

Microgotas: Método de inoculación con *Rhizoctonia solani* Kühn para evaluar genotipos de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.)¹

Thania A. Polanco², Rocío del P. Rodríguez³ y James S. Beaver⁴

J. Agric. Univ. P.R. 80(3):111-122 (1996)

RESUMEN

Con el propósito de desarrollar una metodología para inocular habichuela con *Rhizoctonia solani* se evaluaron los siguientes métodos: masivo, microgotas y discos de 0.5 cm de agar de papa y dextrosa con micelio del hongo. En el método de inoculación con microgotas se examinó la combinación de dilución y volumen de inóculo. El efecto de la edad del inóculo y de la hoja en la expresión de los síntomas también se evaluó. Todas las inoculaciones se realizaron en el haz de la hoja. El método de inoculación más efectivo para la expresión de síntomas fue el de microgotas utilizando la combinación de 10 μ l a una dilución de 100 ml de agua destilada esterilizada por plato de Petri (60 mm diam). Los métodos masivo y de discos indujeron síntomas severos con defoliación 72 hrs después de la inoculación. La edad más adecuada de la colonia es de cuatro días. A medida que aumenta la edad del inóculo se reduce el tamaño de la lesión y el éxito de las inoculaciones. La edad de las hojas trifoliadas no influye en la respuesta a la infección. El ensayo de validación demostró el potencial del método para evaluaciones de genotipos de habichuela.

ABSTRACT

Microdrops: A method for inoculation with *Rhizoctonia solani* Kühn for evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes

Three methods, namely, bulk, microdrops, and 0.5-cm discs of potato dextrose agar (PDA) with fungal mycelium, were evaluated in order to identify a suitable methodology to inoculate bean with *Rhizoctonia solani*. In the microdrop method, the combination of dilution and volume of inoculum was examined. The effect of age of inoculum and of the leaf on symptom expression was also tested. All inoculations were done on the upper side of the leaf. The best method for symptom expression was the combination of 10 μ l with dilutions of 100 ml of sterilized distilled water per Petri dish (60-mm diam). The bulk and disc methods induced severe symptoms causing defoliation 72 h after the inoculation. Four-day-old colonies as source of inoculum were best for symptom expression. With older colonies, lesion size was

¹Manuscrito sometido a la junta editorial el 17 de mayo de 1995.

²Fitopatóloga, Cuarentena Vegetal, Depto. Sanidad Vegetal, República Dominicana.

³Investigadora, Departamento de Protección de Cultivos, Recinto Universitario de Mayagüez, Apartado 5000, Mayagüez, P.R. 00681.

⁴Investigador, Departamento de Agronomía y Suelos.

smaller and the induction of symptoms less successful. Age of trifoliolate did not influence the success of the inoculations. Validation tests showed the potential of microdrops as a useful technique for the evaluation of bean genotypes.

Key words: methods, web blight, resistance, beans, *Rhizoctonia solani*

INTRODUCCION

La habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo alimenticio básico para los pueblos de las Américas y de Africa. Generalmente es un cultivo de subsistencia de productores de escala pequeña y mediana, constituyendo una fuente de ingresos para las familias rurales.

La enfermedad de mustia hilachosa es uno de los principales factores limitantes en la producción de habichuela en la zonas húmedas y cálidas del trópico (Thurston, 1984). Esta enfermedad causa defoliación rápida y drástica de las plantas y en la mayoría de los casos es responsable de la pérdida total de la cosecha (Cardona et al., 1982). El organismo causal de esta enfermedad es el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn, [teleomorfo = *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]. La infección puede iniciarse por micelio, esclerocios y basidiosporas (Galindo et al., 1983) y es más severa bajo condiciones de temperatura y humedad relativa altas, condiciones típicas de los trópicos húmedos durante la estación lluviosa.

La estrategia de control más factible para la mayoría de las áreas en cultivo es el uso de variedades resistentes. Existen diferencias entre variedades de los cultivos agrícolas en su reacción a *R. solani*, pero ninguno ha mostrado poseer niveles altos de resistencia a este patógeno (Oyekan et al., 1976). Recientemente se han identificado progenies de habichuela que han mostrado ciertos grados de resistencia (Gálvez et al., 1989). La mayoría de estos trabajos se han realizado bajo condiciones de campo donde los niveles de inóculo pueden variar y las condiciones climáticas óptimas para el desarrollo de la infección están condicionadas a las épocas del año. Se han realizado pruebas con inoculaciones en el invernadero pero no se obtiene una expresión gradual de síntomas como ocurre en las infecciones naturales. Esto dificulta detectar diferencias en la reacción de las plantas evaluadas.

