



## Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* with endophytic bacteria formulations and its effect in the growth promotion in bean crop.

## Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* con formulados de bacterias endófitas y su efecto en la promoción de crecimiento en el cultivo de frijol.

Castro del Ángel, E.<sup>1</sup>, Hernández Castillo, F. D.<sup>1\*</sup>, Gallegos Morales, G.<sup>1</sup>, Ochoa Fuentes, Y. M.<sup>1</sup>, Castillo Reyes, F.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología México.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias México.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Castro del Ángel, E., Hernández Castillo, F. D., Gallegos Morales, G., Ochoa Fuentes, Y. M., Castillo Reyes, F. (2019). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* with endophytic bacteria formulations and its effect in the growth promotion in bean crop. *Revista Bio Ciencias* 6, e416. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.01.13>



### ABSTRACT

Two formulations based on endophytic microbial consortia of genus *Bacillus*, were evaluated for the control of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. The bioproducts were applied three times on bean plants from Pinto Saltillo cultivar; the first application was made at sowing time, the second when more than 70 % of the plants had reached around 15 cm long and the third, 15 days after the second. The distribution of the experiment was in a randomized block design under greenhouse conditions. 60 days after sowing, the incidence and severity of the disease was evaluated to determine the biocontrol effect, as well as the length and diameter of the stem and the relative chlorophyll content to determine the effect of the bacteria on the plant growth promotion. The results showed that the formulations partially reduced the severity of the disease, it

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: December 15<sup>th</sup> 2017.

Accepted/Aceptado: April 25<sup>th</sup> 2018.

Available on line/Publicado: March 25<sup>th</sup> 2019.

### RESUMEN

Dos formulados a base de consorcios microbianos endófitos del género *Bacillus*, fueron evaluados para el control de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. Los bioproductos fueron aplicados en tres ocasiones sobre plantas de frijol de la variedad Pinto Saltillo; la primera aplicación se realizó al momento de la siembra, la segunda cuando más del 70 % de las plantas alcanzaron alrededor de 15 cm de longitud y la tercera, 15 días posteriores a la segunda. La distribución del experimento fue en un diseño de bloques al azar bajo condiciones de invernadero. 60 días posteriores a la siembra se evaluó la incidencia y la severidad de la enfermedad para conocer el efecto de biocontrol, así como la longitud y diámetro de tallo y el contenido relativo de clorofila para determinar el efecto de las bacterias en la promoción del crecimiento vegetal. Los resultados demostraron que los formulados redujeron parcialmente la severidad de la enfermedad, también se encontró que fueron capaces de promover significativamente el crecimiento de las plantas de frijol. Los resultados presentan una alternativa que puede ser usada en el manejo integrado de *R. solani* y de *F. oxysporum*.

#### \*Corresponding Author:

Francisco Daniel, Hernández Castillo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología México. Phone: +52(844) 411 0200. E-mail: [fdanielhc@hotmail.com](mailto:fdanielhc@hotmail.com)

was also found that they were able to significantly promote growth of bean plants. The results present an alternative that can be used in integrated management of *R. solani* and *F. oxysporum*.

---

## KEY WORDS

---

Antagonism; Incidence; Severity; Promotion of plant wrowthgrowth

---

## Introduction

Biological control can be defined as a reduction in the amount of inoculum or disease produced by the activity of a pathogen, based on the use of natural enemies or use of compounds derived from its metabolism (Soria *et al.*, 2012; Harding & Raizada, 2015; Sundin *et al.*, 2016). It offers an alternative to chemical products, helping to minimize the negative consequences for human health and environment (O'Brien, 2017). Biological control agents are frequently tested, developed and used as an effort to control several soil borne plant pathogens (Yobo *et al.*, 2010). Endophytic bacteria can be defined as those that can be isolated from healthy plant tissues and superficially disinfected without causing any damage to the host plant (Compant *et al.*, 2005; Miliute *et al.*, 2015); they are capable of penetrating and disseminating systemically in the host plant, actively colonizing the conductive vessels, and occasionally the intracellular spaces. This colonization presents an ecological niche, similar to that occupied by plant pathogens, and these endophytic bacteria can act as biological control agents against pathogens (Dai *et al.*, 2016). Biological control of plant pathogens is the result of the production of antifungal or antibacterial agents, siderophores, the competition of nutrients (Sturz *et al.*, 2000) and systemic acquired resistance induction of the host or immunity (González *et al.*, 2015), increasing the availability of minerals (Sessitsch *et al.*, 2002). Endophytic bacteria are used for their capacity to produce antibiotics (Maksimov *et al.*, 2011), and enzymes such as chitinases, glucanases, proteases and lipases, which cause cell lysis (Neeraja *et al.*, 2010). They are also known for their ability to control plant pathogens such as *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* causing wilt in cotton (Chen *et al.*, 1995), fungi such as *Rhizoctonia solani* and *F. oxysporum* in potato cultivation (Castro *et al.*, 2017), Oomycete *Phytophthora cinnamomi* causing

---

## PALABRAS CLAVE

---

Antagonismo; Incidencia; Severidad; Promoción de crecimiento vegetal.

---

## Introducción

El control biológico puede definirse como una reducción de la cantidad de inóculo o enfermedad producida por la actividad de un patógeno, basada en el uso de enemigos naturales o el uso de compuestos derivados de su metabolismo (Soria *et al.*, 2012; Harding & Raizada, 2015; Sundin *et al.*, 2016). Ofrece una alternativa a los productos químicos, contribuyendo a minimizar las consecuencias negativas para la salud humana y el medio ambiente (O'Brien, 2017). Los agentes del control biológico son frecuentemente probados, desarrollados y usados como un esfuerzo para el control de varios fitopatógenos del suelo (Yobo *et al.*, 2010). Las bacterias endofíticas pueden definirse como aquellas que se pueden aislar de tejidos vegetales sanos y superficialmente desinfectados sin causar ningún daño a la planta huésped (Compant *et al.*, 2005; Miliute *et al.*, 2015); son capaces de penetrar y diseminarse sistémicamente en la planta huésped, colonizando activamente los vasos conductores, y ocasionalmente los espacios intracelulares. Esta colonización presenta un nicho ecológico, similar al ocupado por los patógenos vegetales, y estas bacterias endofíticas pueden actuar como agentes de control biológico contra patógenos (Dai *et al.*, 2016). El control biológico de fitopatógenos es el resultado de la producción de antifúngicos o agentes antibacterianos, sideróforos, la competencia de nutrientes (Sturz *et al.*, 2000) y la inducción de la resistencia sistemática adquirida del huésped (González *et al.*, 2015), o inmunidad, aumentando la disponibilidad de minerales (Sessitsch *et al.*, 2002). Las bacterias endofíticas son utilizadas por su capacidad en la producción de antibióticos (Maksimov *et al.*, 2011), de enzimas como las quitinasas, glucanases, proteasas y lipasas, las cuales provocan lisis celular (Neeraja *et al.*, 2010). Se ha demostrado la capacidad que tienen para controlar patógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* causante de la marchitez en algodón (Chen *et al.*, 1995), de hongos como *Rhizoctonia solani* y *F. oxysporum* en el cultivo de papa (Castro *et al.*, 2017), del Oomicete *Phytophthora cinnamomi* causante de la tristeza del aguacate (Pérez *et al.*, 2014); en otro estudio, cepas de bacterias endofíticas aisladas de plantas de vainilla inhibieron

