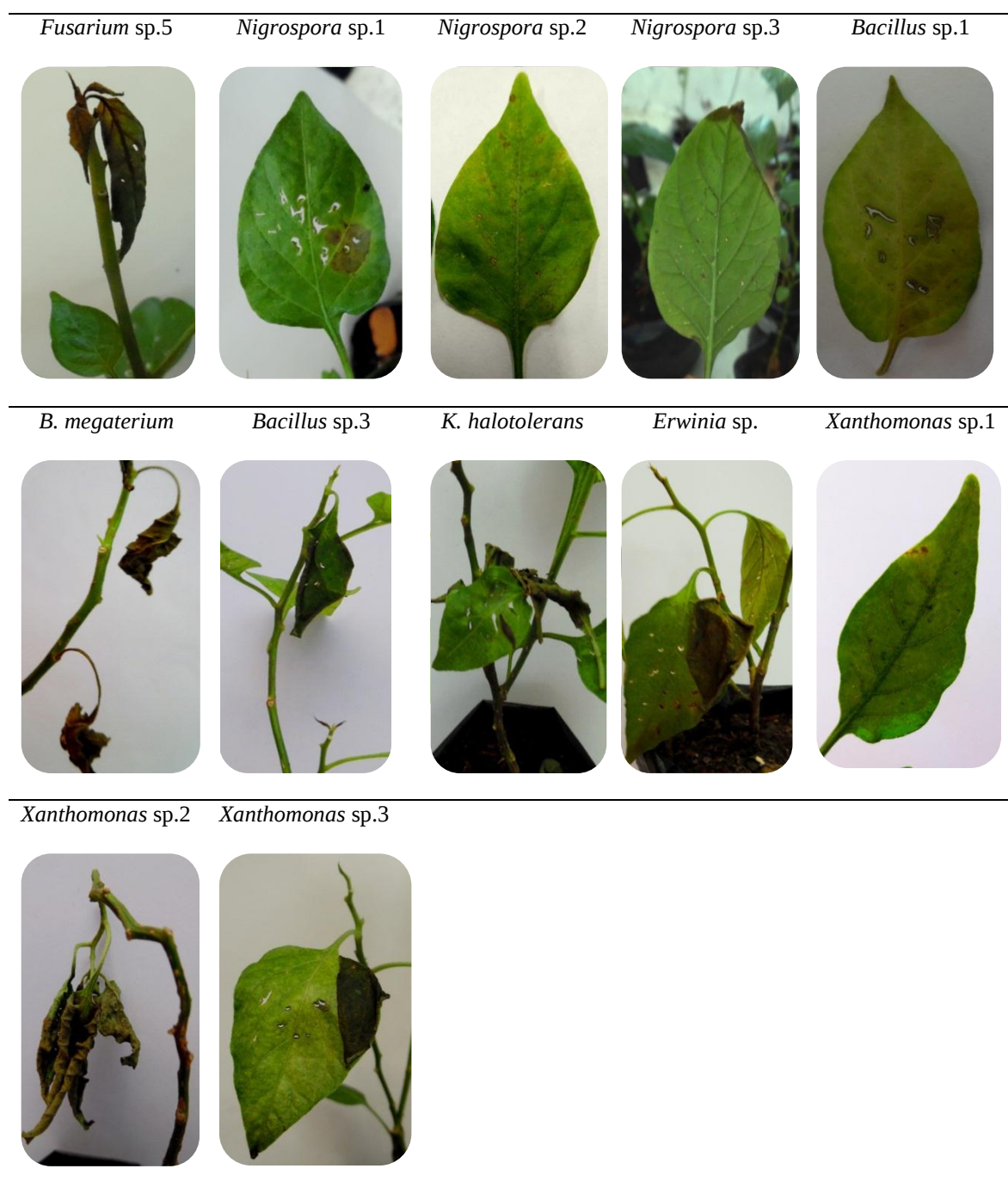
fueron: hongos *Alternaria* sp. 2, *Alternaria* sp. 3, *Alternaria* sp. 4, *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp.1, *Curvularia* sp.2, *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp.1, *Fusarium* sp.4, *Fusarium* sp.5, *Nigrospora* sp.1, *Nigrospora* sp.2 y

Nigrospora sp.3; bacterias *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp.1, *Bacillus* sp.3, *Kocuria halotolerans*, *Erwinia* sp., *Xanthomonas* sp.1, *Xanthomonas* sp.2 y *Xanthomonas* sp.3. Los microorganismos que ocasionaron en las plántulas el mayor grado de severidad fueron *Colletotrichum truncatum*, *Bacillus megaterium*, *Kocuria halotolerans* y *Xanthomonas* sp. 2.

En la tabla 4 se muestran las características culturales, morfológicas y tinción de Gram, de las bacterias aisladas y purificadas. Las bacterias patógenas identificadas comprenden 3 especies pertenecientes al género *Xanthomonas*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp.1, *Bacillus* sp.3, *Kocuria halotolerans* y *Erwinia* sp.

Tabla 3. Síntomas presentados en plántulas de *Capsicum frutescens* inoculadas con los microorganismos fúngicos y bacterianos, positivos para la prueba de patogenicidad.

