

Revista Científica y Tecnológica UPSE

Biocontrol del marchitamiento vascular del frijol, causado por *Fusarium oxysporum* empleando Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

Biocontrol of bean vascular wilt, caused by *Fusarium oxysporum* using Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)



Reyes-Córdova, M.^{1*}, Soto-Valenzuela, J.², Zúñiga-Dávila, D.¹, Cadenas-Giraldo, CA.³

¹ Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina (Perú).

² Universidad Estatal Península de Santa Elena (Ecuador).

³ Universidad Nacional Agraria La Molina (Perú).

Resumen

La marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* en *Phaseolus vulgaris* (frijol común) es un problema fitosanitario que afecta directamente al rendimiento y economía de los agricultores, para su control se emplean productos químicos de contacto; sin embargo, una alternativa a este uso es el biocontrol, empleando rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) con buena capacidad antagonista. En este trabajo se comparó géneros bacterianos con características PGPR; *Bacillus* (*Bacillus* sp. "a", *Bacillus* sp. "b", *Rhizobium*, *Actinobacteria* (*Streptomyces* sp.) y *Azotobacter*. Prochloraz como control químico y a *Bacillus subtilis* como control positivo. Como mejor candidato PGPR y biocontrol tenemos a la cepa de *Bacillus* "a" (IBAC0212), con una incidencia de 61.54% en parámetros agronómicos de 0.42g y 17.23cm de peso seco y longitud total. Seguido de *Rhizobium* (CIAT899) y de la *Actinobacteria* (QP12) los cuales tuvieron una severidad 3 e incidencia antagonista de 76.93%, peso seco 0.34 y 0.31 g y una longitud total de 18 y 17 cm, respectivamente. La *Azotobacter* (QZ1) mostró buen desempeño PGPR. con un peso seco de 0.38g. El objetivo de este trabajo fue evaluar el biocontrol de las cepas con potencial PGPR frente a *F. oxysporum*.

Palabras clave:

PGPR,
biocontrol,
Bacillus,
Fusarium oxysporum,
Phaseolus vulgaris

Abstract

The vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) is a phytosanitary problem that directly affects the yield and farmers economy. , for its control chemical contact products are used. However, an alternative to this use is biocontrol, using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) with good antagonistic capacity. In this work we compare bacterial genera with PGPR characteristics; *Bacillus* (*Bacillus* sp. "A", *Bacillus* sp. "B", *Rhizobium*, *Actinobacteria* (*Streptomyces* sp.) and *Azotobacter*. Prochloraz as chemical control and *Bacillus subtilis* as positive control. As best candidate PGPR and biocontrol we have to *Bacillus* "a" (IBAC0212), with an incidence of 61.54% in agronomic parameters of 0.42g and 17.23cm of dry weight and total length, followed by *Rhizobium* (CIAT899) and *Actinobacteria* (QP12) which has a severity of grade 3 and incidence antagonistic of 76.93%, dry weight 0.34 and 0.31 g and a total length of 18 and 17 cm, respectively, *Azotobacter* (QZ1) showed good performance PGPR with a dry weight of 0.38g. The objective of this work was to evaluate the biocontrol of the strains with PGPR potential against *F. oxysporum*.

Keywords:

PGPR,
biocontrol,
Bacillus,
Fusarium oxysporum,
Phaseolus vulgaris

Recibido: 10 de abril de 2019

Aceptado: 29 de mayo de 2019

Forma de citar: Reyes, M., Soto, J., Zúñiga, D., Cadenas, CA. (2019). Biocontrol del marchitamiento vascular del frijol, causado por *Fusarium oxysporum* empleando Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR). *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 6 (1), 9-16. DOI: 10.26423/rctu.v6i1.445

* Autor para correspondencia. María Reyes Córdova: 20150718@lamolina.edu.pe

1. Introducción

En Perú se cultivan aproximadamente 2000 hectáreas de doce especies comerciales de leguminosas, siendo el *Phaseolus vulgaris* el de mayor demanda, por su alto contenido en nutrientes y bajo costo. Uno de los problemas fitosanitarios de gran importancia en este cultivo es el marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum*, un hongo saprófito, capaz de sobrevivir y crecer por largos períodos de tiempo en el material orgánico del suelo (Fravel *et al.*, 2002). Este patógeno presenta estructuras de resistencia llamadas Clamidosporas que germinan produciendo micelio y esporas, las cuales penetran en las raíces a través de heridas ocasionadas por el manejo agronómico, insectos, nemátodos o por las raíces secundarias al emerger (Zapata *et al.*, 2012).

