

# TOLERANCIA DE PLANTAS DE FRESA (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) PREMICORRIZADAS CON *Rhizophagus intraradices* E INOCULADAS CON PGPR's A *Phytophthora capsici*

## TOLERANCE OF STRAWBERRY (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) PLANTS PRE-MYCORRHIZED WITH *Rhizophagus intraradices* AND INOCULATED WITH PGPR's TO *Phytophthora capsici*

María Serret-López<sup>1</sup>, David Espinosa-Victoria<sup>2\*</sup>, Olga Gómez-Rodríguez<sup>1</sup>, Julián Delgadillo-Martínez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Fitopatología, <sup>2</sup>Programa de Edafología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 56230. Km. 36.5 carretera Federal México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México. (serret1702@hotmail.com) (despinos@colpos.mx).

### RESUMEN

La tolerancia a la marchitez causada por el oomiceto *Phytophthora capsici* en fresa (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) variedad Festival, se evaluó mediante premicorrización con el hongo *Rhizophagus intraradices* e inoculación con un consorcio de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR's (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) conformado por *Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus*, y *Paenibacillus* sp. La inoculación de los microorganismos biocontroladores se hizo por separado y en combinación 8 d después del trasplante. La inoculación de *P. capsici* se hizo 45 d después de aplicar los biocontroladores. El diseño experimental fue completamente al azar, los datos se analizaron con ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). En un experimento de antagonismo *in vitro* previo, *P. tolassi* y *B. pumillus* inhibieron el crecimiento del oomiceto en 54 %, y *Paenibacillus* sp. lo hizo en 43 %. Se sugiere la producción de metabolitos por las rizobacterias que difunden e inhiben el crecimiento del oomiceto. La severidad de la enfermedad en las plantas tratadas con *P. capsici* fue 63 %, pero fue menor (23 %) en las plantas inoculadas con PGPR's+*R. intraradices*. Las plantas inoculadas con PGPR's+*R. intraradices* mostraron los valores más altos de área foliar (239.95 cm<sup>2</sup>), biomasa de aérea seca (6.24 g), volumen radical (2.1 mL) y número de estolones (5). Las plantas tratadas previamente con PGPR's y *R. intraradices* e inoculadas después con *P. capsici*, aumentaron en 44, 7, y 58 % el área foliar, la biomasa aérea y el volumen radical, respectivamente, en comparación con las plantas inoculadas solo con el oomiceto. De acuerdo con

### ABSTRACT

The tolerance to wilting caused by the oomycete *Phytophthora capsici* in strawberry (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) var. Festival was evaluated by premycorrhization with the fungus *Rhizophagus intraradices* and inoculation with a consortium of PGPR's (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) composed of *Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus*, and *Paenibacillus* sp. The inoculation of biocontrolling microorganisms was carried out separately and in combination 8 d after transplanting. The inoculation of *P. capsici* was carried out 45 d after applying biocontrollers. The experimental design was completely randomized, data were analyzed by ANOVA and the averages of treatments were compared using Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ). In a previous antagonism *in vitro* experiment, *P. tolassi* and *B. pumillus* were found to inhibit oomycete growth by 54 %, while *Paenibacillus* sp. did the same by 43 %. The production of metabolites by rhizobacteria that disseminate and inhibit the growth of the oomycete is suggested. The severity of the disease in plants treated with *P. capsici* was 63 %, but it was lower (23 %) in plants inoculated with PGPR's+*R. intraradices*. Plants inoculated with PGPR's+*R. intraradices* showed the highest values for foliar area (239.95 cm<sup>2</sup>), dry biomass of aerial section (6.24 g), root volume (2.1 mL) and number of stolons (5). Plants previously treated with PGPR's and *R. intraradices* and then inoculated with *P. capsici*, increased foliar area, aerial biomass, and root volume by 44, 7, and 58 %, respectively, in comparison to plants inoculated only with the oomycete. According to the analysis of results, biocontrolling microorganisms promote the tolerance of strawberry plants to wilting induced by *P. capsici*.

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: septiembre, 2015. Aprobado: agosto, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 1107-1121. 2016.

**Key words:** *Phytophthora capsici*, *Fragaria*×*ananassa* Duch., *Rhizophagus intraradices*, *Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus* sp., biocontrol, PGPR's.

el análisis de los resultados, los microorganismos biocontroladores favorecen la tolerancia de las plantas de fresa a la marchitez inducida por *P. capsici*.

**Palabras clave:** *Phytophthora capsici*, *Fragaria*×*ananassa* Duch., *Rhizophagus intraradices*, *Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus*, y *Paenibacillus* sp., biocontrol, PGPR's.

## INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) es una planta de la familia Rosaceae y destaca por su contenido de vitamina C, taninos, flavonoides, antocianinas, catequina, quercetina, kaempferol y ácidos orgánicos (Kessel, 2012). El cultivo de la fresa tiene importancia socioeconómica para México, por su gran demanda de mano de obra y porque genera una proporción considerable de los ingresos por exportaciones frutícolas (Sánchez, 2008).

Los principales estados productores de fresa en México son Michoacán con 5896 ha y Baja California con 2273.30 ha sembradas (SIAP, 2014). En la región de Zamora, Michoacán, las variedades más cultivadas son Festival con 32 % de la superficie total, Camino Real con 28 % y Aromas con 20 %. En la zona Norte-Centro de México, las variedades Camino Real, Camarosa y Festival cubren 97 % de la superficie total (Sánchez, 2008).

El género *Phytophthora* es un oomiceto, está entre los principales agentes causales de enfermedad y es el responsable directo de pérdidas económicas altas en el cultivo de la fresa. La humedad relativa elevada, humedad abundante del suelo y la temperatura de 25 a 30 °C aumentan la severidad de *Phytophthora capsici* (Granke *et al.*, 2012; Sanogo and Bosland, 2013; Callaghan *et al.*, 2016). Las plantas hospedantes infestadas con *Phytophthora* spp. muestran frecuente marchitamiento, clorosis y resquebrajamiento de tallo, por lo que se debilitan, son susceptibles a otros patógenos y mueren (Dorantes *et al.*, 2008).

Los exudados de la raíz de plantas de fresa colonizadas con Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) reducen la esporulación de *Phytophthora fragariae* (Norman and Hooker, 2000). En plantas de fresa micorrizadas hay tolerancia a la marchitez causada por *Fusarium oxysporum*, pero se conoce poco de los mecanismos de tolerancia a la enfermedad en plantas micorrizadas (Matsubara *et al.*, 2012). La micorriza

## INTRODUCTION

The strawberry plant (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) belongs to the Rosaceae family and stands out for its content of vitamin C, tannins, flavonoids, anthocyanins, catechins, quercetin, kaempferol, and organic acids (Kessel, 2012). Strawberry plantations are socioeconomically important for Mexico, due to its large workforce demand and because it provides a considerable portion of incomes produced by fruit exports (Sánchez, 2008).

The main strawberry-producing states in Mexico are Michoacán with 5896 ha and Baja California with 2273.30 ha planted (SIAP, 2014). In the area of Zamora, Michoacán, the most widely-planted varieties are Festival, with 32 % of the total surface, Camino Real with 28 % and Aromas with 20 %. In northern-central Mexico, the varieties Camino Real, Camarosa and Festival cover 97 % of the total surface (Sánchez, 2008).

The genus *Phytophthora* is an oomycete and is among the main agents that cause diseases; it is directly responsible for high economic losses in strawberry plantations. High relative humidity, abundant soil humidity and temperatures between 25 and 30 °C increase the severity of *Phytophthora capsici* (Granke *et al.*, 2012; Sanogo and Bosland, 2013; Callaghan *et al.*, 2016). Host plants infected with *Phytophthora* spp. strong wilting, chlorosis and cracking of the stem, making them weak, vulnerable to other pathogens, and leading to their death (Dorantes *et al.*, 2008).

Exudates from strawberry plant roots colonized by Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) reduce the sporulation of *Phytophthora fragariae* (Norman and Hooker, 2000). Mycorrhized strawberry plants are tolerant to wilting caused by *Fusarium oxysporum*, although little is known on the mechanisms of tolerance to the disease in mycorrhized plants (Matsubara *et al.*, 2012). Arbuscular mycorrhiza and the Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR's) have a protective effect against diseases caused by some root pathogens such as *Phytophthora capsici*, *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas syringae* (Dorantes *et al.*, 2008).