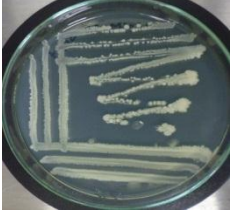
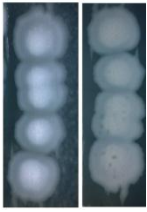
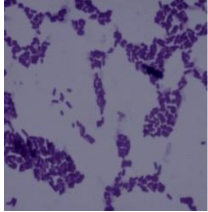
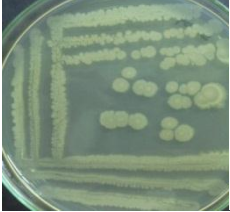
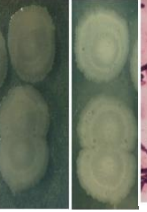
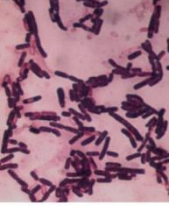
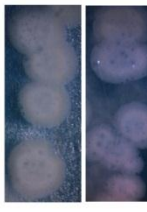
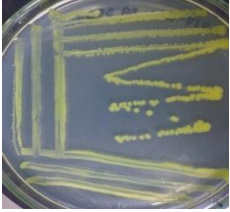
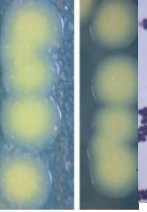
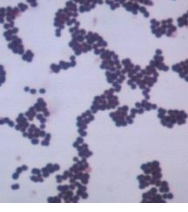
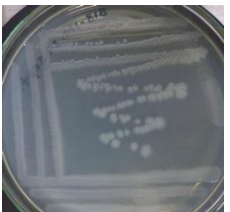
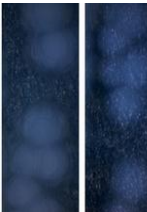
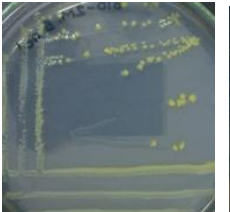
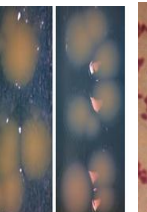
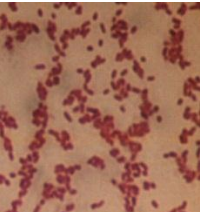
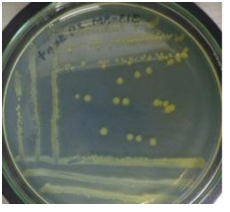
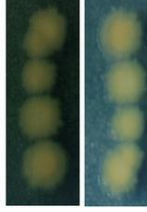
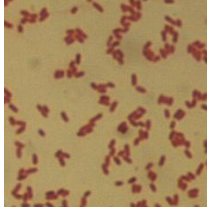
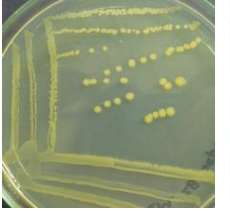
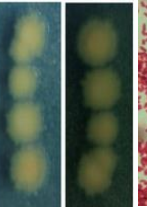
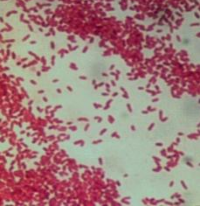
<i>Alternaria</i> sp. 2	<i>Alternaria</i> sp. 3	<i>Alternaria</i> sp. 4	<i>C. truncatum</i>	<i>Colletotrihium</i> sp.
				
<i>Curvularia</i> sp.1	<i>Curvularia</i> sp.2	<i>Exserohilum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.1	<i>Fusarium</i> sp.4
				



Molecularmente se confirmó la identificación hecha mediante el esquema de Schaad para el caso de las bacterias y las claves dicotómicas en el caso de los hongos, de los microorganismos que mostraron la

mayor severidad de acuerdo a las pruebas de patogenicidad. Los arboles de filogenia obtenidos se muestran en las figuras 1, 2 y 3.

Tabla 4. Bacterias patógenas identificadas de los tres muestreos realizados a plantas de *Capsicum frutescens*. Izq. (visión macroscópica), centro (visión estereoscópica del anverso y reverso de la colonia), der. (tinción de Gram).

<i>Bacillus</i> sp.1			<i>Bacillus megaterium</i>		
					
<i>Bacillus</i> sp.3			<i>Kocuria halotolerans</i>		
					
<i>Erwinia</i> sp.			<i>Xanthomonas</i> sp.1		
					
<i>Xanthomonas</i> sp.2			<i>Xanthomonas</i> sp.3		
					

Al evaluar el efecto antagonista de *Bacillus subtilis* contra los hongos patógenos, se encontraron cuatro comportamientos (Tabla 5): ausencia de inhibición; efecto fungistático, con crecimiento vertical y posterior restablecimiento del crecimiento horizontal;

efecto fungistático, con crecimiento vertical; y efecto fungistático, con detención y no restablecimiento del crecimiento. El primer comportamiento, es decir donde *Bacillus subtilis* no cumplió una función fungistática o fungicida, se presentó con el hongo

Nigrospora sp.2. En el segundo comportamiento, los patógenos suspendían el crecimiento en la zona que entraba en contacto con la bacteria (crecimiento horizontal), sin embargo lo continuaban en las zonas que no entraban en contacto (crecimiento vertical), y

una vez la bacteria entraba a la fase de muerte, los patógenos retomaban el crecimiento horizontal, este comportamiento se presentó en *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp.4, *Fusarium* sp.5.