the root rot of avocado (Pérez *et al.*, 2014); another study showed that strains of endophytic bacteria isolated from vanilla plants inhibited the growth of *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* through antibiosis and competition for space and nutrients (Jiménez *et al.*, 2015). They also established a symbiotic association, which produces great benefits for plants, promoting plant growth (Pérez *et al.*, 2013). The effect of endophytes on plant growth and development is due to direct or indirect mechanisms of action. Among the direct mechanisms is the production of hormones such as auxins, gibberellins, cytokinins and ethylene. The production and mobilization of organic acids, fixation of nitrogen, solubilization of phosphate and other nutrients (Sevilla *et al.*, 2001, Hurek *et al.*, 2002, Iniguez *et al.*, 2004, Khalifa *et al.*, 2015). The elucidation of the mechanisms that promote the growth of plants helps to favor the species and the conditions that lead to greater benefits for the plants. Volatile substances such as 2-3 butanediol and acetoin produced by bacteria appear to be a mechanism responsible for promoting the growth of plants (Ryu *et al.*, 2003). The production of phytohormones is considered one of the most important mechanisms to promote plant growth, these organic compounds regulate growth and development in plants, and in low concentrations influence biochemical, physiological and morphological processes. AIA (3-indole acetic acid) is the most common phytohormone, best characterized and physiologically most active auxin in plants (Soler *et al.*, 2012), AIA is responsible for division, expansion and differentiation of cells and plant tissues and stimulates roots elongation (Martínez *et al.*, 2010, Rojas *et al.*, 2016). The objective of the present work was to evaluate the effect of the application of two consortia of endophytic bacteria in a Pinto Saltillo's bean cultivar to control *R. solani* and *F. oxysporum* fungi and to determine their effect on growth and development under greenhouse conditions.

## Material and Methods

### Isolation and identification of soil borne plant pathogens

The plant pathogens were obtained from bean plants (*Phaseolus vulgaris*) Pinto Saltillo cultivar with wilt symptoms, they were collected in experimental fields of Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, which were cultivated under rainfed farming conditions, fragments of roots and stems were placed in

el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* mediante antibiosis y por competencia por espacio y de nutrientes (Jiménez *et al.*, 2015). Además establecen una asociación simbiótica, que produce grandes beneficios para las plantas, al cumplir funciones como promotoras de crecimiento vegetal (Pérez *et al.*, 2013). El efecto de los endófitos sobre el crecimiento y desarrollo vegetal se debe a mecanismos de acción directos o indirectos. Entre los mecanismos directos se encuentra la producción de hormonas como auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno. La producción de ácidos orgánicos, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato y otros nutrientes y la movilización de los mismos (Sevilla *et al.*, 2001; Hurek *et al.*, 2002, Iniguez *et al.*, 2004; Khalifa *et al.*, 2015). La elucidación de los mecanismos que promueven el crecimiento de las plantas ayuda a favorecer las especies y las condiciones que conducen a mayores beneficios para las plantas. Las sustancias volátiles como el 2-3 butanediol y la acetoina producidas por bacterias parecen ser un mecanismo responsable de la promoción del crecimiento de las plantas (Ryu *et al.*, 2003). La producción de fitohormonas es considerada uno de los mecanismos más importantes para la promoción del crecimiento vegetal, estos compuestos orgánicos regulan el crecimiento y desarrollo en plantas, y en bajas concentraciones influyen procesos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos. El AIA (ácido 3-indol acético) es la fitohormona más común, mejor caracterizada y la auxina fisiológicamente más activa en las plantas (Soler *et al.*, 2012), el AIA es el responsable de la división, expansión y diferenciación de las células y tejidos de las plantas y estimula la elongación de las raíces (Martínez *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2016). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de dos consorcios de bacterias endófitas en el cultivo de frijol variedad pinto Saltillo para el control de los hongos *R. solani* y *F. oxysporum* y determinar su efecto en el crecimiento y desarrollo bajo condiciones de invernadero.

## Material y Métodos

### Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos

Los patógenos fueron obtenidos de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad Pinto Saltillo con síntomas de marchitez, se recolectaron en campos experimentales de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, las cuales eran cultivadas bajo condiciones de temporal, se tomaron fragmentos de raíces y tallos y fueron sembrados en medio de cultivo PDA e incubados a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante siete días. El hongo *F. oxysporum* fue

PDA culture medium and incubated at  $26 \pm 2$  ° C for seven days. The fungus *F. oxysporum* was purified by monospore cultures and characterized phenotypically according to the morphological characteristics described by Leslie & Summerell (2006), while *R. solani* was purified by hyphae tip and characterized according to the criteria of Sneh *et al.* (1991). The isolates were preserved at 4 °C.

#### Extraction of DNA from fungi

Starting from axenic strains, each petri dish with fungal mycelium was scraped with a spatula trying to recover as much as possible, the result of each petri dish was deposited in an ependorff tube, giving a total of four ependorff tubes for each species. 500µL of extraction buffer containing 10m M EDTA, 10 mM Tris HCl pH 8.0, SDS 0.5 % was added to the recovered material and vortexed for 15 min. Subsequently, 500 µL of the lower phase of the Phenol-Chloroform solution (1:1) was added and a vortexed for 15 min, centrifuging at 12,000 rpm for 10 min. The aqueous phase was recovered in a new tube and 1.0 µL of RNase (20 mg/mL) was added, incubating for 30 min at 37 °C in the thermomix. Then, 0.33 volumes of Isopropanol were added at -20 °C, mixing gently and incubating for 30 min. To form the pellet, centrifugation was performed at 12,000 rpm for 10 min. The supernatant was then decanted and the pellet was washed with 500 µL of 70 % ethanol, then centrifuged at 12,000 rpm for 5 min. It was decanted and the pellet allowed to dry under a laminar flow hood for approximately 15 min. The DNA was resuspended in 25 µL of TE. The integrity and quality of the extracted DNA was verified in a 1 % agarose gel, under horizontal electrophoresis applying a voltage of 100 volts for 40 min (Nicholson *et al.*, 2001).