Es necesario desarrollar métodos de inoculación que puedan ser utilizados en los programas de fitomejoramiento. El método debe 1) garantizar el contacto del patógeno con las progenies a evaluar, 2) no estar limitado por las épocas del año, 3) uniformar la distribución del inóculo para minimizar los escapes y 4) asegurar que el nivel del inóculo es el adecuado para la expresión de síntomas. El propósito de este trabajo fue desarrollar un método con estas características.

MATERIALES Y METODOS

Los ensayos se llevaron a cabo en invernaderos del Recinto Universitario de Mayagüez utilizando la cultivar de habichuela 'Arroyo Loro', susceptible a *R. solani*. Las plantas se desarrollaron a partir de semillas que se sembraron (dos por tiesto de 12 cm de diámetro) en una mezcla comercial de musgo, perlita y vermiculita.

Como inóculo se utilizó el aislado de *R. solani* AG-1-1B tipo macrosclerótico proveniente de hojas enfermas de la cultivar Arroyo Loro de Isabela, P.R. Se desarrollaron colonias del hongo en platos de Petri de 60 mm de diámetro en agar de papa y dextrosa (APD) a 24°C. Cada plato contenía una colonia del hongo la cual había cubierto toda la superficie. Las inoculaciones se realizaron en el haz de los folíolos de la primera hoja trifoliada y 12 hrs después se le aplicó riego por aspersión a un régimen de 2 min cada media hora. Los controles consistieron de plantas tratadas con APD macerado y sin tratar. Las condiciones ambientales durante las pruebas se determinaron con un higrotermógrafo el cual registró una humedad relativa de 80 a 85% y un promedio en temperatura de 27 a 30°C.

Se hicieron observaciones diarias por seis días. Las variables estudiadas se examinaron utilizando como criterios generales el tamaño promedio de la lesión, la presencia de clorosis y el porcentaje de defoliación. Las lesiones formadas fueron irregulares por tanto se midió el diámetro de la lesión desde varios ángulos y se determinó el promedio. Para determinar el porcentaje de defoliación se usó como base el total de trifolios inoculados. Cada experimento se repitió dos veces y los datos se expresan como resultado del análisis de variancia combinado. Cuando fue necesario se utilizó la prueba de la Diferencia Mínima Significativa ($P \leq 0.05$).

Métodos de inoculación. Se evaluaron tres métodos de inoculación: masivo (virtiéndolo directamente sobre la superficie la suspensión de inóculo), microgotas (aplicando en forma localizada 20 μ l de la suspensión) y discos de agar (colocando los discos con la parte del micelio en contacto directo con la superficie foliar). En cada folíolo hubo tres puntos de inoculación y no se hirió la superficie antes de colocar el inóculo.

El inóculo se preparó macerando las colonias por 1 min en una licuadora con 50 ml de agua destilada esterilizada por colonia. Se incluyó un control adicional de plantas tratadas con discos de APD sin el hongo. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente aleatorizado con 12 repeticiones.

Evaluación del volumen y dilución de inóculo. Los tratamientos consistieron en la combinación de volumen y dilución de inóculo. La dilución se realizó macerando la colonia del hongo en 50, 100, 150 y 200 ml de agua destilada estéril por plato de Petri. El volumen de inóculo

estuvo representado por gotas de 5, 10, 15 y 20 μ l. Las inoculaciones se realizaron utilizando una micropipeta calibrada. Los tratamientos se arreglaron en un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones y se compararon las tendencias lineales y cuadráticas.

Edad del inóculo. Se examinaron cuatro edades del inóculo representadas por colonias de dos, cuatro, seis y ocho días. El hongo creció en los platos de Petri con 10 μ l de APD. El inóculo se preparó a una dilución de 100 ml de agua destilada esterilizada por colonia. La inoculación se llevó a cabo colocando 10 μ l del inóculo en cada folíolo. Los tratamientos se replicaron seis veces y se examinaron las tendencias lineales y cuadráticas.

Edad de la hoja. Los tratamientos fueron inoculaciones en las hojas cotiledóneas (seis días); unifoliadas (27 días); primera (24 días); segunda (21 días); tercera (18 días) y cuarta (14 días) trifoliada. Las inoculaciones de las hojas cotiledóneas y unifoliadas se hicieron con un punto de inoculación y en las trifoliadas, en cada folíolo. El diseño fue de bloques completos al azar con seis repeticiones.

Evaluación de genotipos. Para validar la técnica desarrollada se evaluaron genotipos de habichuela del proyecto de mejoramiento de la Estación Experimental Agrícola y del Centro Internacional de Agricultura Tropical. Como inóculo se utilizaron colonias de *R. solani* desarrolladas por cuatro días. El haz de la primera hoja trifoliada se inoculó, cuando se encontraba completamente expandida, utilizando 10 μ l de la suspensión del inóculo diluido en 100 ml de agua destilada esterilizada.