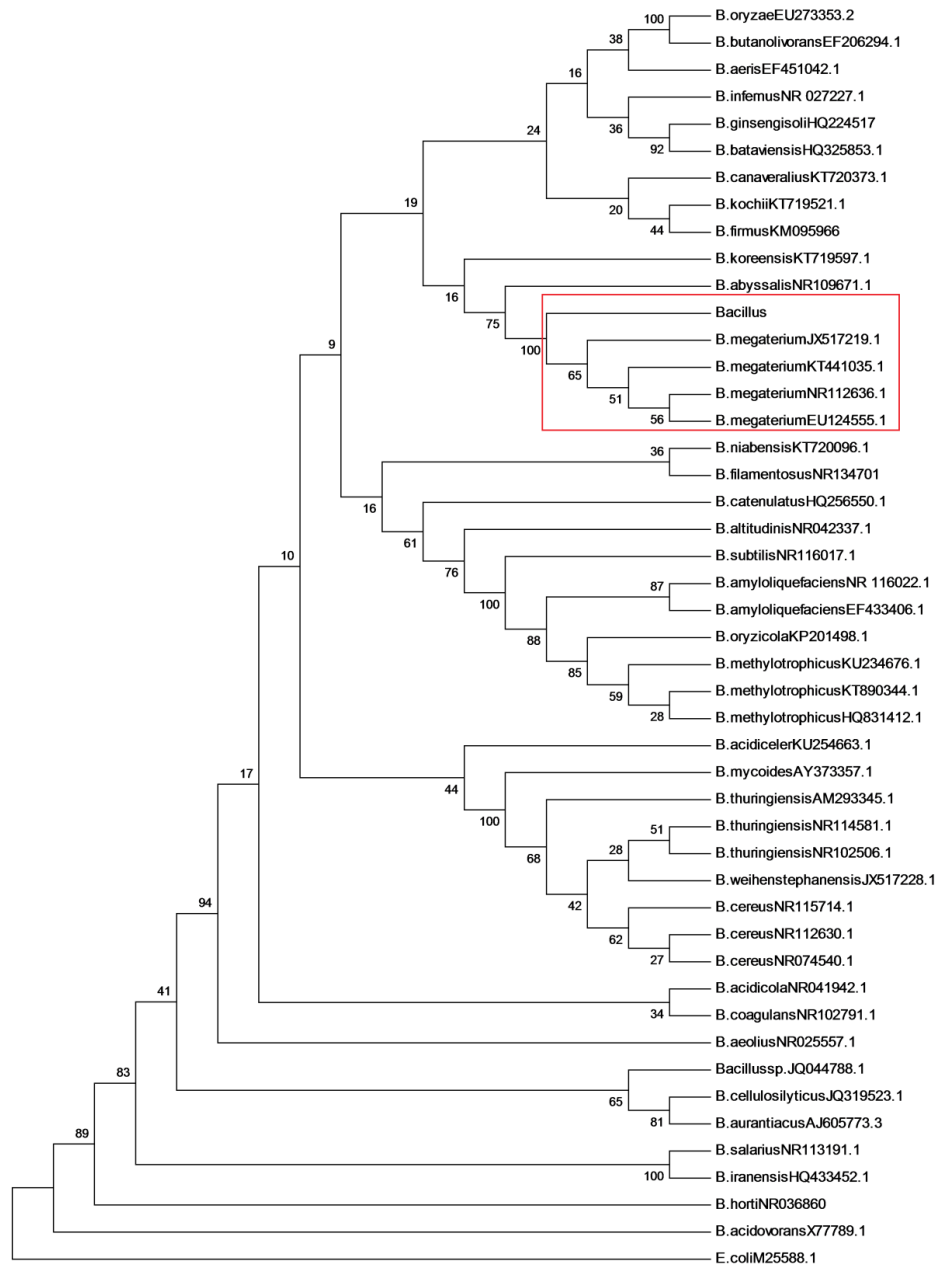


Figura 2. Árbol filogenético de *Bacillus megaterium* basado en un fragmento del 16S rRNA utilizando el método de inferencia de máxima parsimonia, generado por MEGA 6.

El tercer comportamiento parecido al anterior, pero sin restablecimiento del crecimiento horizontal, se presentó en *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp.1, *Curvularia* sp.2, *Fusarium* sp.1, *Nigrospora* sp.1 y *Nigrospora* sp.3.

El cuarto comportamiento, donde *Bacillus subtilis* detuvo el crecimiento horizontal y vertical del patógeno, sin restablecimiento de ninguno de ellos, por tanto donde se presentó el mayor efecto inhibitorio ocurrió con el género *Alternaria*.

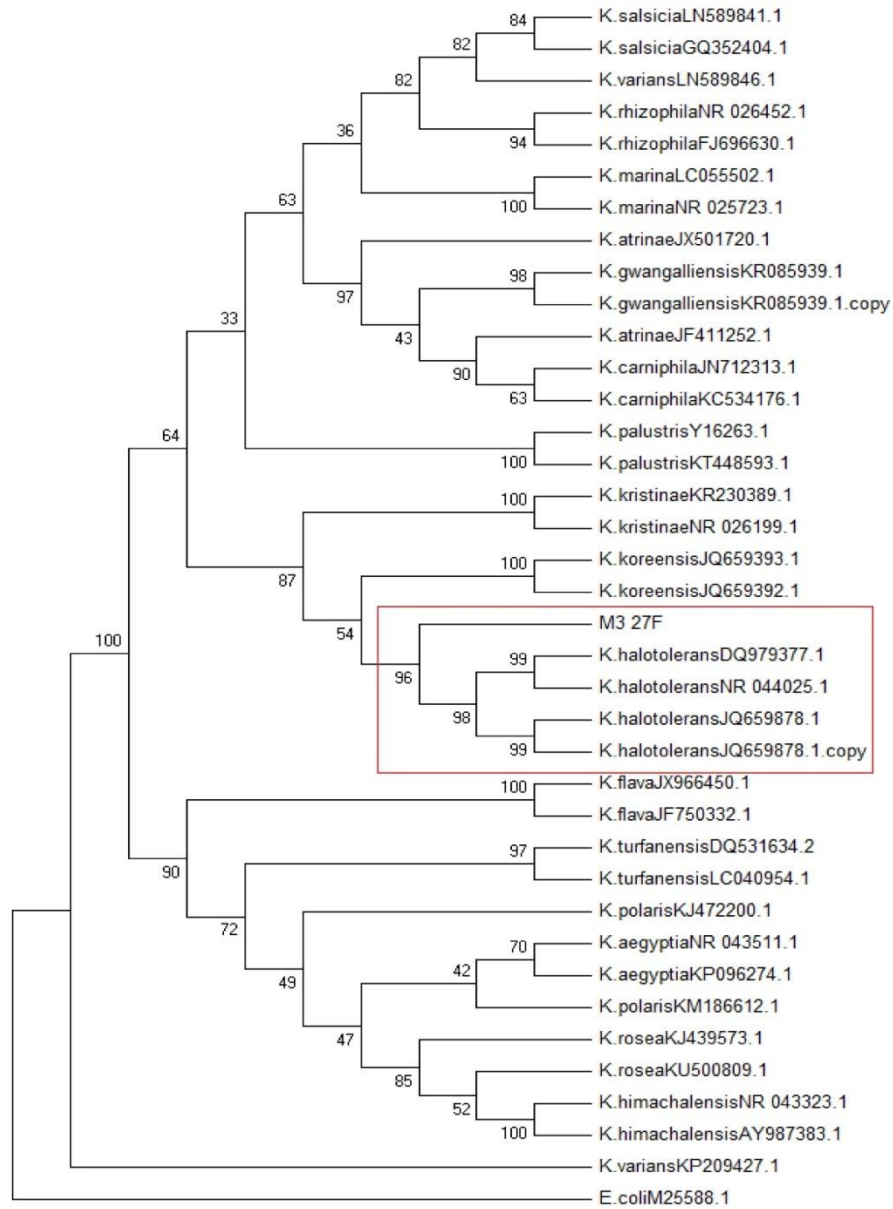


Figura 2. Árbol filogenético de *Kocuria halotolerans* basado en un fragmento del 16S rRNA utilizando el método de inferencia de máxima parsimonia, generado por MEGA 6.