#### Amplification by polymerase chain reaction (PCR)

For the amplification of the ITS1 and ITS4 region (Internal Transcribed Spacer), an amplification mixture was made in a final volume of 20 µL, composed of 13.58 MQ water, 2.0 µL of MgCl buffer (10X), 0.32 µL of MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0.4 µL of dNTP's (10mM), 0.5 µL of each ITS1 primer (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3') and ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3') (10µM), 0.5 µL of DMSO, 0.2 µL of DNA Taq-polymerase 1U and 1 µL of DNA (40 ng/µL). The amplification reactions were carried out using a thermal cycler (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler) under the following program: 1 cycle of 94 °C 3 min, followed by 35 cycles at 94 °C 45s, 53 °C for 45s

purificado mediante cultivos monospóricos y caracterizado fenotípicamente de acuerdo a las características morfológicas descritas por Leslie & Summerell, (2006), mientras que *R. solani* fue purificado por punta de hifa y caracterizado de acuerdo a los criterios de Sneh *et al.* (1991). Los aislamientos fueron conservados a 4°C.

#### Extracción de DNA de los hongos

Partiendo de cepas axénicas, cada caja Petri con micelio de los hongos se raspó con una espátula tratando de recuperar la mayor cantidad posible, el resultado de cada caja fue depositado en un tubo ependorff, dando un total de cuatro tubos ependorf para cada especie. Al material recuperado, se le agregaron 500µL de buffer de extracción que contenía EDTA 10 mM, Tris HCl 10 mM pH 8.0, SDS 0.5 % y se mezcló por vórtex 15 min. Posteriormente se adicionaron 500 µL de la fase inferior de solución Fenol-Cloroformo (1:1) y se le dio un paso de vórtex por 15 min, centrifugando a 12,000 rpm por 10 min. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se agregó 1.0 µL de RNasa (20 mg/mL), incubando por 30 min de a 37°C en el termomix. Se adicionaron 0.33 volúmenes de Isopropanol a -20°C, mezclando suavemente e incubando por 30 min. Para formar la pastilla se realizó la centrifugación a 12,000 rpm por 10 min. Después se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 70 %, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. Se decantó y la pastilla se dejó secar bajo campana de flujo laminar por aproximadamente 15 min. El DNA fue resuspendido en 25 µL de TE. La integridad y calidad del DNA extraído se verificó en gel de agarosa al 1 %, bajo electroforesis horizontal aplicando un voltaje de 100 volts por 40 min (Nicholson *et al.*, 2001).

#### Amplificación por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de la región ITS1 e ITS4 (Internal Transcribed Spacer). Se realizó una mezcla de amplificación en un volumen final de 20 µL, compuesto por 13.58 de agua MQ, 2.0 µL de buffer MgCl (10X), 0.32 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.4 µL de dNTP's (10 mM), 0.5 µL de cada iniciador ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3') e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3') (10µM), 0.5 µL de DMSO, 0.2 µL de DNA Taq-polimerasa 1 U y 1 µL de DNA (40 ng/µL). Las reacciones de amplificación se efectuaron usando un termociclador (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler) bajo el siguiente programa: 1 ciclo de 94°C 3 min, seguido de 35 ciclos a 94°C 45s, 53°C por 45s y 72°C 1 min; finalizando con un ciclo de polimerización de 72°C por 7 min. Las bandas amplificadas se observaron en un gel de agarosa al 1.0 % a 90V por 60 min.

and 72 °C 1 min; finishing with a polymerization cycle of 72 °C for 7 min. The amplified bands were observed in a 1.0 % agarose gel at 90V for 60 min.

#### Sequencing of PCR products

The PCR product was increased and purified by GeneAll®Expin™ PCR SV kit, which were sequenced by the MacroGen laboratory. The sequences obtained were analyzed in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool) for highly similar sequences. Each sequence obtained was depured in its initial and final part to increase the sensitivity of the analysis.

#### Biocontrol of *R. solani* and *F. oxysporum* with formulations of endophytic bacteria and their effect on growth and development of beans under greenhouse conditions

Pinto Saltillo cultivar bean seeds free from any chemical product provided by the Germplasm Bank of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro were used, two seeds of the study crop were sown in 5 Kg pots with pasteurized soil obtained of bean fields of this University. At the time of planting, the soil borne plant pathogens were inoculated; for the case of *F. oxysporum* a suspension of  $1 \times 10^6$  conidia/mL was used, for *R. solani* a suspension at  $1 \times 10^6$  propagules/mL, prepared by macerating 4 Petri dishes with PDA and growth of *R. solani* of 14 days of age in 1 L of sterile distilled water. Each species of fungus was applied with a hypodermic syringe, depositing a volume of 25 ml of the suspension of each fungus on the bean seeds. The endophytic bacteria were isolated and formulated by Green Corp Biorganiks of Mexico S.A. of C.V. Company. The formulations contain a mixture of *Bacillus* species: the difference between the formulations consists of different conditioners in each of these which influences the stability and biological viability of the prototypes. Three applications were made: the first at the time of sowing, the second after the emergence of the plants when they reached about 15cm in height and the third was at an interval of 15 days after the second. The applications were made with a manual sprinkler. The treatments studied were: (T1) pathogen + bioformulated 1 -  $1 \times 10^6$ , (T2) pathogen + bioformulated 2 -  $1 \times 10^7$ , (T3) bioformulated 1 -  $1 \times 10^6$ , (T4) bioformulated 2-  $1 \times 10^7$ , (T5) pathogen, (T6) control, it should be mentioned that the experiments were carried out separately, one for *R. solani* and another for *F. oxysporum*. The experiment was

#### Secuenciación de productos de PCR

El producto de PCR fue incrementado y purificado por medio de kit GeneAll®Expin™ PCR SV, los cuales fueron secuenciados por el laboratorio MacroGen. Las secuencias obtenidas, se analizaron en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para secuencias altamente similares. Cada secuencia obtenida se le depuró la parte inicial y final por razón de aumentar la sensibilidad del análisis.