The aim of this study was to evaluate premycorrhization with *Rhizophagus intraradices* and inoculation with the rhizobacteria *Pseudomonas*

arbuscular y las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR's) tienen efecto protector contra enfermedades causadas por algunos patógenos de raíz como *Phytophthora capsici*, *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae* (Dorantes *et al.*, 2008).

El objetivo de este estudio fue evaluar la pre-micorrización con *Rhizophagus intraradices* e inoculación con las rizobacterias *Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus*, y *Paenibacillus* sp. en la supresión de la marchitez causada por *P. capsici* en fresa. Dado que la inoculación de los microorganismos biocontroladores por separado reduce la incidencia del oomiceto, se hipotetizó que la inoculación conjunta aumentará su efectividad al disminuir la incidencia y severidad de la marchitez en plantas de fresa infestadas con *P. capsici*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en dos fases: La primera en laboratorio y la segunda en cámara de ambiente controlado (Sherer® Modelo CEL 37-14, Gillet Marshall Mich. USA).

### Material biológico

Las plantas de fresa de la variedad Festival se adquirieron en la empresa Insumos Agrícolas para Invernadero INAPI, de Irapuato, Guanajuato.

Las cepas bacterianas (*Pseudomonas tolassi*, *B. pumilus* y *Paenibacillus* sp.) y el hongo micorrízico arbuscular (*R. intraradices*) fueron proporcionados por el área de Microbiología de Suelos, del Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

*Phytophthora capsici* cepa PcT17 empleada en este experimento fue proporcionada por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### Patogenicidad de *Phytophthora capsici* cepa PcT17 en fresa

Ocho plantas de fresa de la variedad Festival con tres y cuatro hojas se inocularon (8 d después del trasplante) con 200 000 zoosporas por planta, para mostrar la patogenicidad del oomiceto en esta variedad de fresa bajo condiciones de invernadero.

### Primera fase: Capacidad antagonista *in vitro* de tres cepas de rizobacterias hacia *Phytophthora capsici*

La primera fase fue una prueba de antagonismo mediante confrontación *in vitro* de las rizobacterias de *P. tolassi*, *B. pumilus*, y *Paenibacillus* sp. contra *P. capsici*. Las rizobacterias se

inocularon en la fresa con *P. tolassi*, *Bacillus pumilus*, and *Paenibacillus* sp. in the suppression of wilting caused by *P. capsici* in strawberry plants. Given that inoculation of the bio-controlling microorganisms separately reduces the incidence of the oomycete, we hypothesized that joint inoculation will increase its effectiveness by reducing the incidence and severity of wilting in strawberry plants infested with *P. capsici*.

## MATERIALS AND METHODS

This investigation was carried out in two phases: The first was in the laboratory, and the second, in a controlled environment chamber (Sherer® Modelo CEL 37-14, Gillet Marshall Mich. USA).

### Biological material

Festival variety strawberry plants were acquired in the company named Insumos Agrícolas para Invernadero INAPI, in Irapuato, Guanajuato.

The bacterial strains (*Pseudomonas tolassi*, *B. pumilus* and *Paenibacillus* sp.) and the Arbuscular Mycorrhizal Fungus (*R. intraradices*) were provided by the Soil Microbiology Area, from the Soil Science Graduate Program, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

*Phytophthora capsici* strain PcT17 used in this experiment was provided by the Universidad Michoacana in San Nicolás de Hidalgo, Mexico.

### Pathogenicity of *Phytophthora capsici* strain PcT17 on strawberry

Eight Festival variety strawberry plants with three and four leaves were inoculated (8 d after transplant) with 200 000 zoospores per plant, to show the pathogenicity of the oomycete in this variety of strawberry under greenhouse conditions.

### First phase: Antagonistic capacity *in vitro* of three strains of rhizobacteria towards *Phytophthora capsici*

The first phase was a test for antagonism by confrontation *in vitro* of the rhizobacteria of *P. tolassi*, *B. pumilus*, and *Paenibacillus* sp. against *P. capsici*. The rhizobacteria were cultivated in nutritive agar for 48 h at 27 °C and the strain *P. capsici* was developed in V8 medium V8 (juice of eight vegetables: calcium carbonate: agar) at 27 °C for 10 d.

cultivaron en agar nutritivo por 48 h a 27 °C y la cepa *P. capsici* se desarrolló en medio V8 (jugo de ocho verduras: carbonato de calcio: agar) a 27 °C durante 10 d.

### Prueba *in vitro*

El crecimiento micelial de *P. capsici in vitro* se evaluó con la técnica de cultivos duales descrita por Landa *et al.* (1997). Discos de medio V8 de 5 mm, con crecimiento activo del oomiceto, se colocaron en el centro de una caja Petri con medio V8. Al mismo tiempo, las bacterias se sembraron de forma individual en línea recta, a una distancia de 3 cm del disco con contenido micelial. Los cultivos se incubaron 5 d a 28 °C. El testigo fue un disco de 5 mm de medio V8 con crecimiento micelial, pero sin inóculo bacteriano.

### Tratamientos y diseño experimental

El experimento tuvo cuatro tratamientos, 1) *P. tolassi* confrontada con *P. capsici*, 2) *B. pumilus* confrontada con *P. capsici*, 3) *Paenibacillus* sp. confrontada con *P. capsici* y, 4) Testigo. El diseño experimental fue completamente al azar y cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. La unidad experimental fue una caja Petri.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula (Landa *et al.*, 1997):

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = [(R - r) / R] \times 100$$

donde  $r$  es el radio de *P. capsici* y  $R$  es el radio máximo del oomiceto sin la bacteria.

### Segunda fase: Prueba en ambiente controlado

Plantas de fresa de la variedad Festival de tamaño uniforme, se desinfectaron 3 min con hipoclorito de sodio al 1 % y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Cada planta se transfirió a un contenedor de 400 cm<sup>3</sup> que fue la unidad experimental.

El sustrato fue una mezcla de peat moss, agrolita y vermicomposta (4:4:2 v/v/v), esterilizada dos veces en autoclave a 120 °C por 2 h. Las plantas se regaron con agua estéril según lo requirieron y cada semana se adicionó solución nutritiva Long Asthon modificada para aplicar 11 mg de P L<sup>-1</sup> (Hewitt, 1966).

Las plantas de fresa se inocularon 8 d después del trasplante con 0.5 g de raíces de sorgo colonizadas en 80 a 85 % con *R. intraradices*, y 1 mL de la suspensión bacteriana compuesta por *P. tolassi*, *B. pumilus* y *Paenibacillus* sp. a una concentración de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Las plantas de fresa con y sin inóculo se colocaron en una cámara de ambiente controlado (Sherer®

### Test *in vitro*

The mycelial growth of *P. capsici in vitro* was evaluated using the dual cultivation technique described by Landa *et al.* (1997). V8 medium discs, 5 mm in diameter, with the active growth of the oomycete, were placed in the center of a Petri dish with V8 medium. At the same time, the bacteria were planted individually in a straight line, 3 cm away from the disc with mycelial content. The cultures were incubated for 5 d at 28 °C. The control was a 5 mm disc with V8 medium with mycelial growth, but without bacterial inoculant.

### Treatments and experimental design

The experiment had four treatments, 1) *P. tolassi* confronted with *P. capsici*, 2) *B. pumilus* confronted with *P. capsici*, 3) *Paenibacillus* sp. confronted with *P. capsici* and 4) Control. The experimental design was totally at random and each treatment had four repetitions. The experimental unit was one Petri dish.

The percentage of inhibition was calculated using the following formula (Landa *et al.*, 1997):

$$\text{Percentage of inhibition (\%)} = [(R - r) / R] \times 100$$

where  $r$  is the radius of *P. capsici* and  $R$  is the maximum radius of the oomycete without the bacteria.

### Second phase: Test under controlled environment conditions

Uniformly sized Festival variety strawberry plants were disinfected with sodium hypochlorite at 1 % for 3 min and rinsed three times with sterile distilled water. Each plant was moved to a 400 cm<sup>3</sup> container, which was the experimental unit.

The substrate was a mixture of peat moss, agrolite and vermicompost (4:4:2 v/v/v), sterilized in an autoclave at 120 °C for 2 h, twice. The plants were watered with sterile water as required and each week a Long Asthon nutritive solution was added, modified to apply 11 mg of P L<sup>-1</sup> (Hewitt, 1966).

The strawberry plants were inoculated 8 d after transplanting with 0.5 g of sorghum roots colonized in 80 to 85 % by *R. intraradices*, and 1 mL of the bacterial suspension composed of *P. tolassi*, *B. pumilus* and *Paenibacillus* sp. at a concentration of 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Strawberry plants with and without inoculant were placed in a controlled environment chamber (Sherer® Model CEL 37-14, Gillet Marshall Mich. USA), at a constant temperature of 26 °C.