La marchitez vascular en frijol es la enfermedad más limitante en el proceso productivo, causando grandes pérdidas económicas debido a su alto porcentaje de incidencia y severidad (Galindo y Pardo, 2010; García, 2018), llegando a una pérdida del rendimiento del 53% (Navarrete-Maya *et al.*, 2009). El manejo convencional de esta enfermedad por los agricultores es difícil, teniendo que recurrir al uso de fungicidas que a veces, resultan deficientes, incrementan los costos de producción, contribuyen a la contaminación ambiental y deterioran la biota del suelo.

Por ello, ante las limitaciones en el manejo de la enfermedad, surge la necesidad de plantear alternativas sustitutivas o complementarias a las existentes, como el biocontrol o control biológico, importante para la recuperación del equilibrio de los agroecosistemas y para el aprovechamiento del potencial antagonista natural de ciertos microorganismos contra patógenos vulnerables. El biocontrol es el componente del manejo integrado de enfermedades mediante el uso de organismos vivos tipo PGPR, con el fin de suprimir la densidad poblacional o el impacto de un organismo patógeno específico, haciéndolo menos dañino (Avendaño y Arbeláez, 2006; Mejía-Bautista, 2016).

Las PGPRs actúan como fitoestimulantes produciendo sustancias bioactivas para incrementar el crecimiento de las plantas, además las protegen contra los patógenos por interacciones de antagonismo directo o indirecto. Dentro de estos se encuentran: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Actinomicetos*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcosa*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* entre otros (Bruto *et al.*, 2014).

El control de los fitopatógenos mediante el uso de microorganismos antagonistas es una práctica mundial, lo que ha llevado a la investigación y búsqueda de nuevos aislamientos que sean efectivos en el control biológico (Flores y Roque, 2017).

En el presente trabajo se evalúan en condiciones de invernadero, el efecto biocontrolador de cuatro géneros de PGPR en el marchitamiento vascular del fríjol, ocasionado por *F. oxysporum* como contribución al desarrollo alternativo del manejo integrado de la enfermedad.

2. Materiales y métodos

2.1 Ubicación

El ensayo en vivo se llevó a cabo en el invernadero de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM, Lima-Perú). Los géneros con características PGPR: *Bacillus* (a y b), *Rhizobium*, *Streptomyces* y *Azotobacter* fueron obtenidas del banco de cepas del laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología (LEMYB) (Dpto. Biología, Facultad de Ciencias, UNALM).

2.2 Material biológico y medios de cultivo

2.2.1 Germinación de semillas

Se evaluó el porcentaje de germinación (85%) de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) var. canario, obtenidas del Programa de Leguminosas de la UNALM, pregerminadas por 3 días, con una radícula de 2 cm (Zúñiga, 2012).

2.3 Reactivación y preparación de inóculos

Las cepas bacterianas fueron reactivas en Agar levadura Manitol (LMA) por 3 días, luego sembradas en 15 ml de Caldo Levadura Manitol (LMC) a 28 °C por 2 días, a una OD de 0.5 y una concentración de 10⁸ UFC/ml.

La cepa de *F. oxysporum* fue reactivada en el LEMYB, en Agar Papa Dextrosa (PDA) por una semana a 25 °C y luego repicado en placas de Agar Avena (OMA), con 10 ml de solución salina estéril y se recuperaron las esporas en un recipiente estéril.

Las esporas se cuantificaron en cámara de Neubauer y se diluyeron hasta obtener 10⁶ conidias/ml.