#### Biocontrol de *R. solani* y *F. oxysporum* con formulados de bacterias endófitas y su efecto en el crecimiento y desarrollo de frijol bajo condiciones de invernadero

Se usaron semillas de frijol variedad Pinto Saltillo libres de cualquier producto químico proporcionadas por el Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, dos semillas del cultivo en estudio fueron sembradas en macetas de 5 Kg con suelo pasteurizado obtenido en campos de cultivo de frijol de la Universidad antes mencionada. Al momento de la siembra se realizó la inoculación de los fitopatógenos; para el caso de *F. oxysporum* se empleó una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios/mL, para *R. solani* una suspensión a  $1 \times 10^6$  propágulos/mL, preparada al macerar 4 cajas Petri con PDA y crecimiento de *R. solani* de 14 días de edad en 1 L de agua destilada estéril. Cada especie de hongo se aplicó con una jeringa hipodérmica, depositando un volumen de 25 mL de la suspensión de cada hongo sobre las semillas de frijol. Las bacterias endófitas fueron aisladas y formuladas por la empresa Green Corp Biorganiks de México, S.A. De C.V. Los formulados contienen una mezcla de especies de *Bacillus*: la diferencia entre los formulados consiste en diferentes acondicionadores en cada una de estas lo que influye en la estabilidad y viabilidad biológica de los prototipos. Se realizaron tres aplicaciones: la primera al momento de la siembra, la segunda después de la emergencia de las plantas cuando alcanzaron alrededor de 15cm de altura y la tercera fue a un intervalo de 15 días posterior a la segunda. Las aplicaciones fueron realizadas con un aspersor manual. Los tratamientos estudiados fueron: (T1) patógeno + bioformulado 1 -  $1 \times 10^6$ , (T2) patógeno + bioformulado 2 -  $1 \times 10^7$ , (T3) bioformulado 1 -  $1 \times 10^6$ , (T4) bioformulado 2-  $1 \times 10^7$ , (T5) patógeno, (T6) testigo absoluto, cabe mencionar que los experimentos se realizaron por separado, uno para *R. solani* y otro para *F. oxysporum*. El experimento fue establecido en un diseño de bloques al azar bajo condiciones de invernadero con siete repeticiones por tratamiento, contando con 42 unidades

established in a random block design under greenhouse conditions with seven repetitions per treatment, with 42 experimental units, two plants per experimental unit, giving a total of 84 plants for each experiment. We chose to use a randomized block design because the conditions inside the greenhouse were not homogeneous since the site is not 100 % conditioned.

The disease incidence was determined and expressed as percent of diseased plants. The severity was assessed with a six-class scale; where: 0 - Plants with healthy stems and roots, 1 - Plants with minimal damage in stems and roots (less than 10 %), 2 - Plants with slight damage in stems and root (25 %), 3 - Plants with medium damage in stems and root (50 %), 4 - Plants with severe damage in stems and root (75 %) and 5 - Plants with dead stems (100 %) (Castro *et al.*, 2017). The incidence and severity variables had an arcsine transformation of the square root of the observed value.

The effect of the bioformulates in the promotion of plant growth and development, some parameters were measured, such as; plant height expressed in cm, stem diameter expressed in mm, in addition the relative content of chlorophyll was determined with a SPAD 502 Plus.

#### Statistical analysis

The results were processed by analysis of variance, the separation of the means was through the Tukey test with a significance of  $P \leq 0.05$ . The SAS program version 9.5 was used.

## Results and Discussion

### Isolation and identification of soil borne plant pathogens

The morphological characteristics of *F. oxysporum* observed in potato dextrose agar culture medium were cottony mycelium and variable color according to age, from a pinkish to a pale violet at two weeks. The microconidia were observed without septa, oval, elliptical to reniform, formed in abundance in monofialides in bottle shaped short called "false head. The chlamydospores of intercalary or terminal position, individually or in pairs, with a smooth circular double-wall appearance. The macroconidia observed were fusoid and allantois with three to five septa and the hook-shaped. In a carnation-

experimentales, dos plantas por cada unidad experimental, dando un total de 84 plantas para cada experimento. Se optó por usar un diseño de bloques al azar porque las condiciones dentro del invernadero no eran homogéneas ya que el sitio no está acondicionado al 100 %.

Se determinó la incidencia de la enfermedad y fue expresada como porcentaje de plantas enfermas. La severidad se evaluó con una escala arbitraria de seis clases, donde 0 - Planta con tallos y raíz sanos, 1 - Planta con daño mínimo en tallos y raíces (menos de 10 %), 2 - Planta con daño leve en tallos y raíz (25 %), 3 - Planta con daño medio en tallos y raíz (50 %), 4 - Planta con daño fuerte en tallos y raíz (75 %) y 5 - Planta con tallos muertos (100 %) (Castro *et al.*, 2017). Las variables de incidencia y severidad tuvieron una transformación arcoseno de la raíz cuadrada del valor observado.

Para determinar el efecto de los bioformulados en la promoción de crecimiento y desarrollo de plantas, se midieron algunos parámetros como; altura de planta expresada en cm, diámetro de tallo expresado en mm, además se determinó el contenido relativo de clorofila con un SPAD 502 Plus.

#### Análisis estadístico

Los resultados fueron procesados por análisis de varianza, la separación de las medias fue mediante la prueba de Tukey con una significancia de  $p \leq 0.05$ . Se utilizó el programa SAS versión 9.5.