Modelo CEL 37-14, Gillet Marshall Mich. USA), con una temperatura constante de 26 °C.

### Multiplicación e inoculación de *Phytophthora capsici*

Cultivos de *P. capsici* con 10 d de crecimiento en medio V8 se adicionaron con 10 mL de solución de cloruro de sodio al 0.9 % (Abbott<sup>MR</sup>) por caja Petri durante 10 min. La solución isotónica se decantó, se dividió en cuatro partes y cada una se colocó en una caja Petri estéril. Después se agregó agua destilada estéril y se colocaron los cultivos de *P. capsici* bajo luz blanca fría a 26 °C por 48 h, y a 28 °C en oscuridad por 24 h.

Las cajas Petri con *P. capsici* se colocaron 30 min a 4 °C y después 30 min a 28 °C para favorecer la liberación de zoosporas. El contenido de cada caja Petri se vació en un recipiente y se contó el número de zoosporas con un citómetro (Marienfeld<sup>®</sup>). La suspensión de zoosporas se ajustó a 200 000 zoosporas mL<sup>-1</sup>.

El oomiceto se inoculó en las plantas de fresa 45 d después de la inoculación de los microorganismos biocontroladores, añadiendo 1 mL de la suspensión por contenedor. Las plantas inoculadas se mantuvieron 5 d en suelo a saturación para favorecer el desplazamiento del oomiceto. Este experimento se repitió dos veces.

### Incidencia y severidad de la enfermedad

La incidencia (número total de plantas marchitas por el fitopatógeno respecto al total expresada en porcentaje) y severidad de la enfermedad se registró a los 5, 10, 15 y 20 d con respecto a la inoculación del patógeno. La severidad se evaluó usando la escala modificada de Adorada *et al.*, (2000), que asigna valores de 1 a 5 según el grado de marchitez de la planta: 1=0 % de hojas marchitas; 2=1-25 % de hojas marchitas; 3=26-50 % de hojas marchitas; 4=51-75 % de hojas marchitas; 5=76-100 % de hojas marchitas o muerte.

La severidad de la enfermedad (SE) se expresó como una proporción (porcentaje) de acuerdo con la fórmula de Adorada *et al.*, (2000):

$$SE (\%) = \frac{\text{(Suma de los valores de la enfermedad)}}{\text{(Número total de valores) (Valor máximo de la enfermedad)}} \times 100$$

### Área foliar, peso de la biomasa seca de la parte aérea, volumen radical y número de estolones

El área foliar se registró de manera directa con un medidor de área foliar (Area Meter, Modelo LI-3100; Nebraska, EE.UU.). El peso de la biomasa seca de la parte aérea se

### Multiplication and inoculation of *Phytophthora capsici*

*P. capsici* cultures with 10 d of growth in V8 medium were added 10 mL of sodium chloride solution at 0.9 % (Abbott<sup>MR</sup>) per Petri dish for 10 min. The isotonic solution was poured, divided into four parts, and each was placed in a sterile Petri dish. Later, sterile distilled water was added and the *P. capsici* cultures were placed under cold white light at 26 °C for 48 h, and at 28 °C in the dark for 24 h.

The Petri dishes with *P. capsici* were placed for 30 min at 4 °C, then for 30 min at 28 °C to promote the release of zoospores. The content of each Petri dish was emptied into a container and the number of zoospores was counted using a cytometer (Marienfeld<sup>®</sup>). The zoospore suspension was adjusted to 200 000 zoospores mL<sup>-1</sup>.

The oomycete was inoculated in strawberry plants 45 d after the inoculation of bio-controlling microorganisms, adding 1 mL of the suspension in each container. Inoculated plants were kept for 5 d in moisture-saturated soil to promote the displacement of the oomycete. This experiment was performed twice.

### Disease incidence and severity

The incidence (total number of plants wilted by the pathogen in regard to the total expressed as a percentage) and severity of the disease was registered on days 5, 10, 15 and 20 after the pathogen inoculation. Severity was evaluated using the modified scale by Adorada *et al.*, (2000), that assigns values from 1 to 50 according to the degree of plant wilting: 1=0 % wilted plants; 2=1-25 % of wilted plants; 3=26-50 % of wilted plants; 4=51-75 % of wilted plants; 5=76-100 % of wilted plants or death.

The disease severity (DS) was expressed as a proportion (percentage) according to the formula by Adorada *et al.*, (2000):

$$DS (\%) = \frac{\text{(Sum of the values of the disease)}}{\text{(Total number of values) (Maximum value of the disease)}} \times 100$$

### Foliar area, dry biomass weight of the aerial part, radical volume, and number of stolons

The foliar area was registered directly using a foliar area meter (Area Meter, Model LI-3100; Nebraska, U.S.A.). The weight of the dry biomass of the aerial part was determined by drying the samples in an oven (FELISA, Model 242-A) at 70 °C for 72 h y and then weighed using an analytical scale (Acculab, Model ALC-104). The volume of the root was evaluated by

determinó secando las muestras en un horno (FELISA, Modelo 242-A) a 70 °C por 72 h y se pesaron en una balanza analítica (Acculab, Modelo ALC-104). El volumen radical se evaluó por desplazamiento de agua, al sumergir el sistema radical en una probeta graduada de 100 mL. El número de estolones se determinó en cada tratamiento. Todas las variables se evaluaron al finalizar el experimento.

#### Determinación de nitrógeno (N) y fósforo (P)

El N y P se determinaron en el laboratorio de Fertilidad de Suelos del Colegio de Postgraduados. El N por el método semi-micro-kjeldahl (Bremner, 1975) y el P mediante fotocolorimetría por reducción con Molibdo-vanadato.

#### Determinación de colonización micorrízica

La colonización micorrízica se determinó con el método de clareo y tinción de raíces (Phillips y Hayman, 1970).

La frecuencia de la colonización micorrízica en raíces de fresa se determinó con el método de Biermann y Linderman (1981) y se expresó en porcentaje.

#### Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue completamente al azar, con ocho tratamientos y seis repeticiones cada uno. Los tratamientos fueron: 1) Testigo negativo (sin inocular), 2) Testigo positivo (inoculado solo con *P. capsici*), 3) Plantas inoculadas con PGPR's (*Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus*, y *Paenibacillus* sp.), 4) Plantas inoculadas con PGPR's+*P. capsici*, 5) Plantas inoculadas con *R. intraradices*, 6) Plantas inoculadas con *R. intraradices*+*P. capsici*, 7) Plantas inoculadas con PGPR's+*R. intraradices* y, 8) Plantas inoculadas con PGPR's+*R. intraradices*+*P. capsici*. La unidad experimental fue una maceta de 400 cm<sup>3</sup> con una planta.

Con los datos se realizó un ANDEVA, las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), y se usó SAS Versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Primera fase: Capacidad antagonista *in vitro* de *P. tolassi*, *B. pumillus* y *Paenibacillus* sp. hacia *Phytophthora capsici*

Las tres cepas bacterianas tuvieron efecto antagonista contra *P. capsici* (Cuadro 1 y Figura 1). *P. tolassi* y *B. pumillus* inhibieron el crecimiento del oomiceto

water displacement, submerging the root system in a graduated 100 mL test tube. The number of stolons was determined in each treatment. All variables were evaluated at the end of the experiment.

#### Determination of nitrogen (N) and phosphorous (P)

N and P were determined in the Soil Fertility lab of the Colegio de Postgraduados. Nitrogen, using the semi-micro-kjeldahl method (Bremner, 1975) and phosphorous, using photocolorimetry by reduction with Molibdo-vanadate.

#### Determination of mycorrhizal colonization

Mycorrhizal colonization was determined using the root staining and clearing method (Phillips and Hayman, 1970).

The frequency of the mycorrhizal colonization in strawberry plant roots was determined using the method by Biermann and Linderman (1981) and was expressed as a percentage.

#### Experimental design and treatments

The experimental design was totally at random, with eight treatments and six repetitions each. The treatments were: 1) Negative control (not inoculated), 2) Positive control (inoculated only with *P. capsici*), 3) Plants inoculated with PGPR's (*Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus*, and *Paenibacillus* sp.), 4) Plants inoculated with PGPR's+*P. capsici*, 5) Plants inoculated with *R. intraradices*, 6) Plants inoculated with *R. intraradices*+*P. capsici*, 7) Plants inoculated with PGPR's+*R. intraradices* and 8) Plants inoculated with PGPR's+*R. intraradices*+*P. capsici*. The experimental unit was a 400 cm<sup>3</sup> pot with one plant.