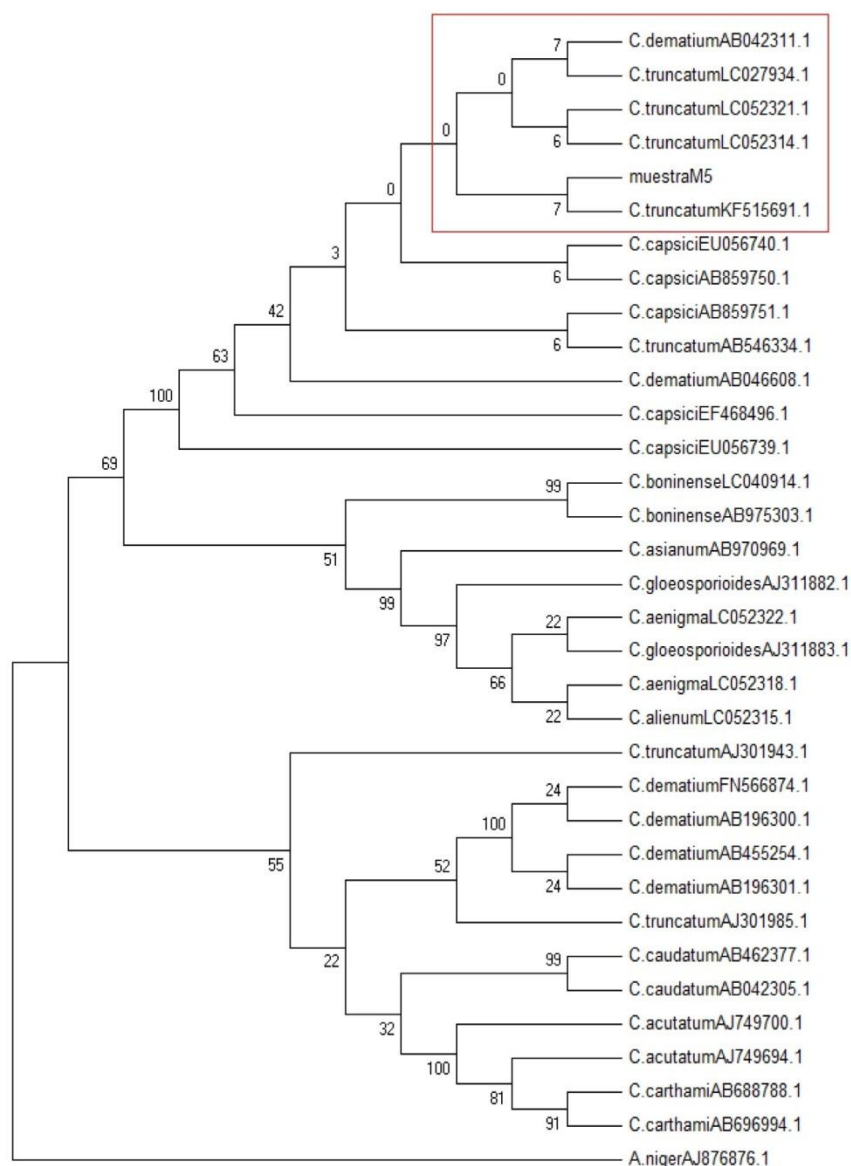


Figura 3. Árbol filogenético de *Colletotrichum truncatum* basado en una secuencia de nucleótidos utilizando el método de inferencia de máxima parsimonia, generado por MEGA 6.

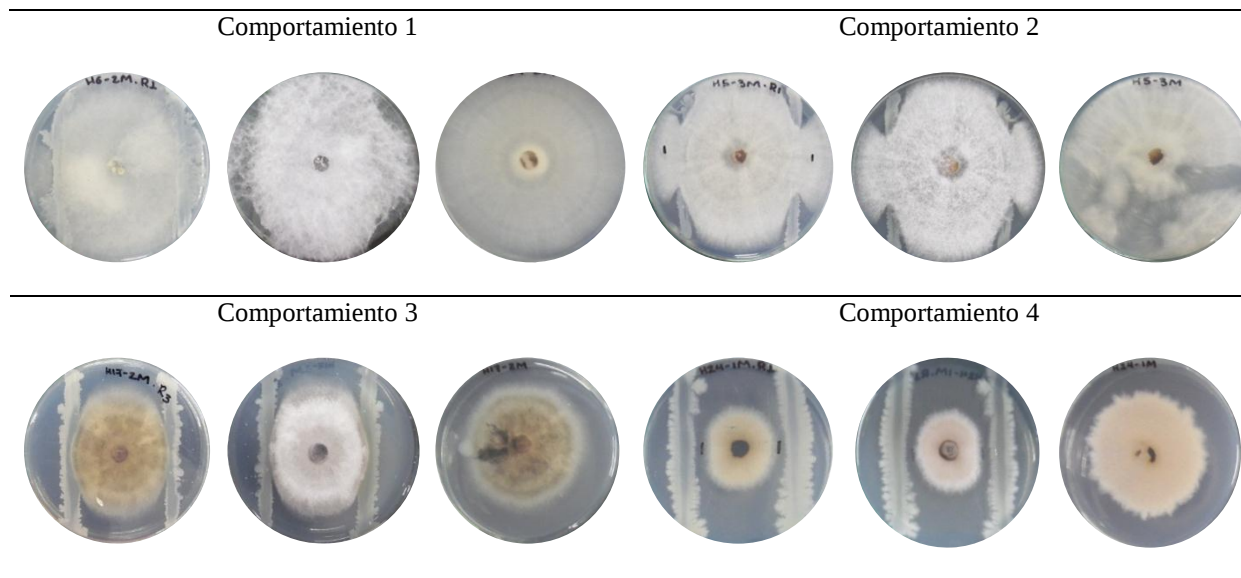
En el establecimiento de cultivos duales con el objetivo de evaluar el efecto inhibitorio del hongo antagonista *Trichoderma harzianum* contra los hongos patógenos, se encontró según el PCIR que *Trichoderma harzianum* es un buen controlador biológico *In vitro*, excepto para los hongos *Colletotrichum* sp y *Curvularia* sp.1 con porcentajes

de inhibición de 19,3 y 28,8% respectivamente, en comparación a las demás especies estudiadas donde se obtuvieron porcentajes de inhibición superiores al 50%. Las especies donde se presentó el mayor efecto inhibitorio fueron *Colletotrichum truncatum* y *Fusarium* sp.1 (Figura 4), con porcentajes de inhibición de 84,1 y 74,6% respectivamente. Según la

escala de clases, el antagonista en la mayoría de los casos creció y esporuló sobre el patógeno, escala 1: genero *Alternaria*, *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp.2, *Fusarium* sp.1, *Fusarium* sp.5, *Nigrospora* sp.1, *Nigrospora* sp.2. Ambos hongos se establecieron, ocupando la mitad del medio, sin evidencia de dominancia de uno sobre el otro, escala 3: *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp.4, *Nigrospora* sp.1. Finalmente *Curvularia* sp.1 fue la

única especie que predominó sobre el antagonista, presentando escala 4. Lo anterior indica que el uso de varios métodos para evaluar el efecto inhibitorio mediante el uso de cultivos duales es de gran utilidad, ya que no solo es necesario conocer en qué porcentaje ocurre la inhibición, sino a través de que mecanismo se desarrolla, lo que permite inferir sobre la efectividad de este.

Tabla 5. Efecto antagonista de *Bacillus subtilis* frente a los hongos patógenos de *Capsicum frutescens*. Imágenes tomadas a las 72 horas de sembrada la bacteria antagonista. Izq (reverso del enfrentamiento), centro (anverso del enfrentamiento), der. (Control). Los números al final de cada descripción indican el diámetro promedio en Cm del hongo patógeno a las 24, 48 y 72 horas.