## Resultados y Discusión

### Aislamiento y caracterización de los hongos fitopatógenos

Las características morfológicas de *F. oxysporum* observadas en medio de cultivo papa dextrosa agar fueron micelio algodonoso y de color variable según la edad, desde un rosado a un violeta pálido a las dos semanas. Se observaron en microscopio los microconidios sin septos, ovales, elípticos a reniformes, formados en abundancia en monofialides en forma de botella llamada "cabeza falsa". Las clamidosporas de posición intercalar o terminal, individualmente o en pares, con una apariencia lisa circular de doble pared. Las macroconidias observadas eran fusoides y alantoides con tres a cinco septos y en forma de gancho. En medio clavel-agar (CLA) se observó micelio hialino, creciendo muy cerca de la superficie del medio, a los 10 días se formaron los esporodocios en la hoja de clavel. Esta característica corresponde a lo descrito por Leslie & Summerell, (2006). Las características de *R. solani* fueron

agar medium (CLA) a hyaline mycelium was observed, growing very close to the surface of the medium, after 10 days the sporodochia were formed in the carnation leaf. This characteristic corresponds to that described by Leslie & Summerell, (2006). The characteristics of *R. solani* were colorless mycelium when young, but turned yellowish to light brown at two weeks of age, with elongated cells and branches that grew at approximately right angles to the main hypha, were slightly constricted at the junction, and they had a transverse wall near the junction. This characteristic was considered basic for the identification of *Rhizoctonia solani* (Sneh et al., 1991). The sequences of the fungi compared in BLAST identified *Fusarium oxysporum* strain Af / 8/1 with access code JN624887.1 with 99 % identity and *Rhizoctonia solani* with access code JX050236.1 with 99 % identity, this confirms the identification morphological of pathogens.

#### **Biocontrol of *R. solani* and *F. oxysporum* with formulations of endophytic bacteria and their effect on the growth and development of beans under greenhouse conditions**

##### **Incidence and severity of the disease**

There were statistically significant differences between the treatments, for the variables of incidence and severity of the disease by *R. solani* and *F. oxysporum* evaluated in bean plants (Table 1).

Although the analysis showed significant differences, the microbial formulations had no effect on the incidence of fungi *F. oxysporum* and *R. solani*, since they were developed in all the treatments where they were

micelio incoloro cuando joven, pero se volvió amarillento a color marrón claro a las dos semanas de edad, con células alargadas y ramificaciones que crecieron en ángulos aproximadamente rectos a la hifa principal, estaban ligeramente constreñidos en la unión, y tenían una pared transversal cerca de la unión. Ésta característica fue considerada básica para la identificación de *Rhizoctonia solani* (Sneh et al., 1991). Las secuencias de los hongos comparadas en BLAST identificaron a *Fusarium oxysporum* strain Af/8/1 con clave de acceso JN624887.1 con 99 % de identidad y a *Rhizoctonia solani* con clave de acceso JX050236.1 con 99 % de identidad, esto confirma la identificación morfológica de los patógenos.

#### **Biocontrol de *R. solani* y *F. oxysporum* con formulados de bacterias endófitas y su efecto en el crecimiento y desarrollo de frijol bajo condiciones de invernadero**

##### **Incidencia y severidad de la enfermedad**

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, para las variables de incidencia y severidad de la enfermedad por *R. solani* y *F. oxysporum* evaluadas en plantas de frijol (Tabla 1).

A pesar de que el análisis arrojó diferencias significativas, los formulados microbianos no tuvieron efecto sobre la incidencia de los hongos *F. oxysporum* y *R. solani*, ya que se desarrollaron en todos los tratamientos donde fueron inoculados, sin embargo los datos indican que redujeron parcialmente la severidad de estos patógenos, el rango fue de 0.0 % a 62.14 % para *F. oxysporum* y de 0.0 % a 83.57 % respectivamente. Siendo más eficaz el bioformulado 1 para *F. oxysporum* mientras que el bioformulado 2 fue para *R. solani* (Tabla 2). Otro estudio

**Table 1.**  
**Mean square of the error between treatments and value of P, for incidence and severity of *R. solani* and *F. oxysporum* in the bean crop.**

**Tabla 1.**  
**Cuadrado medio del error entre tratamientos y valor de P, para incidencia y severidad de *R. solani* y *F. oxysporum* en el cultivo de frijol.**

Variable	CME*	P>F
Incidencia de <i>F. oxysporum</i>	0.0	<.0001
Severidad de <i>F. oxysporum</i>	278.57	<.0001
Incidencia de <i>R. solani</i>	0.0	<.0001
Severidad de <i>R. solani</i>	192.85	<.0001

\*Mean square of the error.

\*Cuadrado Medio del Error.

**Table 2.**  
**Effect of two formulations of endophytic bacteria on the incidence and severity of *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* in bean plants.**

**Tabla 2.**  
**Efecto de 2 formulados de bacterias endófitas sobre la incidencia y severidad de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* en plantas de frijol.**

Treatment	Incidence (%)	Severity (%)
1. <i>F. oxysporum</i> + bioformulate 1 - $1 \times 10^6$	90 a	45.00 a
2. <i>F. oxysporum</i> + bioformulate 2 - $1 \times 10^7$	90 a	62.14 a
3. Bioformulate 1 - $1 \times 10^6$	0 b	0 b
4. Bioformulate 2 - $1 \times 10^7$	0 b	0 b
5. <i>Fusarium oxysporum</i>	90 a	62.14 a
6. Control	0 b	0 b
1. <i>R. solani</i> + bioformulate 1 - $1 \times 10^6$	90 a	77.14 a
2. <i>R. solani</i> + bioformulate 2 - $1 \times 10^7$	90 a	70.71 a
3. Bioformulate 1 - $1 \times 10^6$	0 b	0 b
4. Bioformulate 2 - $1 \times 10^7$	0 b	0 b
5. <i>Rhizoctonia solani</i>	90 a	83.57 a
6. Control	0 b	0 b

Means with arcsine transformation of the square root of the observed value, columns followed by the same letter are not statistically different according to Tukey's mean separation test at 0.05 % significance.

Medias con transformación arcoseno de la raíz cuadrada del valor observado, columnas seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de separación de medias de Tukey al 0.05 % de significancia.

inoculated, however the data indicate that they partially reduced the severity of these plant pathogens, the range was from 0.0 % to 62.14 % for *F. oxysporum* and from 0.0 % to 83.57 % respectively. Bioformulate 1 was more effective for *F. oxysporum* while bioformulate 2 was for *R. solani* (Table 2). Another study previously conducted by Ben *et al.* (2016) reported that isolates of *Alcaligenes faecalis* S18 and *Bacillus cereus* S4 also significantly reduced *Fusarium* wilt in tomato caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