2.4 Experimento en invernadero

Se trabajó con sustrato de jardín tamizado para maceta, que consiste en musgo y suelo de chacra (1:1), obtenidos del Programa de Ornamentales (UNALM), esterilizado por 2 días a 121 °C.

En una maceta de 900 g con el sustrato preparado, se sembraron 2 semillas pre germinadas, se inculó 1 ml de caldo bacteriano a cada maceta. Al control químico se le agregó 0.45 g/ml de Prochloraz. Transcurridas

cinco semanas se le inoculó el patógeno, inyectando 10 ml de la solución en el cuello de planta (Figura.1).



Figura 1. Inoculación de los tratamientos con 10 ml de la solución fúngica.

Las macetas se distribuyeron en el invernadero en arreglo completamente al azar (DCA). Se proporcionó las condiciones adecuadas para el desarrollo de las plantas con un riego a demanda.

2.5 Datos agronómicos a evaluar

Peso seco, peso fresco, longitud total de raíz y tallo.

2.6 Grado de severidad

La incidencia de las pudriciones de raíz se calculó con la fórmula de Van der Plank(1975):

$$I = PE / PT \times 100$$

Donde, I = índice de incidencia (%), PE= número de plantas afectadas y PT= número total de plantas.

2.7 Diseño experimental

Se probaron nueve tratamientos con cinco cepas obtenidas del banco de cepas: QP12, Actinobacteria (*Streptomyces*) (1); IBAC0212, *Bacillus* “a” (2); *Bacillus* “b” (5); CIAT899, *Rhizobium* (3); QZ1, *Azotobacter* (6); una cepa comercial de *Bacillus subtilis* (10g/LSL) (8×10^8 UFC/ml) (4) usado como control positivo.

Un control químico con Prochloraz (450 g/L EC) (7), un control sin inocular (H-) (8) y un control inoculado con el hongo *Fusarium* (H+) (9).

Empleando un diseño DCA y distribuidos en tres bloques, se realizaron 13 repeticiones con 2 plantas en cada maceta.

2.8 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza, Anova ($p < 0.05$) y la comparación de medias

según test de rangos múltiples de Fisher (LSD), con el paquete estadístico Statgraphics versión 5.0, 2000.

3. Resultados y discusión

Los parámetros de temperatura durante el ensayo fueron de 22 °C promedio, máxima de 27 °C y mínima 16 °C.

Dos semanas después de la inoculación con el patógeno se procedió a evaluar los tratamientos, se observó marchites foliar, múltiples lesiones necróticas y de color rojizo en cuello de planta y pudrición radicular (Figura 2)

Se obtuvo una Anova de 0.002, con 6 grupos de diferente homogeneidad entre los tratamientos (Tabla 1).

En los parámetros agronómicos obtenidos, se destaca que *Bacillus* “a” generó mayor peso seco (0.42g), seguido de *Azotobacter* con 0.38g, y *Rhizobium* con 0.37g. En longitud total, el *Actinomiceto* con 18.0 cm, *Bacillus* “a” con 17.23 cm y *Rhizobium* con 17cm; mientras que en biocontrolador contra *F. oxysporum* se observa a *Bacillus* “a” con una severidad 5 y 61.54% de incidencia, seguido del *Actinomiceto* con severidad de 3 e incidencia del 76.93%, los cuales destacan frente a los demás tratamientos y controles (Tabla 2 y 3) (Figura 3 y 4).

De manera general se observa al *Bacillus* “a” con mejores características frente al control positivo (biocontrol), respaldado por la cepa comercial de *Bacillus subtilis* (4) del mismo género el cual tiene buen peso seco (0.32g), longitud total (19.38cm), índices de severidad (1) e incidencia (53.85%).

B. subtilis, es un género muy estudiado y conocido biocontrolador efectivo, con mecanismo de liberación de compuestos antifúngicos como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas, que actúan sobre la pared celular de los hongos (Fernández-Larrea, 2001).