Al evaluar el efecto antagonista de *Bacillus subtilis* contra las bacterias patógenas, se encontraron 4 patrones: ausencia de halo; crecimiento de *Bacillus*

subtilis sobre el hongo patógeno; formación de halo ≤ 1 mm y formación de halo ≥ 1 mm. El primer patrón lo presento *Bacillus megaterium*, donde no se

observó el crecimiento de la bacteria antagonica. En el segundo patrón se desarrollaron ambos microorganismos y fue presentado por las bacterias del género *Xanthomonas*. En los patrones tres y cuatro, se observó efecto inhibitorio siendo los halos del patrón 3 los más pequeños, observados en *Bacillus* sp.1 y *Erwinia* sp; los halos con el mayor diámetro se presentaron en las bacterias *Bacillus* sp. 3 y *Kocuria halotolerans*, siendo *Bacillus subtilis* una buena alternativa *In vitro* para el control de estos 2

microorganismos patógenos.

En cuanto al efecto antagonista de *Trichoderma harzianum* contra las bacterias patógenas, se encontró que en todos los casos el hongo antagonista creció sobre la bacteria patógena, impidiendo su desarrollo, siendo más evidente para los géneros *Erwinia* y *Xanthomonas* en donde se presentó un menor desarrollo bacteriano en el área donde crecía el hongo patógeno.

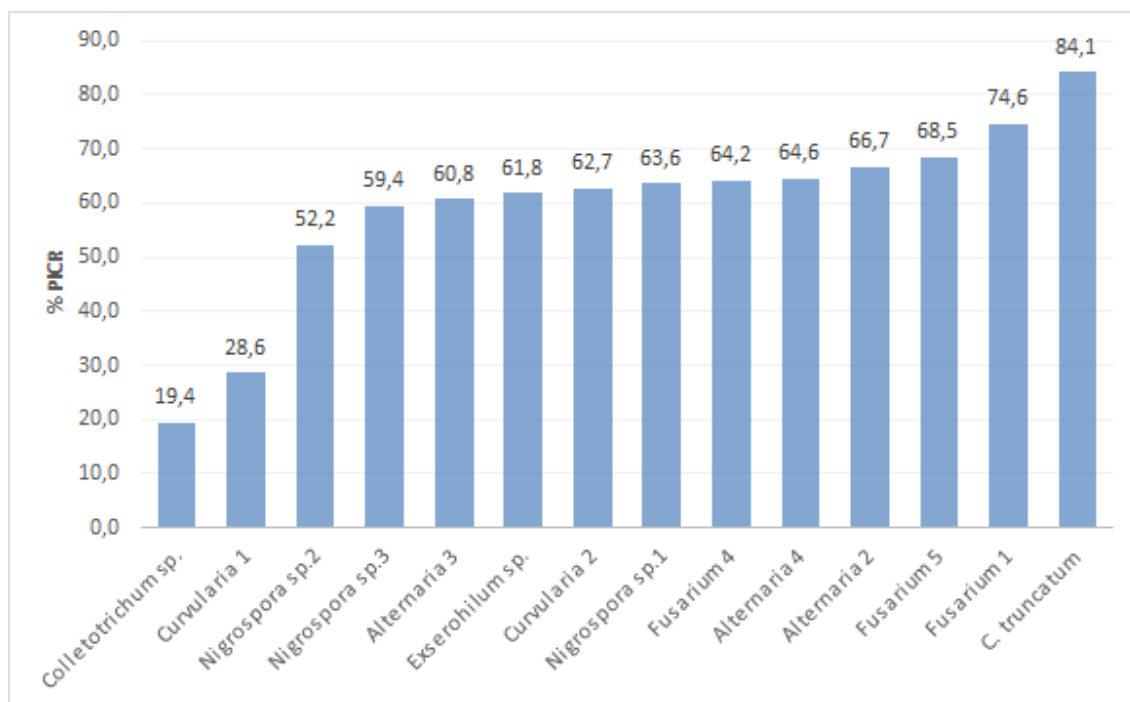


Figura 4. Valores del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) en los hongos patógenos de *Capsicum frutescens* ocasionado por el antagonista *Trichoderma harzianum*, transcurridos 7 días de la siembra del hongo antagonista.

DISCUSIÓN

Los hongos aislados e identificados, provenientes de la plantación de *Capsicum frutescens*, han sido reportados en la literatura como microorganismos patógenos en plantas, siendo algunos géneros reconocidos por su carácter agresivo y devastador. Entre las enfermedades de mayor importancia económica para el género *Capsicum* se encuentra la comúnmente llamada tizón, causada por *Alternaria* spp. puesto que afecta negativamente el rendimiento y la calidad, sintomatológicamente la enfermedad se caracteriza por presentar tizones de color oscuro con presencia de anillos concéntricos (Avelar *et al.* 2011), observados en campo (figura 1, patrones 4 y 5). El género *Colletotrichum*, causante de la antracnosis, es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, con un amplio rango de hospederos (Than *et al.* 2008). Constituye un serio problema para la producción de *Capsicum* sp. en los trópicos y subtropicos, siendo los fungicidas el principal método de control, lo que implica un alto costo y un gran riesgo ambiental (Montri *et al.* 2009). *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, y *C. acutatum* han sido reportados como los patógenos más importantes causantes de la antracnosis en *Capsicum* (Diao *et al.* 2014), sin embargo es esta investigación se observó que *Colletotrichum truncatum* fue aislado de las muestras que

presentaron los niveles más altos de severidad en campo, afectando tallos, hojas y frutos (figura 1, patrón 6), lo que deja en evidencia la agresividad del género. Por otra parte *Colletotrichum* sp. se aisló de muestras que mostraban síntomas muy severos, frutos dañados (figura 1, patrón 7 y 8), conllevando ambas especies a una reducción drástica del rendimiento.

El género *Fusarium* ocasiona en las plantas marchitez generalizada acompañada de clorosis, y pudrición de la raíz, en *Capsicum annuum* se han reportado pérdidas en rendimiento de hasta un 100%, por tanto se han probado métodos de control cultural, químico, genético y biológico, con resultados variables pero en general exitosos, dependiendo las condiciones del cultivo, genotipos del cultivo, del patógeno involucrado, características del suelo entre otros factores (Lozano *et al.* 2014). Una de las dificultades que presenta este patógeno para su control es la producción de clamidosporas, sobreviviendo en el suelo por largos periodos de tiempo (Wua *et al.* 2015), motivo por el que probablemente fue el género del cual se aislaron el mayor número de especies. En campo se observó marchitamiento junto con chancros y tizones, debido a que la sintomatología estaba siendo ocasionada por varios microorganismos patógenos, los síntomas característicos causados por *Fusarium* spp. se

observaron en las pruebas de patogenicidad (figura 3) donde se observó marchitamiento de las hojas más jóvenes. El género *Nigrospora* infecta a nivel mundial un gran número de especies, incluyendo *Aloe vera*, *Brassica juncea*, *Gossypium hirsutum*, *Oryza sativa*, *Poa pratensis*, *Sorghum* sp., entre otros (Zhong *et al.* 2016). En general ataca el tallo y semilla de las monocotiledóneas, ocasionando necrosis en los tallos y afectando la germinación de la semilla (Avelar *et al.* 2011). En campo se observó ocasionando necrosis en las hojas, pero con una incidencia y severidad muy bajas.