An ANOVA was performed using the data, the means of the treatments were compared using Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ), and SAS Version 9.0 (SAS Institute, 2002) was used.

## RESULTS AND DISCUSSION

### First phase: Antagonistic capacity *in vitro* of *P. tolassi*, *B. pumillus* and *Paenibacillus* sp. towards *Phytophthora capsici*

The three bacterial strains had an antagonistic effect against *P. capsici* (Table 1 and Figure 1). *P. tolassi* and *B. pumillus* inhibited the growth of the oomycete by 54 %, and *Paenibacillus* sp. by 43 %. These results suggest that the rhizobacteria probably produce secondary metabolites that spread throughout the agar and inhibit the growth of the phytopathogen.

en 54 %, y *Paenibacillus* sp. en 43 %. Estos resultados sugieren que las rizobacterias probablemente producen metabolitos secundarios que se difunden a través del agar e inhiben el crecimiento del fitopatógeno. Landa *et al.* (1997) reportan que algunas cepas de *Pseudomonas* producen metabolitos secundarios que se difunden en el agar causando la inhibición de *Fusarium* spp. Además, algunas especies de *Bacillus* ejercen un efecto antagónico debido a la producción de enzimas líticas, antibióticos o metabolitos, o ambos, que originan cambios en la membrana citoplasmática (Sicúa *et al.*, 2015; Ramyabharathi y Raguchander, 2014).

### Segunda fase: Prueba en ambiente controlado

#### Incidencia y severidad de la enfermedad

A los 0 y 3 d no se observó incidencia de la enfermedad. Las plantas inoculadas sólo con el patógeno presentaron 83 % de incidencia de la enfermedad al final del experimento. Sin embargo, las plantas preinoculadas con PGPR's o *R. intraradices* mostraron 50 y 33 % de incidencia, respectivamente. La manifestación de la enfermedad en las plantas inoculadas con PGPR's + *R. intraradices* fue 33 % (Figura 2).

La severidad de la enfermedad comenzó a manifestarse en las plantas no inoculadas con los microorganismos benéficos, cinco días después de la inoculación del patógeno. Al final del experimento la severidad de la enfermedad en las plantas testigo positivo fue 63 %, pero las plantas preinoculadas con PGPR's mostraron 37 % de severidad (Figura 3), debido posiblemente a la inducción de resistencia sistémica

#### Cuadro 1. Inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *Phytophthora capsici* causada por tres cepas de rizobacterias, después de cinco días de cocultivo.

Table 1. *In vitro* inhibition of mycelial growth of *Phytophthora capsici* caused by three strains of rhizobacteria, after five days of co-cultivation.

Cepa rizobacteriana	Inhibición del oomiceto (%)
<i>Pseudomonas tolassi</i>	54.93±0.09 a
<i>Bacillus pumilus</i>	54.12±0.89 a
<i>Paenibacillus</i> sp.	43.11±0.05 a
Testigo	0 b

a, b Medias con letras distintas en una columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).  $\pm$  desviación estándar; n: 4 repeticiones por tratamiento  $\diamond$  a, b Averages with different letters in a column are statistically different ( $p \leq 0.05$ ).  $\pm$  standard deviation; n: 4 repetitions per treatment.

Landa *et al.* (1997) report that some strains of *Pseudomonas* produce secondary metabolites that spread in agar, causing the inhibition of *Fusarium* spp. Also, some *Bacillus* species exert an antagonistic effect due to the production of lytic enzymes, antibiotics or metabolites, or both, which produce changes in the cytoplasmic membrane (Sicúa *et al.*, 2015; Ramyabharathi and Raguchander, 2014).

### Second phase: Test in controlled environment

#### Disease incidence and severity

On days 0 and 3 no incidence of the disease was observed. Plants inoculated only with the pathogen showed 83 % incidence of the plant at the end of the experiment. However, plants pre-inoculated

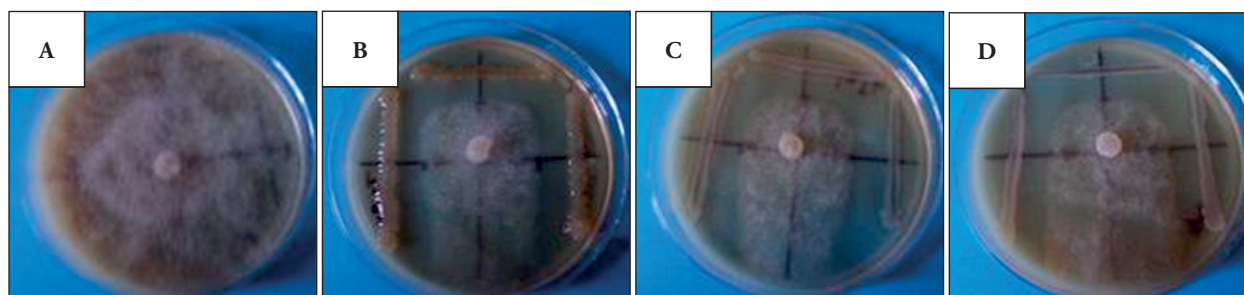
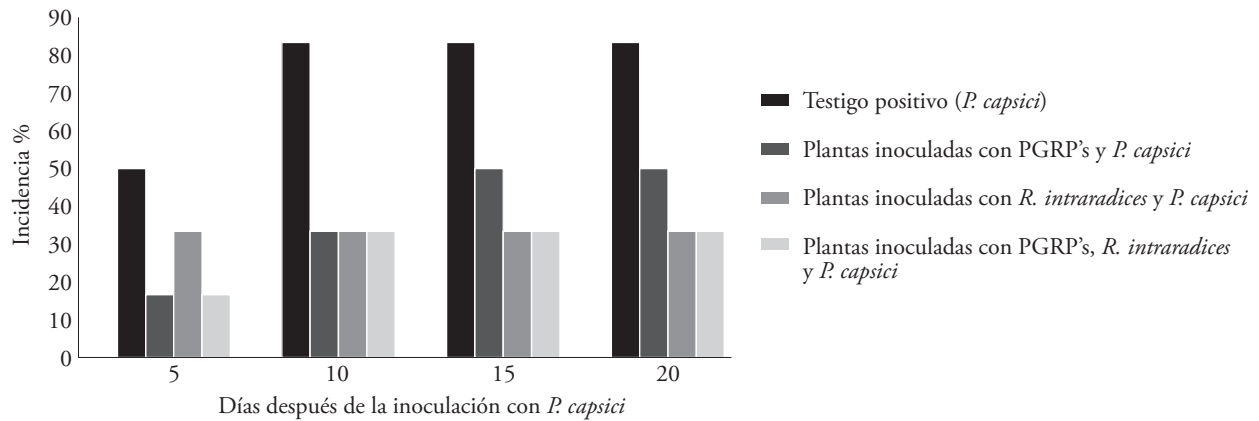


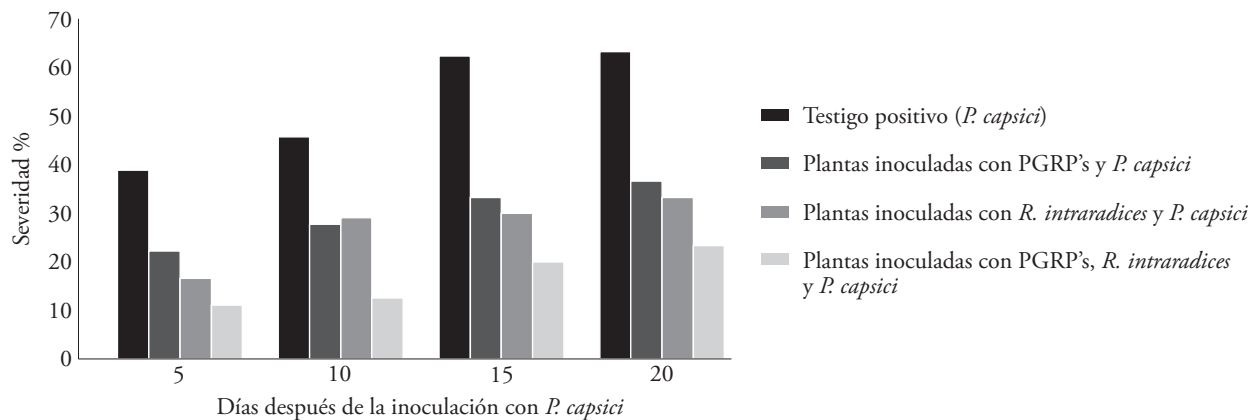
Figura 1. Inhibición de *Phytophthora capsici* por rizobacterias. A) *P. capsici* creciendo solo (Testigo), (B) *P. capsici* con *Bacillus pumilus* (C) *P. capsici* con *Pseudomonas tolassi* y, (D) *P. capsici* con *Paenibacillus* sp.