El efecto biocontrolador de *B. subtilis* ha sido reportado sobre enfermedades tipo manchas foliares y tizón, que no son enfermedades producidas por *Fusarium*; sin embargo, no hay resultados que indiquen que es biocontrolador del hongo que produce la marchitez vascular (Guillen *et al.*, 2006). Las 2 cepas pertenecientes al género *Bacillus* “a” y “b” tuvieron un comportamiento distinto, pero con incidencia mayor al 50% (Tabla 2).

Por otro lado, resalta la eficacia de la Actinobacteria (*Streptomyces*), muy conocida por producir compuestos bioactivos con diferentes actividades antifúngicas y antivirales (Schumacher *et al.*, 2003), más del 75% de los antibióticos comercialmente útiles se derivan de este género (Peláez, 2006); muy valorado en el campo agrícola por su potencial control biológico contra los fitopatógenos (González-Franco y Robles-Hernández, 2009). También por producir metabolitos con actividad antimicrobiana, para biocontrol (Park *et al.*, 2002).

Enzimas extracelulares como quitinasas y β -1,3-glucanasas desempeñan una función significativa en la actividad antifúngica y biocontroladora, siendo responsables del micoparasitismo ejercido por ciertas cepas de *Streptomyces* y la supresión de enfermedades en las plantas (González *et al.*, 2004). En nuestro ensayo el tratamiento con Actinomiceto, mostró severidad de 3 e incidencia del 76.93% respecto al control inoculado.

Mejía-Bautista *et al.* (2016), evaluaron el antagonismo in vitro de diez cepas de *Bacillus* contra *Fusarium equiseti* ITCF1, mostrando 100% de incidencia de la enfermedad en plántulas de chile y severidad de 90.0 % por *F. solani* y 77.5 % por *F. equiseti*. En resistencia a la marchitez, cuatro cepas de *B. subtilis* CBMT51 y *B. cereus* BL18 redujeron la severidad de la enfermedad ocasionada por *F. equiseti* y la cepa BL18 para *F. solani*, en un 47.7, 37.8 y 50.9 % respectivamente. Valores muy cercanos a los obtenidos en este estudio.

Darío *et al.* (2011) evaluaron en PDA, la sensibilidad a *F. graminearum*, *F. avenaceum* y *F. verticillioides*, frente a varios fungicidas como Carbendazim, Tebuconazol, Flutriafol, Metconazol y Procloraz, destacando este último como el más efectivo. Sin embargo, en nuestro ensayo en maceta no se observó buenos resultados.

Existen pocos estudios sobre el potencial biocontrol de la bacteria simbiótica *Rhizobium* sobre *Fusarium*. En este trabajo no hubo presencia de nodulación efectiva, El exceso de materia orgánica u otros factores como temperatura, acidez o alcalinidad del sustrato, pueden inhibir la nodulación. A pesar de esta carencia, se observó un buen desempeño en el peso de las plantas con este tratamiento. Los PRGR hacen disponible los nutrientes presentes en el sustrato.

Tabla 1. Análisis de la severidad e incidencia de la marchitez vascular en frijol.

Tratamiento	Cantidad	Severidad media-severidad	Incidencia	T-Fisher
H-(8)	13	1.77 (1)	25.77	A
<i>Bacillus subtilis</i> (4)	13	1.92 (1)	53.85	Ab
Prochloraz (7)	13	2.69 (3)	69.23	Abc
Actinomiceto (1)	13	2.85 (3)	76.93	Abc
Rizobium (3)	13	3.15 (3)	76.93	Bcd
Bacillus a (2)	13	3.92 (5)	61.54	Cd
Azotobacter (6)	13	3.92 (5)	76.92	Cd
Bacillus b (5)	13	4.38 (7)	84.62	D
H+(9)	13	6.85 (9)	100.00	C

Tabla 2. Escala para determinar el grado de severidad del ataque de pudriciones de raíz en el cultivo del frijol, según Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987 modificado.