#### Plant height and stem diameter

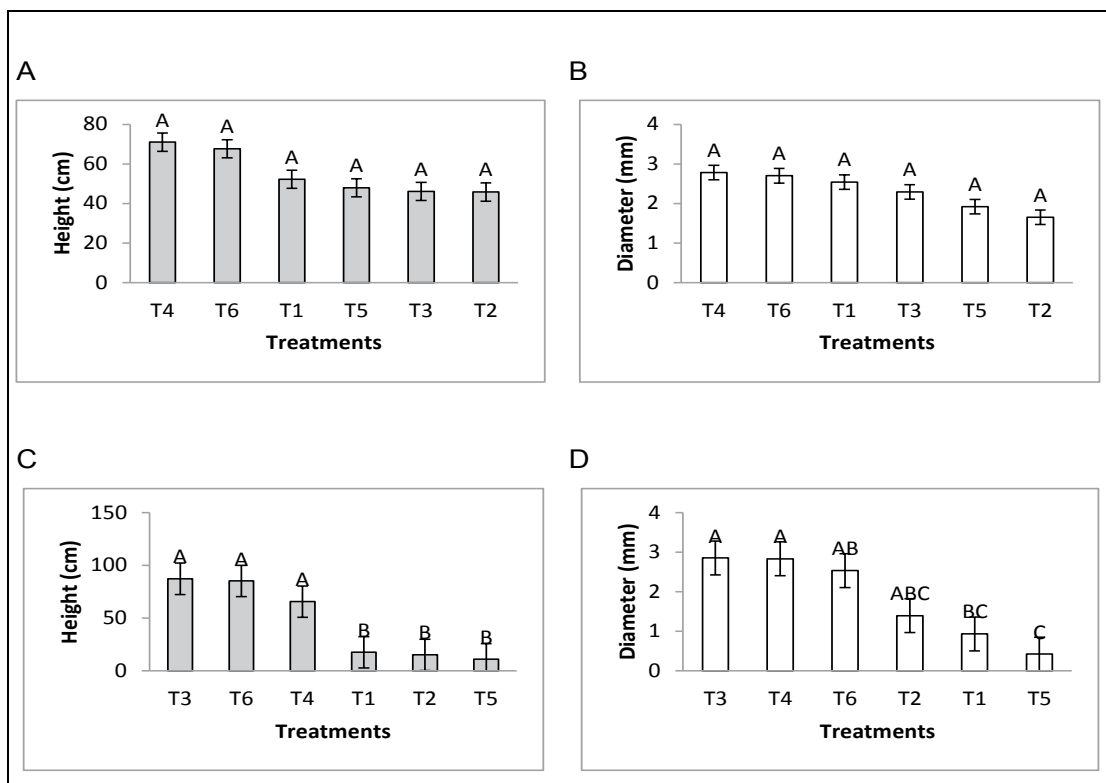
On the other hand, the analysis of the effect of bioproducts on bean plants inoculated with *R. solani* or *F. oxysporum* revealed that the height and diameter of the stem increased in the treatments that received applications of the bacterial formulations. Formulated 1

realizado previamente por Ben *et al.* (2016) reportaron que aislamientos de *Alcaligenes faecalis* S18 y *Bacillus cereus* S4 también redujeron significativamente la marchitez por *Fusarium* en tomate ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

#### Altura de planta y diámetro de tallo

Por otro lado, el análisis del efecto de los bioproductos sobre plantas de frijol inoculadas con *R. solani* o *F. oxysporum* reveló que la altura y diámetro de tallo se incrementó en los tratamientos que recibieron aplicaciones de los formulados bacterianos. Los formulados 1 y 2 en ausencia de fitopatógeno sobresalieron por su efecto estimulador del crecimiento de las plantas en estudio. Este efecto estimulador del crecimiento también se apreció en las plantas tratadas con los formulados e inoculados al mismo tiempo con los patógenos (Figura 1). Las plantas inoculadas sólo con el fitopatógeno *F. oxysporum* o *R. solani* mostraron un desarrollo más escaso. Es



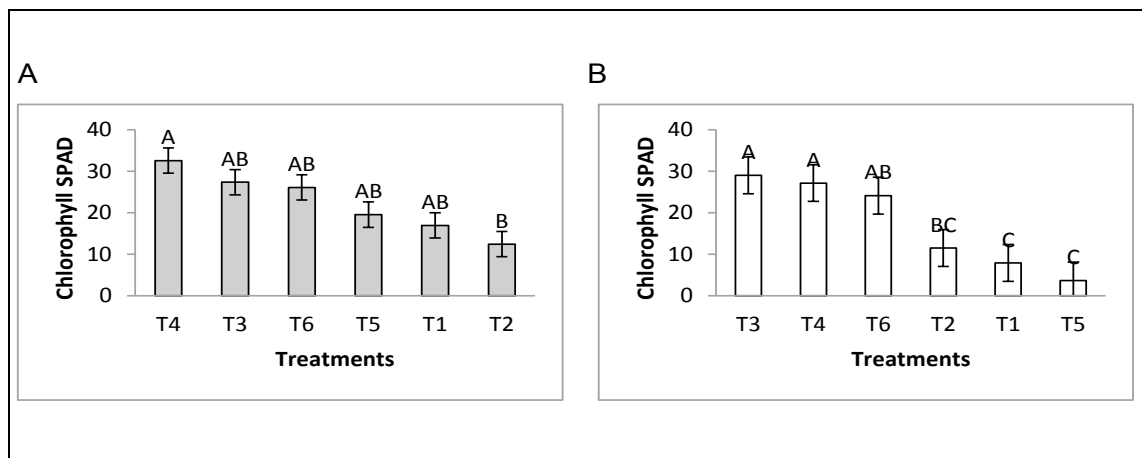


**Figure 1. Effect of endophytic bacteria on plant height and stem diameter in bean crop under greenhouse conditions.** [(*F. oxysporum*; (A) height, (B) diameter) (*R. solani*; (C) height, (D) diameter)]. Means with the same letter are not significantly different according to the Tukey tested at  $p=0.05$ . Error bars are standard error of the mean.