Figure 1. Inhibition of *Phytophthora capsici* by rhizobacteria. A) *P. capsici* growing alone (Control), (B) *P. capsici* with *Bacillus pumilus* (C) *P. capsici* with *Pseudomonas tolassi* and (D) *P. capsici* with *Paenibacillus* sp.



**Figura 2.** Incidencia de la enfermedad causada por *Phytophthora capsici* en plantas de fresa preinoculadas con *Rhizobagus intraradices* y PGPR's. La incidencia se registró a los 5, 10, 15 y 20 d después de la inoculación con el oomiceto fitopatógeno. Cada punto corresponde al promedio de seis plantas.

**Figure 2.** Disease incidence caused by *Phytophthora capsici* in strawberry plants pre-inoculated with *Rhizobagus intraradices* and PGPR's. The incidence was registered on days 5, 10, 15, and 20 after inoculation with the pathogenic oomycete. Each point corresponds to the average of six plants.



**Figura 3.** Severidad de la enfermedad causada por *Phytophthora capsici* en plantas de fresa preinoculadas con *Rhizobagus intraradices* y PGPR's. La severidad se registró a los 5, 10, 15 y 20 d después de la inoculación con el oomiceto fitopatógeno. Cada punto corresponde al promedio de seis plantas.

**Figure 3.** Disease severity caused by *Phytophthora capsici* in strawberry plants pre-inoculated with *Rhizobagus intraradices* and PGPR's. The severity was registered on days 5, 10, 15, and 20 after inoculation with the pathogenic oomycete. Each point corresponds to the average of six plants.

(Nadeem *et al.*, 2014), o al competir por nutrientes y nicho (Ochoa *et al.*, 2010).

Las plantas inoculadas con *R. intraradices* mostraron 33 % de severidad. Alarcón *et al.* (2000) indican que además del beneficio nutrimental de la simbiosis, los HMA también participan como agentes de control biológico de patógenos de hábito radical.

Las plantas inoculadas con PGPR's + *R. intraradices* presentaron menor severidad (23 %) (Figura 3). Los HMA y las rizobacterias actúan sinérgicamente estimulando el crecimiento de las plantas y la inhibición

with PGPR's or *R. intraradices* showed incidences of 50 and 33 %, respectively. The manifestation of the disease in plants inoculated with PGPR's + *R. intraradices* was 33 % (Figure 2).

The severity of the disease began manifesting itself in plants not inoculated with beneficial microorganisms, five days after the inoculation of the pathogen. At the end of the experiment, the severity of the disease in positive control plants was 63 %, yet plants pre-inoculated with PGPR's showed a severity of 37 % (Figure 3), due possibly to the induction of systemic resistance (Nadeem *et al.*, 2014), or when



del oomiceto fitopatógono (Figura 4). Las PGPR's estimulan el crecimiento de HMA (Linderman, 1993), el desarrollo radicular, una mayor susceptibilidad de la raíz a la colonización de hongos micorrízicos, y la mejora del proceso de reconocimiento entre la raíz y los hongos (Artursson *et al.*, 2006; Bonfante y Anca, 2009).

Las PGPR's suprimen enfermedades producidas por microorganismos fitopatógonos mediante la producción de sideróforos, síntesis de antibióticos, enzimas o compuestos fungicidas o ambos (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Por ejemplo, *Pseudomonas* y *Bacillus* pueden controlar patógenos, sobre todo hongos, sintetizando moléculas antifúngicas (Whipps, 2001). Las bacterias del género *Pseudomonas* inducen resistencia en la planta al incrementar la velocidad y los niveles de síntesis de fitoalexinas, sustancias

competing for nutrients and niche (Ochoa *et al.*, 2010).

Plants inoculated with *R. intraradices* displayed a severity of 33 %. Alarcón *et al.* (2000) indicate that apart from the nutritional benefit of the symbiosis, AMFs also participated as root pathogens biological control agents.

Plants inoculated with PGPR's+*R. intraradices* presented a lower severity (23 %) (Figure 3). AMFs and rhizobacteria act synergically, stimulating plant growth and the inhibition of the pathogenic oomycete (Figure 4). PGPR's stimulate AMF growth (Linderman, 1993), root development, a greater susceptibility of the root to the colonization of mycorrhizal fungi, and improves the process of recognition between roots and fungi (Artursson *et al.*, 2006; Bonfante and Anca, 2009).

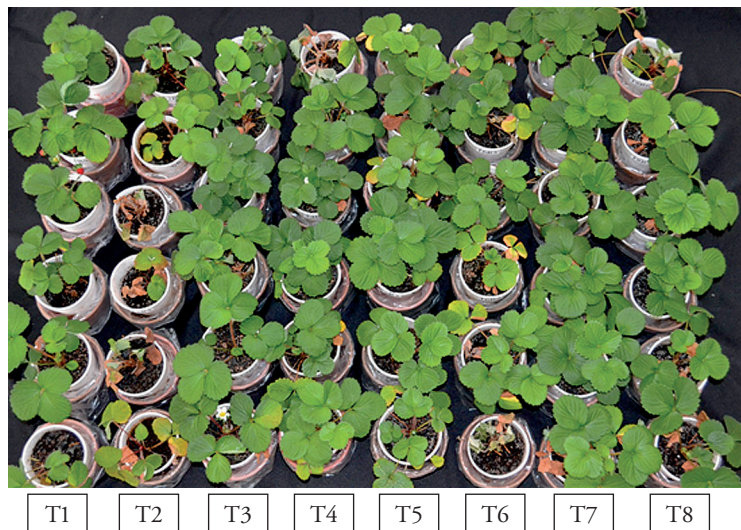


Figura 4. Respuesta de plantas de fresa variedad comercial Festival, pre-micorrizadas con *Rhizophagus intraradices* e inoculadas con PGPR's, al ataque de *Phytophthora capsici*. Plantas sin inocular (T1), plantas inoculadas con *P. capsici* (T2), plantas inoculadas solo con PGPR's (T3), plantas inoculadas con PGPR's+*P. capsici* (T4), plantas inoculadas solo con *R. intraradices* (T5), plantas inoculadas con *R. intraradices*+*P. capsici* (T6), plantas inoculadas con *R. intraradices*+ PGPR's (T7) y plantas inoculadas con *R. intraradices*, PGPR's+*P. capsici* (T8).

Figure 4. Response of the Festival commercial variety strawberry pre-mycorrhized with *Rhizophagus intraradices* and inoculated with PGPR's to the attack of *Phytophthora capsici*. Non-inoculated plants (T1), plants inoculated with *P. capsici* (T2), plants inoculated with only PGPR's (T3), plants inoculated with PGPR's+*P. capsici* (T4), plants inoculated with only *R. intraradices* (T5), plants inoculated with *R. intraradices*+*P. capsici* (T6), plants inoculated with *R. intraradices*+PGPR's (T7) and plants inoculated with *R. intraradices*, PGPR's+*P. capsici* (T8).

implicadas directamente en la defensa de la planta (Lemanceau y Alabouvette, 1993).

### Área foliar, peso de biomasa seca de la parte aérea, volumen radical y número de estolones

Las plantas inoculadas con PGPR's + *R. intraradices* mostraron mayor área foliar (239.95 cm<sup>2</sup>), peso de biomasa seca (6.24 g) y volumen radical (2.1 mL) (Cuadro 2). Estos resultados coinciden con lo reportado por Vosatka *et al.* (2000) y Linderman (1993), quienes mencionan que el uso de simbioses mutualistas en conjunto (fijadores de nitrógeno de vida libre como *Pseudomonas* y *Bacillus*) repercute en el aumento del crecimiento y producción de plantas. Además, la asociación simbiótico-mutualista en raíces de plantas frutícolas produce diversos cambios o modificaciones fisiológicas y sobresale el aumento en la actividad fotosintética debido a la mayor capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000); por lo tanto, aumentan las tasas de biomasa seca producida (Alarcón *et al.*, 2000). Según Díaz *et al.* (2013), la simbiosis con HMA aporta beneficios en la planta hospedante, como aumento del crecimiento y mayor nutrición mineral.