Grado severidad	Apariencia del daño
1	Sin síntomas visibles de la enfermedad.
3	1-3 Hojas con decoloración ligera, sin lesiones necróticas o con 10% de follaje marchito, clorótico y de la raíz cubiertos con lesiones.
5	Aproximadamente 25% de follaje marchito y la raíz están cubiertos con lesiones, con decoloración fuerte, aunque los tejidos estén fuertes.
7	Aproximadamente 50% de marchitez y clorosis, raíces están cubiertos con lesiones que se combinan con ablandamiento. Pudrición y reducción considerable del sistema radical.
9	Aproximadamente 75% o más de marchitez y clorosis, raíces afectadas por estados avanzados de pudrición, en combinación con una reducción severa del sistema radical.



Figura 2. Tratamientos con síntomas de la marchitez vascular a, b, c, e raíces con lesiones necróticas rojizas. Todos los tratamientos mostraron algún grado de marchitez

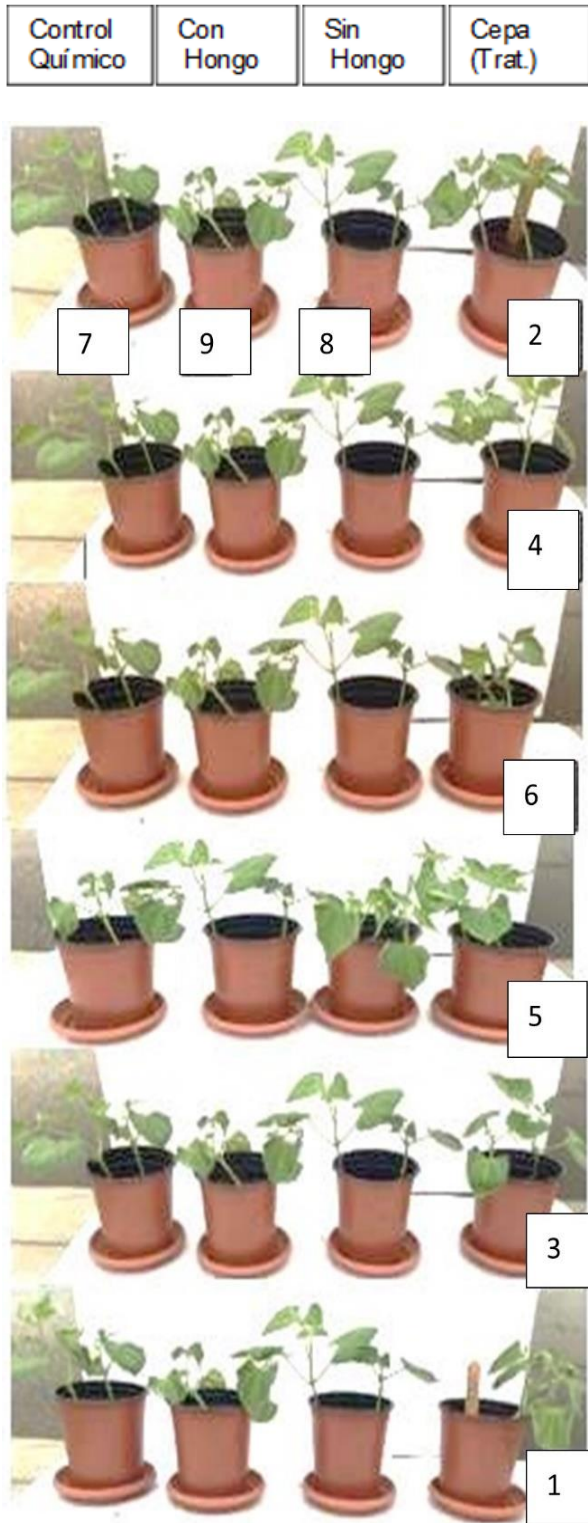


Figura 3. Tratamientos evaluados, Prochloraz (7), H+ (9) H- (8), Bacillus a (2), Bacillus subtilis (4), Azotobacter (6), Bacillus b (5), Rhizobium (3), Actinomiceto (1).