**Figura. 1. Efecto de bacterias endofíticas sobre altura de la planta y diámetro del tallo en cultivos de frijol en condiciones de invernadero.** [(*F. oxysporum*; (A) altura, (B) diámetro) (*R. solani*; (C) altura, (D) diámetro)]. Medias con misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey en  $p=0.05$ . Las barras muestran error estándar.

and 2 in the absence of soil borne plant pathogen fungi stood out for their stimulating effect on the growth of the plants under study. This growth stimulating effect was also seen in the plants treated with the formulations and inoculated with the pathogens at the same time (Figure 1). The plants inoculated only with the plant pathogens *F. oxysporum* or *R. solani* showed a more limited development. It is important to mention that the plants grew under no chemical treatment, therefore they did not receive fertilization by any chemical source. Other recent studies, conducted by Castro *et al.* (2017) show that endophytic *Bacillus* bacteria applied as a consortium are able to promote plant growth in potato cultivation, obtaining favorable results in height and diameter of stem as well as fresh weight of biomass and tuber. According

importante mencionar que las plantas crecieron bajo ningún tratamiento químico, por lo tanto no recibieron fertilización por alguna fuente química. Por otra parte estudios recientes realizados por Castro *et al.* (2017) demuestran que las bacterias endofíticas del genero *Bacillus* aplicadas como consorcio son capaces de promover el crecimiento vegetal en el cultivo de papa, obteniendo resultados favorables en la altura y diámetro de tallo así como peso fresco de biomasa y de tubérculo. De acuerdo a lo reportado por Santoyo *et al.* (2015), diversos endofitos bacterianos pueden promover el crecimiento de las plantas como consecuencia de los mecanismos directos o indirectos. La promoción directa del crecimiento de las plantas ocurre cuando una bacteria facilita la adquisición de nutrientes esenciales o modula el nivel de hormonas dentro de la planta. La adquisición de nutrientes



**Figura 2. Efecto de la aplicación de bacterias endofíticas sobre el contenido de clorofila, en condiciones de invernadero. [*F. oxysporum* (A) y *R. solani*; (B)].** Medias con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Tukey en  $p=0.05$ . Las barras muestran error estándar.

**Figure 2. Effect of endophytic bacteria application on chlorophyll content, under greenhouse conditions. [*F. oxysporum*; (A) and *R. solani*; (B)].** Means with the same letter are not significantly different according to the Tukey tested at  $p=0.05$ . Error bars are standard error of the mean.

to the information reported by Santoyo *et al.* (2015), various bacterial endophytes can promote the growth of plants as a consequence of direct or indirect mechanisms. The direct promotion of plant growth occurs when a bacterium facilitates the acquisition of essential nutrients or regulate the level of hormones within the plant. The acquisition of nutrients facilitated by endophytes generally includes nitrogen, phosphorus and iron. The regulation of hormone levels may imply that one or more of the phytohormones are synthesized as auxins, cytokinins and gibberellins. Indirect promotion of plant growth occurs when bacteria decrease damage to plants after infection with a phytopathogen that includes some soil fungi and bacteria. Other studies by Ryu *et al.* (2003) demonstrated that strains of endophytic bacteria such as *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens* had the ability to promote significant growth in *Arabidopsis*.

#### Chlorophyll content

Chlorophyll levels in bean plants increased remarkably, the inductor effect that the formulated had on the relative amount of chlorophyll was demonstrated, formulated 1 and 2 in the presence and absence of plant pathogens showed levels higher than those found in controls (Figure 2). In this section, a general discussion is made as there are no reports where they relate the chlorophyll content to the attack of plant pathogens.

facilitada por los endófitos generalmente incluye nitrógeno, fósforo y hierro. La modulación de los niveles hormonales puede implicar que se sintetiza una o más de las fitohormonas como auxinas, citoquininas y giberelinas. La promoción indirecta del crecimiento de las plantas ocurre cuando las bacterias disminuyen el daño a las plantas después de la infección con un fitopatógeno que incluye algunos hongos del suelo y bacterias. Otros estudios realizados por Ryu *et al.* (2003) demostraron que cepas de bacterias endófitas como *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens* tuvieron la capacidad de promover el crecimiento significativo en *Arabidopsis*.

#### Contenido de clorofila

Los niveles de clorofila en plantas de frijol se incrementaron notablemente, se demostró el efecto inductor que tuvieron los formulados en la cantidad relativa de clorofila, los formulados 1 y 2 en presencia y ausencia de fitopatógenos manifestaron niveles superiores a los encontrados en los testigos (Figura 2). En este apartado se discute de manera general al no existir reportes donde relacionen el contenido de clorofila respecto al ataque de fitopatógenos. Por lo tanto Turner & Jund, (1991), con un modelo de detector de clorofila SPAD-502, demostraron que la "unidad SPAD" es un valor proporcional al contenido de nitrógeno, por lo que en este estudio se pretende relacionar el contenido de clorofila

Therefore, Turner & Jund, (1991), with a chlorophyll detector model SPAD-502, demonstrated that the "SPAD unit" is a value proportional to the nitrogen content, so in this study it is intended to relate the chlorophyll content in relation to plant growth, where the endophytic bacteria used to improve chlorophyll levels is reflected in plant growth. The results showed that *F. oxysporum* and *R. solani* significantly affected the production of chlorophyll, compared with the treatments where the bioformulates were applied which induced the highest rates and were not affected. Chlorophyll content and nitrogen absorption have been correlated with SPAD units in various environmental conditions such as light intensity, temperature, relative humidity, pests, population density, nitrogen source, etc. (Hiderman et al., 1992).

## Conclusion

The formulations based on endophytic bacterial strains used in this study showed favorable effectiveness as biocontrol agents against the fungi *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* in disease severity, in addition the formulated ones significantly increased the growth of bean crop in comparison with control.

en relación al crecimiento vegetal, donde las bacterias endófitas utilizadas al mejorar los niveles de clorofila esto se vea reflejado en el crecimiento vegetal. Los resultados encontrados demostraron que los hongos *F. oxysporum* y *R. solani* afectaron significativamente la producción de clorofila, comparados con los tratamientos donde los bioformulados fueron aplicados los cuales indujeron los índices más altos y no se vieron afectados. El contenido de clorofila y la absorción de nitrógeno se han correlacionado con las unidades SPAD en diversas condiciones ambientales como la intensidad luminosa, temperatura, humedad relativa, plagas, densidad de población, fuente de nitrógeno, etc. (Hiderman et al., 1992).

## Conclusión

Los formulados a base de cepas bacterianas endófitas utilizadas en este estudio mostraron efectividad favorable como agentes de biocontrol frente a los hongos *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* en la severidad de la enfermedad, además los formulados incrementan significativamente el crecimiento del cultivo de frijol en comparación con los testigos.