El crecimiento y la nutrición de las plantas (Cuadro 2) fue mejorada por la producción rizobacteriana de reguladores del crecimiento, como lo reportan Molina-Romero *et al.* (2015). Las plantas inoculadas con PGPR's + *R. intraradices* produjeron cinco estolones, las plantas inoculadas con *R. intraradices* tres, y las plantas inoculadas con PGPR's, solo uno. Este

PGPR's suppress diseases caused by pathogenic microorganisms with the production of siderophores, synthesis of antibiotics, enzymes, or fungicidal compounds or both (Lugtenberg and Kamilova, 2009). For example, *Pseudomonas* and *Bacillus* can control pathogens, particularly fungi, synthesizing antifungal molecules (Whipps, 2001). Bacteria of the genus *Pseudomonas* induce plant resistance by increasing the speed and levels of synthesis of phytoalexins, substances directly implied in the plant's defense (Lemanceau and Alabouvette, 1993).

### Foliar area, dry biomass weight of the aerial part, radical volume, and number of stolons

Plans inoculated with PGPR's + *R. intraradices* showed greater foliar areas (239.95 cm<sup>2</sup>), dry biomass weight (6.24 g) and root volume (2.1 mL) (Table 2). These results coincide with reports by Vosatka *et al.* (2000) and Linderman (1993), who state that the use of joint mutualistic symbionts (nitrogen fixers in free life such as *Pseudomonas* and *Bacillus*) affects the increase in plant growth and production. Also, the symbiotic-mutualistic relationship in the roots of fruit-producing plants leads to diverse physiological changes or modifications and highlights the increase in photosynthetic activity due to the greater CO<sub>2</sub> fixation capacity (Alarcón and Ferrera-Cerrato, 2000); therefore, the rates of dry biomass produced increase (Alarcón *et al.*, 2000). According to Díaz *et al.* (2013), the symbiosis with AMF provides benefits

**Cuadro 2. Variables de crecimiento de plantas de fresa precorrizadas e inoculadas con PGPR's (*Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus* y *Paenibacillus* sp.) en respuesta al ataque de *Phytophthora capsici*.**

**Table 2. Growth variables in pre-mycorrhized strawberry plants inoculated with PGPR's (*Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp.) in response to the attack of *Phytophthora capsici*.**

Tratamiento	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Materia seca (g)	Volumen radical (mL)
Testigo negativo (sin inocular)	170.74±30.92 ab	5.80±0.26 ab	0.90±0.12 bc
Testigo positivo (inoculado con <i>P. capsici</i> )	93.77±5.64 b	5.24±0.28 b	0.33±0.08 c
Plantas inoculadas con PGPR's	174.92±19.24 ab	5.56±0.13 ab	0.90±0.12 bc
Plantas inoculadas con PGPR's y <i>P. capsici</i>	189.28±27.26 ab	5.97±0.17 ab	0.90±0.15 bc
Plantas inoculadas con <i>R. intraradices</i>	189.72±10.36 ab	5.54±0.20 b	1.36±0.17 b
Plantas inoculadas con <i>R. intraradices</i> y <i>P. capsici</i>	128.36±17.97 b	5.54±0.21 ab	0.80±0.10 bc
Plantas inoculadas con PGPR's y <i>R. intraradices</i>	239.95±24.29 a	6.24±0.19 a	2.10±0.31 a
Plantas inoculadas con PGPR's, <i>R. intraradices</i> y <i>P. capsici</i>	167.43±27.85 ab	5.60±0.22 ab	0.80±0.10 bc

Medias con letras diferentes en una columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05). ± desviación estándar; n: 6 repeticiones por tratamiento ❖ Averages with different letters in a column are statistically different (p≤0.05). ± standard deviation; n: 6 repetitions per treatment.

resultado puede deberse a la síntesis de reguladores del crecimiento como giberelinas y citocininas (Alarcón *et al.*, 2000). En los otros tratamientos no hubo producción de estolones.

### Contenido de nitrógeno (N) y fósforo (P)

La concentración de N y P en el follaje no fue diferente ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos (Cuadro 3), aunque las PGPR's facilitan el crecimiento de las plantas proveyendo directamente N, P y minerales esenciales (Ahemad y Kibret, 2014). Las PGPR's pueden fijar el N atmosférico debido a la presencia de la enzima nitrogenasa y así tornan accesible este N para las plantas con las cuales se asocian (Gupta *et al.*, 2015). Las tres especies de PGPR's usadas en nuestro estudio (*B. pumilus*, *P. tolassi* y *Paenibacillus* sp.) están reportadas como bacterias no simbióticas fijadoras de N (Hernández *et al.*, 2009; Glick *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2014). No hubo diferencias significativas en la concentración de N en el follaje y el valor numéricamente más alto ( $1400 \text{ mg kg}^{-1}$ ) se presentó en las plantas inoculadas solo con las PGPR's. Las PGPR's fijadoras de N no simbióticas suplen solo pequeñas cantidades del N fijado a la planta hospedera (Glick, 2012). Además, el bajo aporte de N vía bacteriana es afectado por las condiciones ambientales, como altas concentraciones de  $\text{O}_2$  en la atmósfera del suelo, las cuales inhiben a la nitrogenasa (Alquères *et al.*, 2010), o altas concentraciones de  $\text{H}_2$  y  $\text{NO}$  que compiten con el sustrato de la nitrogenasa (Hichri *et*

in the host plant, such as increase in growth and mineral nutrition.

Plant growth and nutrition (Table 2) was improved by the rhizobacterial production of growth regulators, as reported by Molina-Romero *et al.* (2015). Plants inoculated with PGPR's + *R. intraradices* produced five stolons, plants inoculated with *R. intraradices* produced three, and plants inoculated with PGPR's, only one. This result may be due to the synthesis of growth regulators such as gibberellins and cytokinins (Alarcón *et al.*, 2000). In the other treatments there was no stolon production.

### Nitrogen (N) and phosphorous (P) contents

The concentration of N and P in the foliage was not different ( $p > 0.05$ ) between treatments (Table 3), although PGPR's promote plant growth by directly providing N, P, and essential minerals (Ahemad and Kibret, 2014). PGPR's can fix atmospheric nitrogen due to the presence of the enzyme nitrogenase, making this N accessible to plants with which they associate (Gupta *et al.*, 2015). The three species of PGPR's used in our study (*B. pumilus*, *P. tolassi*, and *Paenibacillus* sp.) are reported as non-symbiotic N-fixating bacteria (Hernández *et al.*, 2009; Glick *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2014). There were no significant differences in the concentration of N in the foliage and the highest value ( $1400 \text{ mg kg}^{-1}$ ) was observed in plants inoculated only with PGPR's. The non-symbiotic, N-fixating PGPR's only provide

**Cuadro 3. Concentración de N y P en plantas de fresa premicorrizadas e inoculadas con PGPR's en respuesta al ataque de *Phytophthora capsici*.**

**Table 3. Concentration of N and P in strawberry plants, pre-mycorrhized and inoculated with PGPR's in response to the attack of *Phytophthora capsici*.**

Tratamiento	Nitrógeno (N) $\text{mg kg}^{-1}$	Fósforo (P) $\text{mg kg}^{-1}$
Testigo negativo (sin inocular)	$1.18 \pm 0.09$	$0.73 \pm 0.10$
Testigo positivo (inoculado con <i>P. capsici</i> )	$0.97 \pm 0.11$	$0.62 \pm 0.18$
Plantas inoculadas con PGPR's	$1.40 \pm 0.12$	$0.63 \pm 0.15$
Plantas inoculadas con PGPR's y <i>P. capsici</i>	$0.83 \pm 0.15$	$0.43 \pm 0.06$
Plantas inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i>	$0.93 \pm 0.11$	$0.68 \pm 0.05$
Plantas inoculadas con <i>R. intraradices</i> y <i>P. capsici</i>	$1.38 \pm 0.17$	$0.63 \pm 0.08$
Plantas inoculadas con PGPR's y <i>R. intraradices</i>	$0.90 \pm 0.10$	$0.58 \pm 0.11$
Plantas inoculadas con PGPR's, <i>R. intraradices</i> y <i>P. capsici</i>	$1.37 \pm 0.15$	$0.64 \pm 0.09$

No hay diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ).  $\pm$  desviación estándar; n: 4 repeticiones por tratamiento ❖ There are no statistical differences between treatments ( $p > 0.05$ ).  $\pm$  standard deviation; n: 4 repetitions per treatment.