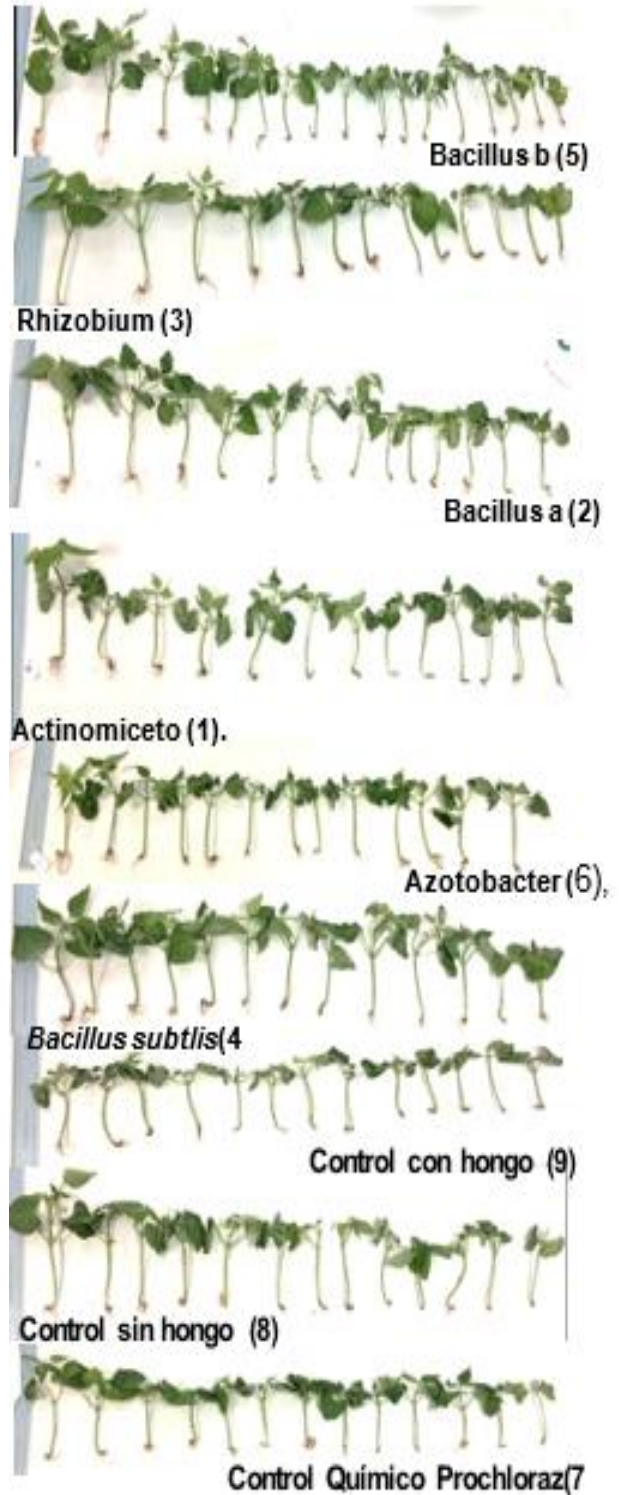


Figura 4. Tratamientos evaluados. La cepa *Bacillus a* (2), Actinomiceto (1) son relevantes respecto al comercial *B. subtilis*.

Tabla 3. Evaluación de las características agronómicas de las bacterias PGPR evaluadas.