## References

- Ben, A. R. A., Mokni, T. S., Nefzi, A., Jabnoun, K. H. and Daami, R. M. (2016). Biocontrol of *Fusarium* wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. *Biological Control* 97: 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.005>
- Castro, del A. E., Hernández, C.F.D., Ochoa, F.Y.M., Gallegos, M.G., Castillo, R.F. and Tucuch, C. F.M. (2017). Endophytic bacteria controlling *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* in *Solanum tuberosum*. *European Journal of Physical and Agricultural Sciences*. 5(1): 29-39.
- Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., Rodriguezkabana, R. and Kloepper, J.W. (1995). Biological Control of *Fusarium* Wilt on Cotton by Use of Endophytic Bacteria. *Biological Control* 5(1): 83-91. <https://doi.org/10.1006/bcon.1995.1009>
- Compant, S., Duffy B., Nowak J., Clement C. and Barka E.A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9): 4951-4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Dai, Z.C., Fu, W., Wan, L.Y., Cai, H.H., Wang, N., Qi, S.S. and Du, D.L. (2016). Different Growth Promoting Effects of Endophytic Bacteria on Invasive and Native Clonal Plants. *Frontiers in Plant Science*. 7(706): 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00706>
- González, G., E., Laredo, A. E., Ascacio, V., J., de Rodríguez, D. J and Hernández, C. F. D. (2015). Changes in the Production of Salicylic and Jasmonic Acid in Potato Plants (*Solanum tuberosum*) as Response to Foliar Application of Biotic and Abiotic Inductors. *American Journal of Plant Sciences*. 6: 1785-1791. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.611179>
- Harding, D.P. & Raizada, M.N. (2015). Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. *Frontiers in Plant Science*. 6(659): 1-14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00659>

- Hiderman, J., A. Makino, Y Kurita, T. Masa K. and Ojima. (1992). Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PS II in senescence. *Plant and Cell Physiology*. 33: 1209-1214. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078375>
- Hurek, T., Handley, L. L., Hurek, R. B. and Piche, Y. (2002). *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15(3): 233-242. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.3.233>
- Iniguez, A. L., Dong, Y. and Triplett, E. W. (2004). Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17(10): 1078-1085. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.10.1078>
- Jiménez, Q. K., Schmidt, D. A., Quesada, M. K. and Moreira, G. I. (2015). Aislamiento de una bacteria endófito de vainilla (*Vanilla planifolia*) con actividad biocontroladora *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vanillae*. *Tecnología en Marcha*. 28(2): 116-125. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5178375>
- Khalifa, A.Y.Z., Alsyeeh, A.M., Almalki, M.A. and Farag A. (2015). Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi Journal of Biological Science*. 23(1): 79-86 <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.008>
- Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Kansas Agricultural Experiment Station, Manhattan. 388p.
- Maksimov, Abizgil'dina, and Pusenkova LI. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (Review) *Appl Biochem Microbiol*.47:333-345.
- Martínez, V.O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G. and Mora, M.L. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal Soil Science Plant Nutrition*. 10 (3): 293-319. doi. [org/10.4067/S0718-95162010000100006](https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006)
- Miliute, I., Odeta, B., Danas, B. and Vidmantas, S. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Scientific Journal Zemdirbyste-Agriculture*. 102(4): 465-478. <https://doi.org/10.13080/z-a.2015.102.060>
- Neeraja, C., Anil, K., Purushotham, P., Suma, K., Sarma, P., Moerschbacher, B.M., and Podile, A.R. (2010). Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. (Review) *Crit Rev Biotechnol*. 30: 231-241. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.487258>
- Nicholson T. P., Rudd B. A.M., Dawson M., Lazarus C.M., Simpson T.J. and Cox R.X. (2001). Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chemistry & Biology*. 8(2): 157-178. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)90064-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)90064-4)
- O'Brien, P.A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*. 46(4): 293-304 <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>
- Pérez, C. A., Chamorro A. and Leonardo, B. (2013). Endophytic bacteria: a new field of research for development of agricultural sector. *Revista Colombiana ciencias Animal*. 5(2): 439-462.
- Pérez, C. A., Hernández, G.J. and Fuentes, C. J. (2014). USE OF ENDOPHYTIC BACTERIA AS BIOLOGICAL CONTROL ON *Phytophthora cinnamomi* Rands CAUSING ROOT ROT IN AVOCADO (*Persea Americana* Mill.). *Revista Colombiana ciencias Animal*. 6(1): 213-222. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153098530>
- Rojas, D.S.D., Hernández, P.C.E. and Santoyo, G. 2016. Evaluación de Bacillus y Pseudomonas para colonizar la rizosfera y su efecto en la promoción del crecimiento en tomate (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 22(1): 45-57. doi: 10.5154/r.rchsh.2015.06.009
- Ryu, C.M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W., and Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy Sciences of the United States of America*. 100(8): 4927-4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>
- Santoyo, G., Moreno, H. G., Orozco, M. M. C. and Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 183: 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Sessitsch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H., and Martínez, R.E. (2002). Advances in *Rhizobium* research. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21: 323-378. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044278>
- Sevilla, M., Burris, R. H., Gunapala, N., and Kennedy, C. (2001). Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wildtype and Nif-mutants

- strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14(3): 358-366. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.3.358>
- Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. (1991). Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 133 p. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19922315450>
- Soler, R., Badenes, P. F. R., Broekgaarden, C., Zheng, S., Anja, D., Boland, W. and Dicke, M. 2012. Plant-mediated facilitation between a leaf-feeding and a phloem-feeding insect in a brassicaceous plant: from insect performance to gene transcription. *Functional Ecology*. 26:156-166. doi: [10.1111/j.1365-2435.2011.01902.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01902.x)
- Soria, S., Alonso, R., and Bettucci, L. (2012). Endophytic Bacteria from *Pinus taeda* L. as Biocontrol Agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 72(2): 281-284. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392012000200018>
- Sturz, A. V., Christie, B. R., and Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 19(1): 1-30. <https://doi.org/10.1080/07352680091139169>
- Sundin, G.W., Castiblanco, L.F., Yuan, X., Zeng, Q. and Yang, C.H. 2016. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects. *Molecular Plant Pathology*. 17(9): 1506-1518. <https://doi.org/10.1111/mpp.12436>
- Turner, F.T. & Jund M.F. (1991). Chlorophyll meter to predict nitrogen topdress requirement for semiard rice. *Agron J*. 83: 926-928. <https://doi.org/10.2134/agronj1991.00021962008300050029x>
- Yobo, K. S., Laing, M. D. and Hunter, C. H. (2010). Application of selected biological control agents in conjunction with tolclofos-methyl for the control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Biotechnology*. 9(12): 1789-1796 <http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.1171>