*al.*, 2015; Gabrielyan *et al.*, 2015). La inoculación del HMA y las PGPR's no aumentaron ( $p > 0.05$ ) el P en el follaje debido a su alta reactividad con Fe, Al y Ca y a su consecuente precipitación. Los rangos de precipitación pueden ser hasta 90 % (Adesemoye *et al.*, 2008); además, el suelo y las condiciones ambientales impactan en la eficiencia de las PGPR's y los HMAs (Adesemoye *et al.* (2008).

En plantas inoculadas con HMA+PGPR's se registró el mayor crecimiento. Los géneros *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Bacillus* liberan ácido indol-acético (AIA), giberelinas o citoquininas en la rizosfera de las plantas y ejercen un efecto estimulador del crecimiento, en especial si están en estado de plántula (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Además, algunas PGPR's producen enzimas que favorecen crecimiento y desarrollo de la planta, mediante la disminución de los niveles de etileno. Tales bacterias ocupan el etileno, precursor ACC, y lo convierten en 2 oxobutanoato y  $\text{NH}_3$  (Glick *et al.*, 2007).

### Colonización micorrízica

En la colonización micorrízica total no hubo diferencia estadística entre los tratamientos. El valor numérico más alto (70 %) se registró en el tratamiento de plantas premicorrizadas con *R. intraradices* e inoculadas con PGPR's, y el más bajo (39.75 %) en las plantas inoculadas con *R. intraradices*+*P. capsici* (Cuadro 4). Frey-Klett *et al.* (2007) reportan el involucramiento de diferentes géneros de PGPR's del suelo en el proceso de colonización micorrízica; a este grupo de PGPR's se les denomina bacterias ayudadoras de la micorrización. Los porcentajes más altos

small amounts of the N fixated onto the host plant (Glick, 2012). Also, the low contribution of N by bacteria is affected by environmental conditions, such as high concentrations of  $\text{O}_2$  in the soil atmosphere, which inhibit nitrogenase (Alquères *et al.*, 2010), or high concentrations of  $\text{H}_2$  and NO that compete with the substrate of nitrogenase (Hichri *et al.*, 2015; Gabrielyan *et al.*, 2015). The inoculation of HMA and PGPR's did not increase ( $p > 0.05$ ) the P in the foliage due to its high reactivity with Fe, Al, and Ca and to its resulting precipitation. The ranges of precipitation may be up to 90 % (Adesemoye *et al.*, 2008); likewise, the soil and the environmental conditions impact the efficiency of PGPR's and HMAs (Adesemoye *et al.*, 2008).

The highest growth rate was registered in plants inoculated with HMA+PGPR's. Genera *Pseudomonas*, *Azotobacter*, and *Bacillus* release indole-3-acetic acid (AIA), gibberellins or cytokinins in the rhizosphere of plants and they exert a growth-stimulating effect, particularly in the plantlet stage (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Also, some PGPR's produce enzymes that favor plant growth and development with the reduction of ethylene. Such bacteria take ACC, the precursor of ethylene, and turn it into 2 oxobutanoate and  $\text{NH}_3$  (Glick *et al.*, 2007).

### Mycorrhizal colonization

For total mycorrhizal colonization there was no statistical differences between treatments. The highest numerical value (70 %) was registered in the treatment of plants premycorrhized with *R.*

**Cuadro 4. Porcentaje de colonización micorrízica en plantas de fresa inoculadas con *Rhizophagus intraradices*, PGPR's y *Phytophthora capsici* en cámara de ambiente controlado.**

**Table 4. Percentage of mycorrhizal colonization in strawberry plants inoculated with *Rhizophagus intraradices*, PGPR's and *Phytophthora capsici* in a controlled environment growth chamber.**

Tratamiento	Colonización micorrízica total (%)	Vesículas (%)	Hifas (%)	Esporas (%)
Plantas inoculadas con <i>R. intraradices</i>	59.00±2.50	20.00±2.82	19.00±2.00	20.00±3.96
Plantas inoculadas con <i>R. intraradices</i> y <i>P. capsici</i>	39.75±1.65	24.75±4.52	13.00±2.39	2.00±1.58
Plantas inoculadas con PGPR's y <i>R. intraradices</i>	70.00±0.66	43.00±2.30	19.00±1.30	8.00±0.84
Plantas inoculadas con PGPR's, <i>R. intraradices</i> y <i>P. capsici</i>	55.00±1.02	43.00±1.95	8.00±1.87	4.00±0.55

No hay diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ).  $\pm$  desviación estándar; n: 5 repeticiones por tratamiento  $\spadesuit$  There are no statistical differences between treatments ( $p > 0.05$ ).  $\pm$  standard deviation; n: 5 repetitions per treatment.

de colonización total, vesículas e hifas en nuestro experimento se obtuvieron cuando se inocularon las PGPR's (Cuadro 4). Probablemente, estas bacterias promovieron la colonización micorrizica, pero no la esporulación en las plantas de fresa.

Las vesículas fueron las estructuras predominantes y el número fue el mismo en las plantas inoculadas con *R. intraradices* y plantas inoculadas con PGPR's+*R. intraradices* (Figura 5).

## CONCLUSIONES

*Phytophthora capsici* cepa PcT17 fue patogénica para las plantas de fresa de la variedad comercial Festival. Las PGPR's (*Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus* y *Paenibacillus* sp.) inhibieron el crecimiento *in vitro* del oomiceto. *Rhizophagus intraradices* y las PGPR's (*Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus* y *Paenibacillus* sp.) redujeron la incidencia y severidad de *Phytophthora capsici* bajo condiciones controladas.

En el tejido vegetal aéreo no aumentó la concentración de N y P, lo cual es contrario a lo reportado en otros estudios. El mayor crecimiento en las plantas inoculadas con HMA y PGPR's probablemente se debe a la producción de reguladores del crecimiento vegetal, lo cual está documentado en los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento para realizar la presente investigación.

Al Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304, para el establecimiento y operación de los fondos para la

*intraradices* and inoculated with PGPR's, and the lowest (39.75 %), in plants inoculated with *R. intraradices*+*P. capsici* (Table 4). Frey-Klett *et al.* (2007) report the involvement of different genera of soil PGPR's in the mycorrhizal colonization process; this group of PGPR's is known as mycorrhization helper bacteria. The highest percentages of total colonization, vesicles and hyphae in our experiment were obtained when PGPR's were inoculated (Table 4). Probably, these bacteria promoted mycorrhizal colonization, but not sporulation in strawberry plants.

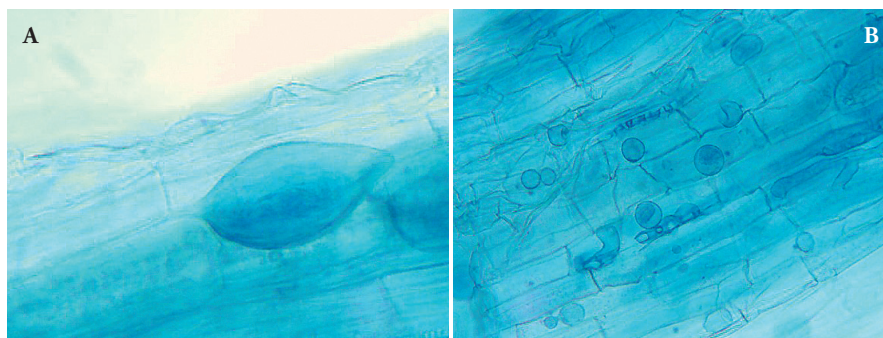
Vesicles were the predominant structures and the number was the same in plants inoculated with *R. intraradices* and plants inoculated with PGPR's+*R. intraradices* (Figure 5).

## CONCLUSIONS

*Phytophthora capsici* strain PcT17 was pathogenic for Festival commercial variety strawberry plants. The PGPR's (*Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus*, and *Paenibacillus* sp) inhibited the growth *in vitro* of the oomycetes. *Rhizophagus intraradices* and the PGPR's (*Pseudomonas tolassi*, *Bacillus pumilus*, and *Paenibacillus* sp.) reduced the incidence and severity of *Phytophthora capsici* under controlled conditions.

In aerial plant tissue, the concentrations of N and P did not increase, in contrast to reports of other studies. The greatest growth in plants inoculated with HMA and PGPR's is probably due to the production of plant growth regulators, which is documented in genera *Pseudomonas* and *Bacillus*.