Tratamiento	Peso seco tallo	Peso seco raíz	Peso seco total	Peso fresco tallo	Peso fresco raíz	Peso fresco total	Long. Tallo	Long. raíz	Long. total
<i>Actinomiceto</i> (1)	0.29	0.02	0.31	3.26	0.21	3.47	14.62	3.38	18.0
<i>Bacillus a</i> (2)	0.39	0.03	0.42	4.63	0.19	4.82	14.69	2.54	17.23
<i>Rhizobium</i> (3)	0.30	0.04	0.34	3.49	0.20	3.69	14.54	2.46	17.0
<i>B. subtilis</i> (4)	0.30	0.02	0.32	4.23	0.23	4.46	16.31	3.08	19.39
<i>Bacillus b</i> (5)	0.26	0.02	0.27	2.87	0.15	3.01	12.54	2.23	14.77
<i>Azotobacter</i> (6)	0.33	0.05	0.38	3.73	0.20	3.92	14.69	2.08	16.77
<i>Prochloraz</i> (7)	0.35	0.01	0.37	2.65	0.13	2.78	12.46	1.92	14.38
H- (8)	0.24	0.02	0.25	3.21	0.20	3.42	14.77	2.46	17.23
H+9	0.25	0.01	0.26	2.46	0.11	2.57	12.23	2.23	14.46

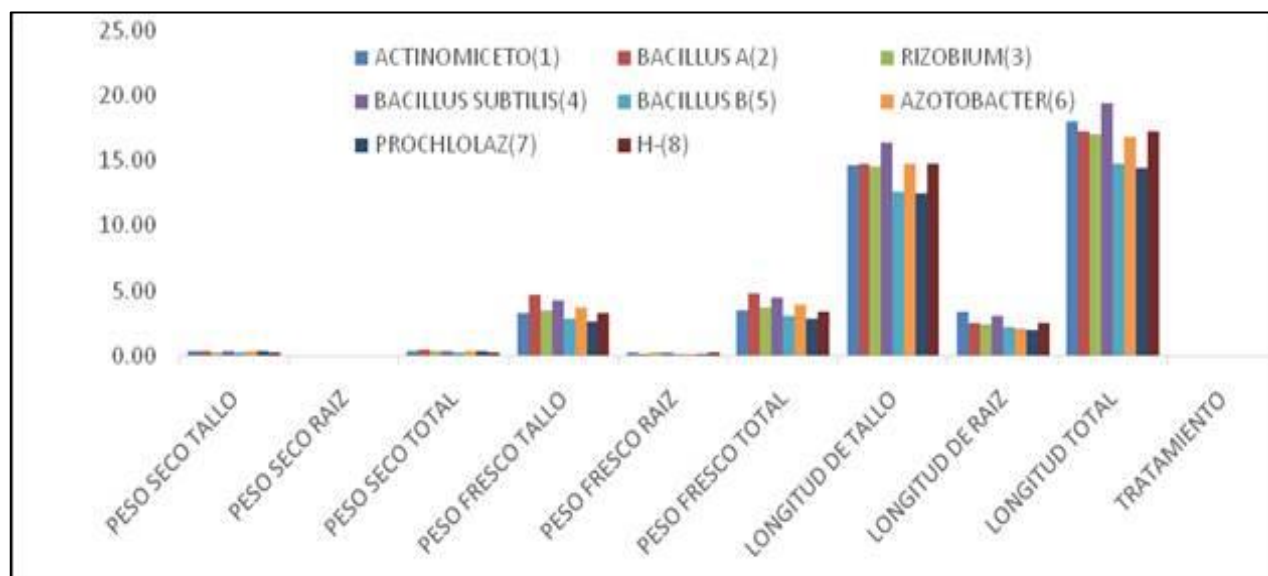


Figura 5. Parámetros agronómicos evaluados por tratamiento.

4. Conclusiones

El tratamiento con mejor resultado en el biocontrol de *Fusarium* fue la cepa *Bacillus* “a” (IBAC0212).

La cepa *Rhizobium* (CIAT 899), el *Actinomiceto* (QP12), y el agroquímico Prochlorax mostraron eficiencia similar de protección, disminuyendo la severidad a grado 3.

Bacillus “a” (IBAC0212), *Rhizobium* (CIAT 899), *Actinomiceto* (QP12) y *Azotobacter* (QZ1) mostraron buenas características PGPR.

Agradecimientos

Los autores expresamos nuestro especial agradecimiento al proyecto 009-2017-Fondecyt.