El género *Curvularia* incluye especies saprofitas, endófitas y patógenas, siendo en su mayoría patógenos destructivos que causan enormes pérdidas en el sector agrícola, se caracteriza por ocasionar mancha foliares. Se ha reportado como patógeno en la familia Poaceae, incluido *Oryza sativa* (Kusai *et al.* 2015), en la familia Solanaceae, se reportado recientemente como patógeno de *Lycopersicum esculentum* en Pakistan (Iftikhar *et al.* 2015), sin embargo hasta el momento no ha sido reportado como patógeno para el género *capsicum*, en esta investigación se aislaron dos especies patógenas de *Curvularia*, causando manchas foliares, seguida de enrollamiento y posterior defoliación (Tabla 3). *Exserohilum* sp. causa manchas foliares en gramíneas, y es un patógeno oportunista en humanos

que puede extenderse al sistema nervioso central, causar micosis cutáneas y subcutáneas. Se ha encontrado afectando más de 30 especies, incluyendo cultivos de importancia comercial como *Lycopersicum esculentum*, *Oryza sativa*, *Saccharum officinarum*, *Sorghum* sp., *Zea mays* (Ahmadpour *et al.* 2012), hasta la actualidad no ha sido reportado como patógeno para el género *capsicum*, en esta investigación se encontró ocasionando manchas foliares (Tabla 3). Los géneros *Curvularia* y *Exserohilum* afirma Pratt (2006) afectan principalmente gramíneas, pero también pueden infectar dicotiledóneas, causan principalmente manchas foliares y tizones, pero la infección puede extenderse a las raíces, estolones y rizomas causando pudrición de la raíz y muerte descendente.

Dos géneros que no dieron positiva la prueba de patogenicidad fueron *Aspergillus* sp. y *Cladosporium* sp.. El género *Aspergillus* es considerado un hongo saprofito en campo, llegando a tornarse peligroso en almacenes donde ataca granos, cuando el contenido de humedad es ligeramente mayor a lo normal, ocasionando la aparición de micelio negro, seguido de la pudrición del grano (Avelar *et al.* 2011). *Cladosporium* es un género cosmopolita, aislado frecuentemente del suelo, alimentos, pintura, textiles y otra materia orgánica, también son invasores secundarios en lesiones en hojas causadas por hongos

patógenos (Bensch *et al.* 2012). Lo anterior evidencia el carácter oportunista de los dos géneros, sin que ello implique la presencia de genes de virulencia como si ocurre con otros géneros patógenos, que se pueden tornan agresivos como los géneros *Alternaria* y *Colletotrichum*. Aunque los géneros *Alternaria*, *Fusarium* y *Nigrospora* son reconocidos por su carácter patógeno, al ser inoculados no todas las especies evaluadas ocasionaron síntomas en las plántulas. *Nigrospora* sp. es considerado un patógeno débil, atacando plantas susceptibles, en la mayoría de los casos se encuentra como saprofita. El género *Alternaria* es cosmopolita y agrupa múltiples especies patógenas y saprofitas (Woudenberg *et al.* 2015), por lo que no todas las especies de estos géneros presentan carácter patógeno.

Además de los microorganismos fúngicos se encontraron cuatro géneros de bacterias causando enfermedades detrimenales en la plantación, hecho de gran importancia debido a la severidad observada. Varias especies de *Bacillus* son reconocidos por la acción antagonista que presentan contrarrestando el desarrollo de hongos patógenos debido a la producción de antibióticos (Malaniquiva *et al.* 2012). *Bacillus megaterium* encapsulado en microcapsulas de alginato de calcio fue empleado por Wiwattanapatapee *et al.* (2013) para controlar *Rhizoctonia solani*, agente causal del tizón de la

vaina en el arroz, observando a nivel de invernadero una inhibición en el crecimiento del micelio hasta de un 99%. En invernadero se observó la bacteria causando marchitamiento y defoliación total (Tabla 3), siendo en campo uno de los microorganismos aislados con mayor frecuencia y en los patrones que presentaban los mayores índices de severidad, este comportamiento patógeno de la bacteria en *C. frutescens*, se debe probablemente a que dentro de algunas especies reportadas como antagonistas se presentan grupos con carácter patógeno como lo afirma Peng *et al.* (2013), donde grupos de *Bacillus subtilis* como *B. pumilus* y *B. circulans* han sido reportados causando enfermedades en palmas de dátiles a nivel de invernadero, o el caso de *B. megaterium* pv. *cerealis* causante de la mancha blanca en trigo. Las especies del género *Kocuria* han sido aisladas de piel de mamíferos, suelo, rizoplano, agua dulce, sedimentos marinos y suelos de desiertos (Tang *et al.* 2009), *K. halotolerans* no ha sido reportada como causante de enfermedades en el género *Capsicum*, siendo esta investigación el primer reporte de la bacteria como agente causal de manchas cloróticas y marchitamiento en *C. frutescens*.

El género *Erwinia* es reconocido por su carácter patógeno, presente en todas las especies, una especie reconocida es *Erwinia carotovora*, causante de

podriciones blandas, marchitamiento y muerte en *Capsicum*. Con pérdidas de hasta un 60% de la plantación como lo reportan García et al. (2000) en un cultivo de *Capsicum annuum* en el estado de Sinaloa. Los síntomas observados en campo coinciden con los reportados en la literatura, ya que la bacteria en invernadero causo marchitamiento, perdida de vigor y defoliación (Tabla 3). El género *Xanthomonas* incluye especies de gran importancia económica como el caso de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, causante de la mancha bacteriana. La enfermedad es una de las más destructivas en invernadero y en campo para el género *Capsicum*, sintomatológicamente se presentan manchas foliares angulares con un halo clorótico en las hojas, que posteriormente se rasgan. En frutos son parecidos a una ampolla, con manchas irregulares necróticas (Sahin & Miller 1998 y Mirik et al. 2007).