—End of the English version—



**Figura 5. Vesículas (A) y esporas (B) encontradas en raíces de plantas de fresa inoculadas con *Rhizophagus intraradices* y PGPR's (100X y 40X, respectivamente).**

**Figure 5. Vesicles (A) and spores (B) found in strawberry plant roots inoculated with *Rhizophagus intraradices* and PGPR's (100X y 40X, respectively).**

investigación científica y desarrollo tecnológico del Centro Público Colegio de Postgraduados, modalidad 3: "Financiamiento a proyectos de investigación de tesis en maestría en ciencias".

## LITERATURA CITADA

- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert, and J. W. Kloepper. 2008. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Can. J. Microbiol.* 54: 876-886.
- Adorada, D. L., C. L. Billes, C. M. Liddell, S. Pvia-Fernandez, K. O. Waugh, and M. E. Waugh. 2000. Susceptibility of wounded pepper roots to *Phytophthora capsici*. *Plant Pathol.* 49: 719-726.
- Ahemad, M., and M. Kibret, 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud University – Sci.* 26: 1-20.
- Alarcón, A., R. Ferrera-Cerrato, M. C. González-Chávez, y A. Villegas-Monter. 2000. Hongos micorrízicos arbusculares en la dinámica de aparición de estolones y nutrición de plantas de fresa cv. fern obtenidas por cultivo *in vitro*. *Terra Latinoam.* 18: 4-8.
- Alarcón, A., y R. Ferrera-Cerrato. 2000. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoam.* 17: 179-191.
- Alquéres, S. M. C., J. H. M. Oliveira, E. M. Nogueira, H. V. Guedes, P. L. Oliveira, F. Cámara, J. I. Baldani, and O. B. Martins. 2010. Antioxidant pathways are up-regulated during biological nitrogen fixation to prevent ROS-induced nitrogenase inhibition in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* 192: 835-841.
- Artursson, V., R. D. Finlay, and J. K. Jansson. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ. Microbiol.* 8: 1-10.
- Biermann, B., and R. G. Linderman. 1981. Quantifying vesicular arbuscular mycorrhizae: A proposed method towards standardization. *New Phytologist.* 97: 63-67.
- Bonfante, P., and I. Anca. 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Rev. Microbiol.* 63: 363-383.
- Bremner, J. M. 1975. Total nitrogen. *In: C. A. Black (ed). Methods of Soil Analysis Part 2. Agronomy* 9: 1149-1178.
- Callaghan S. E., A. P. Williams, T. Burgess, D. White, T. Keovorlajak, P. Phitsanoukane, S. Phantavong, S. Vilavong, K. B. Ireland, G. S. Duckitt, and L. W. Burgess. 2016. First report of *Phytophthora capsici* in the Lao PDR. *Austr. Plant Dis. Notes* 11: 22.
- Díaz, F. A., C. M. Alvarado, C. F. Ortiz, y C. O. Grageda. 2013. Nutrición de la planta y calidad del fruto de pimiento asociado con micorriza arbuscular en invernadero. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 4: 315-321.
- Dorantes, G., N. C. Abud, y F. P. Pavía. 2008. Reducción de la susceptibilidad a *Phytophthora capsici* Leonian causante de la pudrición de raíz en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Biológicas* 10: 100-108.
- Fernandes, G. C., L. J. Trarbacha, B. Samanta, S. B. de Campos, A. Beneduzi, and L. M. P. Passaglia. 2014. Alternative nitrogenase and pseudogenes: unique features of the *Paenibacillus riograndensis* nitrogen fixation system. *Res. Microbiol.* 165: 571-580.
- Frey-Klett, M., J. Garbaye, and M. Takka. 2007. The mycorrhizal helper bacteria revisited. *Tansley review. New Phytol.* 176: 22-36.
- Gabrielyan, L., H. Sargsyan, and A. Trchounian. 2015. Novel properties of photofermentative biohydrogen production by purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*: effects of protonophores and inhibitors of responsible enzymes. *Microb. Cell Fact.* 14: 131.
- Glick, B. R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica* 2012: 15 pages.
- Glick, B. R., Z. Cheng, J. Czarny, and J. Duan. 2007. Promoting of plant growth by ACC deaminase producing soil bacteria. *Plant Pathol.* 119: 329-39.
- Granke, L. L., M. L. Quesada-Ocampo, y M. K. Hausbeck. 2012. Differences in virulence of *Phytophthora capsici* isolates from a worldwide collection on host fruits. *Eur. J. Plant Pathol.* 132: 281-296.
- Gupta, G., S. S. Parihar, N. K. Ahirwar, S. K. Snehi, and V. Singh. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microb. Biochem. Technol.* 7: 096-102.
- Hernandez, J. P., L. E. de-Bashan, D. J. Rodriguez, Y. Rodriguez, and Y. Bashan. 2009. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *Eur. J. Soil Biol.* 45: 88-93.
- Hewitt, E. J. 1966. The composition of the nutrient solution. *In: Hewitt, E. J. (ed). Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition.* Farnham Royal, England. pp: 187-246.
- Hichri, I., A. Boscari, C. Castella, M. Rovere, A. Puppo, and R. Brouquisse. 2015. Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis. *J. Exp. Bot.* 66: 2877-2887.
- Kessel, D. A. 2012. Mejora genética de la fresa (*Fragaria ananassa* × Duch.) a través de métodos biotecnológicos. *Cultivos Trop.* 33(3): 34-41.
- Landa, B., A. Hervás, W. W. Bettiol, and R. Jiménez-Díaz. 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceris. *Phytoparasitica* 25: 305-318.
- Lemanceau, P., and C. Alabouvette. 1993. Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. *Biocontrol Sci. Tech.* 3: 219-34.
- Linderman, R. G. 1993. Effects on microbial interactions in the mycorrhizosphere of plant growth and health. *In: Ferrera-Cerrato, R., y R. Quintero L. (eds). Agroecología, Sostenibilidad y Educación.* Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp: 138-152.
- Lugtenberg, B., and F. Kamilova. 2009. Plant growth promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- Matsubara, Y., Y. Li, T. Okada, and M. A. Maya. 2012. Factors on induced systemic disease resistance in mycorrhizal strawberry plants. *In: Mezzetti, B., and P. Brás de Oliveira (eds). Proc. XXVIII<sup>th</sup> IHC- Int. Berry Symp. Acta Hort.* 926: 497-502.
- Molina-Romero, A., M. R. Bustillos-Cristales, O. Rodríguez-Andrade, Y. E. Morales-García, Y. Santiago-Saenz, M.

- Castañeda-Lucio, y J. Muñoz-Rojas. 2015. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas* 17: 24-34.
- Nadeem, S. M, Z. A. Zahir, M. Naveed, and M. Ashraf. 2014. Microbial ACC-deaminase: prospects and applications for inducing salt tolerance in plants. *Crit Rev. Plant Sci.* 29: 360-93.
- Norman, J., and E. Hooker. 2000. Sporulation of *Phytophthora fragariae* shows greater stimulation by exudates of non-mycorrhizal than by mycorrhizal strawberry roots. *Mycol Res.* 104: 1069-1073.
- Ochoa, M. C., R. P. Madrigal, M. T. Martínez, y A. Carreón. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12: 65-71.
- Phillips, J. M., and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Ramyabharathi, S. A., and T. Raguchander. 2014. Characterization of antifungal antibiotic synthesis genes from different strains of *Bacillus subtilis*. *J. Pure Appl. Microbiol.* 8: 2337-2344.
- Sánchez, R. G. 2008. La red de valor fresa: Sistema de inteligencia de mercados. Fundación Produce Michoacán. 145 p.
- Sanogo, S., and P. W. Bosland. 2013. Biology and management of *Phytophthora capsici* in the Southwestern USA. In: Lamour, K. (ed). *Phytophthora: A Global Perspective*. CABI Plant Protection Series, Oxfordshire. pp: 87-95.
- SAS Institute Inc. 2002. The SAS system for Windows version 9.0 SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Cierre de la producción agrícola por estado <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (Consulta: Julio 2016).
- Sicuia, O-A., I. Grosu, F. Constantinescu, C. Voaides, and C. P. Cornea. 2015. Enzymatic and genetic variability in *Bacillus* spp. strains with plant beneficial qualities. *AgroLife Scient. J.* 4: 124-131.
- Vosatka, M., M. Gryndler, J. Jansa, and M. Vohnik. 2000. *Post vitro* mycorrhization and bacterization of micropropagated strawberry, potato and azalea. *Acta Hort.* 530: 313-324.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487-511.