5. Bibliografía

1. Avendaño, C. y Arbeláez, G. 2006. Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* sp. en fríjol, mediante acción combinada de *Entromospora colombiana*, *Trichoderma* sp., y *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Agronómica* 65(4): 362-367. https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/50181/56924
2. Bruto, M., Prigent-Combaret C., Muller, D., Moëne-Loccoz, Y. 2014. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and related Proteobacteria. *Scientific Reports* 4:1-10. <https://www.nature.com/articles/srep06261>
3. Darío, I., Zdravka, S., Biljana, K. 2011. In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, Flutriafol, Metconazole and Prochloraz. *Journal Pesticides Phytomedicine* 26(1): 35-42.
4. Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* 62:96-100. <http://201.207.189.89/bitstream/handle/11554/6578/A2120e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. Flores, M., Roque, E. 2017. Aislamiento y caracterización microbiana (microbiológica y molecular) en la búsqueda de *Bacillus subtilis* a partir de bioinsumos comerciales y pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos. *Universidad Nacional de Ingeniería de Nicaragua*, 120 p.
6. Fravel, D., Olivain, C., Alabouvette, C. 2002. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157: 493-502. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x>
7. Galindo, J., Pardo, L. 2010. Uchuva (*Physalis peruviana* L.): producción y manejo pos cosecha. *Corredor Tecnológico Agroindustrial de Bogotá*. Cámara de Comercio, 116 p.
8. García, D. 2018. Control del marchitamiento vascular de la uchuva basado en mezclas de microorganismos rizosféricos provenientes de suelos potencialmente supresivos. *Universidad Nacional de Colombia*. Facultad de Ciencias Agrarias. 131p.
9. González, R., J. Montealegre, R Herrera, 2004. Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. *Ciencia e Investigación Agraria* 31: 21-28.
10. González-Franco, C., Robles-Hernández, R. 2009. Actinomicetos como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos. *Tecnociencia Chihuahua* 3: 64–73.
11. Guillén-Cruz, R., Henández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G. 2006. *Bacillus* spp. como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* L. y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.) *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(2): 105-114. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61224204.pdf>
12. Mejía-Bautista, M., Reyes-Ramírez, A., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J., Borges-Gómez, L. 2016. *Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez Causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(3):208-222. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v34n3/2007-8080-rmfi-34-03-00208.pdf>
13. Navarrete-Maya, R., Trejo-Albarrán, E., Navarrete-Maya, J., Prudencio-Sains, J., Acosta Gallegos, J. 2009. Reacción de genotipos de frijol a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de campo e invernadero. *Agricultura Técnica en México*, 35(4): 459-470.
14. Park, J., El-Tarabily, K., Ghisalberti, E., Sivasithamparam, K. 2002. Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil borne fungal

- pathogens. *Applied Microbiology* 35: 361-365.
15. Peláez, F. 2006. La distribución histórica de antibióticos de productos microbianos naturales: ¿Se puede repetir la historia? *Biochemistry Pharmacology* 71: 981–990.
 16. Schumacher, R., Talmage, S., Miller, S., Sarris, K., Davidson, B., Goldberg, A. 2003. Aislamiento y determinación de la estructura de un éster antimicrobiano de una bacteria derivada de sedimentos marinos. *J. Nat. Pinchar.* 66 1291–1293.
 17. Van der Plank, J. 1975. *Principles of Plant Infection.* Academic Press. 216p.
 18. Van Schoonhoven, A., Pastor-Corrales M. 1987. Standard system for the evaluation of bean germplasm. Cali Colombia. CIAT.
 19. Zapata, J., Díaz, A. y Caviedes, D. 2012. Aislamiento y caracterización de rizobacterias. p: 27-31. En: Cotes, A.M., Jiménez, P., Rodríguez, M.X., Díaz, A., Zapata, J., Gómez, M. et al. (Eds.). *Estrategias de control biológico de Fusarium oxysporum en el cultivo de la uchuva (Physalis peruviana)*, Ed. Produmedios, 82 p.
 20. Zúñiga, D. 2012. *Manual de Microbiología Agrícola. Rhizobium, PGPRs, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad.* Primera edición. Perú. 112p.