En las pruebas de antagonismo realizadas con los microorganismos *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum*, para los hongos patógenos se encontró que *B. subtilis* inhibió satisfactoriamente el crecimiento de los hongos del genero *Alternaria*, y por el contrario no inhibió significativamente el crecimiento de los patógenos *Nigrospora* sp. 2, *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp.4, *Fusarium* sp.5 (Tabla 6). En cuanto a las bacterias patógenas solo se presentó un halo inhibitorio en *Bacillus* sp. 3 y

Kocuria halotolerans (Tabla 8). Varias especies de *Bacillus* producen toxinas que inhiben el crecimiento y/o la actividad de hongos patógenos (McSpadden 2004).

T. harzianum invadió y creció encima de todas las bacterias patógenas (Tabla 9), limitando su desarrollo, siendo un buen candidato para evaluar a nivel de invernadero y posteriormente en campo. Con respecto a los hongos patógenos (Tabla 7) se encontraron PICR superiores al 50%, excepto para *Colletotrichum* sp. y *Curvularia* sp.1 con PICR de 19,3 y 28,8% respectivamente, los mayores PICR los presentaron *Colletotrichum truncatum* y *Fusarium* sp.1 con 84,1 y 74,6% respectivamente, en cuanto a las escalas de clases, en la mayoría de los casos fue escala uno, donde *T. harzianum* creció y esporuló sobre el hongo patógeno, solo *Curvularia* sp.1 domino sobre el antagonista. *Trichoderma harzianum* fue el antagonista que presento los mayores porcentajes de inhibición, la eficiencia de esta especie radica según Calvo et al. (2012) en la producción de los antibióticos peptaibol, trichozianinas A1 y A2, logrando inhibir la germinación de esporas y la elongación de las hifas de las especies patógenas. Rey et al. (2000) citado por Torres et al. (2008) afirma que el principal mecanismo de acción de *Trichoderma* es el micoparasitismo, en el cual envuelve a su hospedero

y secreta enzimas que degradan la pared celular, luego continua la retracción de la membrana plasmática y finalmente la desorganización del citoplasma, lo cual aunque no se confirmó por medio de montaje de placas se puede inferir ya que en la mayoría de casos esporuló sobre el hospedero. La investigación mostro que en los cultivos de *Capsicum frutescens* en la localidad de Guacari – Valle ya se han establecido microorganismos de importancia económica como *Alternaria* sp., *Colletotrichum truncatum*, *Erwinia* sp., *Xanthomonas* sp., que junto a los demás microorganismos patógenos están ocasionando pérdidas en cuanto a rendimiento y calidad de la cosecha, pese a los mecanismos de control químicos empleados, esto evidenciado en el rápido y progresivo aumento de la incidencia y severidad de las enfermedades en la plantación. Géneros como *Curvularia*, *Exserohilum* o las especies *Kocuria halotolerans*, *Bacillus megaterium* fueron encontradas causantes de enfermedades detrimentales en la plantación, constituyendo nuevos reportes de microorganismos patógenos asociados a esta especie. Finalmente los métodos de control biológicos constituyen una buena alternativa para el tratamiento de enfermedades, puesto que los antagonistas *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* a nivel de laboratorio inhibieron

satisfactoriamente la mayoría de los patógenos caracterizados, siendo *Trichoderma harzianum* el mejor candidato, con excelentes resultados en la inhibición de *Colletotrichum truncatum*, y el género *Fusarium*; *Bacillus subtilis* inhibió el género *Alternaria*, *Kocuria halotolerans* y *Bacillus* sp.3 satisfactoriamente, por lo que es recomendable evaluar el efecto de estos microorganismos antagonistas a nivel de invernadero, ya que en laboratorio se pudo observar su potencial inhibitorio.

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Celina Torres por la valiosa orientación durante el desarrollo del trabajo. A los integrantes del grupo de investigación de Biología de plantas y microorganismos de la Universidad del Valle. Al laboratorio de microbiología por la colaboración en la identificación de los microorganismos fúngicos y la realización de las pruebas bioquímicas.

LITERATURA CITADA

- Ahmadpour, A., Karami, S., Heidarian, Z. and Javan, A. (2013). “*Exserohilum rostratum* causing sugarcane leaf spot in Iran”, *Australasian Plant Dis. Notes*, No 8, pp 97–99.
- Avelar, J.J., Galindo, M.O., Lara, A.H., Llamas, J.J., Luna, M.F., Salas, M.L. and Cabral, M.C. (2011). “hongos asociados con la enfermedad “miada de perro” en el cultivo de chile”, *Rev. Mex. Cienc. Agric.*, Vol. 2 No 1, pp 155-160.
- Barnett, H. L. and Hunter, B.B. (1998), *Illustrated genera of imperfect fungi*, 4ta. Ed., St. Paul, Minn: APS Press.
- Barone, J.A. and Coley, P.D. (2002), “Herbivorismo y las defensas de las plantas” en Guariguata, M.R. y Kattan, G. H.(Eds), *Ecología y Conservación de bosques neotropicales*, LUR, Texas, pp. 465-492.
- Bell, D. K., Well H. D. and Markham, C. R. (1982). “In vitro Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens”, *Phytopathology*, Vol. 72, pp 379-382.
- Bensch, K.U., Braun, J.Z. and Groenewald, P.W. (2012). “The genus *Cladosporium*”, *Studies in Mycology*, Vol. 72, pp 1-401.
- Calvo, J., Rivera, G., Orozco, S., and Orozco, R. (2012). Aislamiento y evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinérea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*, Vol 23, pp 225-231.
- Diao, Y. Z., Zhang, C., Lin, D. and Liu, X. L. (2014). “First Report of *Colletotrichum truncatum* Causing Anthracnose of Tomato in China”, *Plant Disease*, Vol. 98 No 5, pp 687-687.
- Escalona, Y., Rodríguez, D., Contreras, N. and Jiménez, N. (2006), “patógenos del suelo en el cultivo de pimentón en la zona baja del municipio de Jiménez, estado Lara, Venezuela”, *Bioagro*, Vol. 18 No. 1, pp. 3-13.
- Ezziyyani, M., Pérez, S.C., Requena, M.E., Rubio, L. and Candela, M.E. (2004), “Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la Podredumbre del Pimiento (*Capsicum annuum* L.) Causada por *Phytophthora capsici*”, *Anales de Biología*, Vol. 26, pp. 69-78.
- Francis, J.K. (2004), *Wildland Shrubs of the United States and Its Territories: Thamnic Descriptions: Volume 1*. Gen. Tech. Rep. IITF-GTR-26. San Juan, PR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry, and Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. USA.
- Fundación de desarrollo agropecuario (FDA). (1994) cultivo de ají. Boletín técnico N° 20. Santo Domingo.
- García, R.S., Juárez, C.R., Carrillo, J.F., Allende, R.A., Márquez, I.Z. and Rangel, M.D. (2000). “Marchitez Bacteriana en Chile Bell Causada por *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*”, *Revista Mexicana de fitopatología*, Vol. 18 No 2, pp 120-124.
- González, C.V., Seleme, F. and Juri, C. (2002), “Relevamiento de Patógenos causante de enfermedades en Pimiento (*Capsicum annuum*) para Pimentón en la Provincia de Catamarca”, Documento presentado en el congreso regional de ciencia y tecnología Noa, Universidad de Catamarca, Catamarca.
- Iftikhar, S., Ali S., Nawaz, K. and Ali, S.W. (2016). “First report of *Curvularia lunata* causing fruit rot of tomato (*Lycopersicum esculentum*) in Pakistan”, available at: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1066-PDN> (accessed 20 January 2016).
- Katoch, A. and Kapoor, P. (2014), “Fungal Diseases of Capsicum and Their Management”, *Popular Kheti*, vol. 2, No 2, pp 100-103.
- Kusai, N.A., Zakuan, M.M., Zulkifly, S., Termizi, M.Y. and Izzati, N.A. (2015). “Morphological and molecular characterization of *Curvularia* and related species associated with leaf spot disease of rice in Peninsular Malaysia”, available at: <http://link.springer.com.bd.univalle.edu.co/content/pdf/10.1007%2Fs12210-015-0458-6.pdf> (accessed 20 January 2016).

- Lozano, N.A., Guzmán, R.P., Zabaleta, E.M., Aguilar, V.R. and Ayala, V.E. (2014). “Etiología y evaluación de alternativas de control de la marchitez del chile de árbol (*Capsicum annum* L.) en La Vega de Metztlán, Hidalgo, México”, *Revista Mexicana de fiopatología*, Vol. 33 No 1, pp 31-53.
- Malanichevaa, I.A., Kozlova, D.G., Sumarukovaa, I.G., Efremenkova, O.V., Zenkovaa, V.A., Katrukhaa, G.S., Reznikovaa, M.I., Tarasovab, O.D., Sineokiib, S.P. and El'Registanc, G.I. (2012). “Antimicrobial Activity of *Bacillus megaterium* Strains”, *Microbiology*, Vol. 81 No 2, pp. 178–185.
- Melgarejo, L.M., Hernández, M.S., Barrera, J.A. and Bardales, X. (2004), *Caracterización y usos potenciales del banco de germoplasma de ají amazónico*. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas- Sinchi, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Mirik, M., Aysan, Y. and Çinar, O. (2008). “Biological Control of Bacterial Spot Disease of Pepper with *Bacillus* Strains”, *Turk J Agric For*, Vol. 30, pp 381-390.
- Montri, P., Taylor, P.W. and Mongkolporn, O. (2009). “Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the Causal Agent of Chili Anthracnose, in Thailand”, *Plant Disease*, Vol. 93 No 1, pp 17-20.
- Moreno, S.L., Salcedo, S.M., Cárdenas, M.A., Hernández, J.P. and Núñez, M.G. (2012). “Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annum* l. var. *aviculare*) sobre el crecimiento in vitro de *aspergillus flavus*”, *Polibotanica*, No 34, pp 171-184.
- Nelson, P., Toussoun, T. and Marasas, W. (1983), *Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State University Press.
- Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO). (2014), “crop water information: pepper”, available at: www.fao.org/nr/water/cropinfo_pepper.html (accessed 15 november 2014)
- Peng, Q.Y. and Meiyang, G. (2013). “*Bacillus pumilus*, a Novel Ginger Rhizome Rot Pathogen in China”, *Plant Disease*, Vol. 97 No 10, pp 1308-1315.
- Pratt, R.G. (2006). “Enhancement of sporulation in species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, and *Exserohilum* by growth on cellulose-containing substrates”, *Mycopathologia*, No 162, pp 133–140.
- Rey, M., DelgadoJ.J. Rincón, A.M., Limón, M.A. and Benítez, T. “Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como funguicidas”. *Revista Iberoamericana de Micología*, Vol.17, pp 31-36.
- Sahin, F. and Miller, S. (1998). “Resistance in *Capsicum pubescens* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Pepper Race 6”, *Plant Disease*, Vol. 82 No 7, pp 794-799.
- Sánchez, G.M. (2008), *Análisis de agro negocios alianza productiva y comercial ají*. Proyecto apoyo alianzas productivas, Corpocauca. Popayán.
- Schaad, N. (1988), “*Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*”. 2da. Ed., USA: The American Phytopathological Society, pp 157.
- Shruti, V.H., Ganesh R.H., Gangadhar, S.M. and Vinakak, U. (2014), “Pharmacognostic Evaluation of Leaf and Fruit of *Capsicum frutescens* (Solanaceae)”, *Phcog J*, Vol. 6 No 3, pp 14-22.
- Tang, S., Wang, Y., Lou, K. Mao, P., Xu, L., Jiang, C., Kim, C. and Li, W. (2009). “*Kocuria halotolerans* sp. nov., an actinobacterium isolated from a saline soil in China”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 59, pp 1316–1320.
- Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O. and Taylor, P.W. (2008). “Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand”, *Plant Pathology*, No 57, pp 562–572.
- Torres, E., Iannacone, I. and Gomez, H. (2008). “Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas”, *Bragantia*, Vol. 67 No 1, pp 169-178.

Waizel, J.B. and Camacho, R.M. (2011). "El género *Capsicum* spp. ("chile"). Una versión paronamica", *Aleph Zero*, No 34, pp 67-79.

Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A. and Kanjanamaneesathian, M. (2013). "Preparation and evaluation of *Bacillus megaterium*-alginate microcapsules for control of rice sheath blight disease", *World J Microbiol Biotechnol*, Vol. 29, pp 1487–1497.

Woudenberg, J.H., Seid, M.F., Groenewald1, J.Z., Vries, M.B., Stielow, J.B., Thomma, B.H. and Crous, W.P. (2015). "*Alternaria* section *Alternaria*: Species,

formae speciales or pathotypes", *Studies in Mycology*, Vol. 82, pp 1-21

Wua, Y., Zhao, C.B., Farmer, J. and Suna, J. (2015). "Effects of bio-organic fertilizer on pepper growth and *Fusarium* wilt biocontrol", *Scientia Horticulturae*, No 193, pp 114-120.

Zhong, J., Zhou, Q., Hu, Y., Jian, H. and Gao, B.D. (2016). "Molecular identification of a novel victorivirus from the phytopathogenic fungus *Nigrospora oryzae*." , *Virus Genes*, Vol. 52 No 1, pp 156-159.