Los tratamientos se arreglaron en el invernadero en un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones. Como control de susceptibilidad se utilizó la cultivar Arroyo Loro. Los criterios de evaluación fueron: período de incubación y las reacciones de los genotipos; evaluadas utilizando una escala de 1 a 5 donde 1 = sin síntomas, 2 = lesiones \leq 0.5 cm, 3 = lesiones de 0.6 a 0.7 cm con clorosis, 4 = lesiones irregulares de 0.8 a 1.0 cm con clorosis y necrosis y 5 = lesiones $>$ 1.0 cm con necrosis severa y defoliación (Figura 1).

Para examinar la escala se consideraron todos los puntos de inoculación y se analizó por regresión, $T = a + bE$ donde; T = tamaño de la lesión y E = valores de la escala. Los valores de la escala y el tamaño de la lesión se compararon calculando el coeficiente de correlación de rangos de Spearman.

RESULTADOS

Los síntomas en las plantas inoculadas fueron típicos de mustia hilachosa. En todas las inoculaciones las plantas testigos estuvieron



FIGURA 1. Escala de 1 a 5, utilizada para evaluar genotipos de habichuela en el invernadero donde 1 =sin síntomas; 2 = lesiones ≤ 0.5 cm; 3 = lesiones de 0.6 a 0.7 cm con clorosis; 4 = lesiones de 0.8 a 1.0 cm con clorosis y necrosis y 5 = lesiones > 1.0 cm con necrosis severa y defoliación.

libres de la enfermedad indicando que la expresión de síntomas se debía a la inoculación. Las hojas manifestaron síntomas seis días después de inoculadas y en la mayoría ya había ocurrido defoliación.

Métodos de inoculación. Con todos los métodos utilizados, *R. solani* infectó las plantas produciendo los síntomas típicos, pero con diferencias en severidad. Al utilizar el método masivo las lesiones fueron grandes, con abundante clorosis y defoliación a las 72 hrs después de la inoculación (Cuadro 1 a). Con el método de disco las plantas inoculadas también mostraron clorosis severa con defoliación temprana aunque en menor intensidad. No se pudo determinar el tamaño de la lesión con este método ya que los discos tendían a resbalar por la superficie. Los síntomas aparecieron gradualmente cuando las inoculaciones se hicieron con microgotas. Inicialmente las lesiones se manifestaron como manchas circulares y concéntricas que tendían a unirse según avanzaba la infección. Al utilizar las microgotas la clorosis fue menos evidente que con los dos métodos anteriores y la severidad de la infección fue menor.

Evaluación del volumen y dilución de inóculo. Hubo diferencias significativas en el tamaño de la lesión para los efectos de volumen y dilución y no para la interacción, indicando la independencia de los factores. Se observó que a medida que aumentó el volumen de inóculo aumentó el tamaño de la lesión (Figura 2A). El efecto de dilución fue a la inversa, a medida que aumentó la dilución se redujo el tamaño de la

CUADRO 1.—Influencia de los métodos de inoculación con *Rhizoctonia solani* y la edad de la hoja de *Phaseolus vulgaris* en el tamaño de la lesión y en el porcentaje de defoliación.

a. Métodos ¹		
Tipo	Tamaño de la lesión (cm)	Defoliación (%)
Masivo	1.14	70
Gotas	0.73	40
Discos	— ²	55
DMS (P ≤ 0.05)	0.093	
CV (%)	10.99	
b. Edad de la hoja ³		
Trifoliada	Tamaño de la lesión (cm)	Defoliación (%)
Primera	0.67 ⁴	42
Segunda	0.70	39
Tercera	0.62	39
Cuarta	0.63	40
CV (%)	7.87	

¹Análisis combinado de dos ensayos con 12 repeticiones.

²No se determinó.

³Análisis combinado de dos ensayos con seis repeticiones.

⁴No se detectaron diferencias significativas.

lesión (Figura 2B). El efecto de dilución y volumen fue significativamente lineal, siendo el de dilución mayor que el de volumen (Cuadro 2a). La tendencia cuadrática, aunque significativa, fue mucho menor.

El inóculo de *R. solani* preparado a la dilución de 50 ml de agua causó clorosis abundante y defoliación tres días después de la inoculación, siendo más severo con el volumen de 15 y 20 µl. Plantas inoculadas con *R. solani* a la dilución de 150 y 200 ml mostraron folíolos sin síntomas, poca clorosis y defoliación. Por otro lado, las lesiones formadas con diluciones de 100 ml mostraron un desarrollo de síntomas gradual y el éxito de las inoculaciones fue satisfactorio. La inoculación utilizando 100 ml de dilución aplicado en 10 µl resultó ser la más conveniente para las inoculaciones con *R. solani*. Esta combinación permitió una expresión gradual de los síntomas sin mostrar severidad temprana de la enfermedad.

Edad del inóculo. Con excepción del inóculo de ocho días todos los demás indujeron síntomas característicos de mustia hilachosa pero con

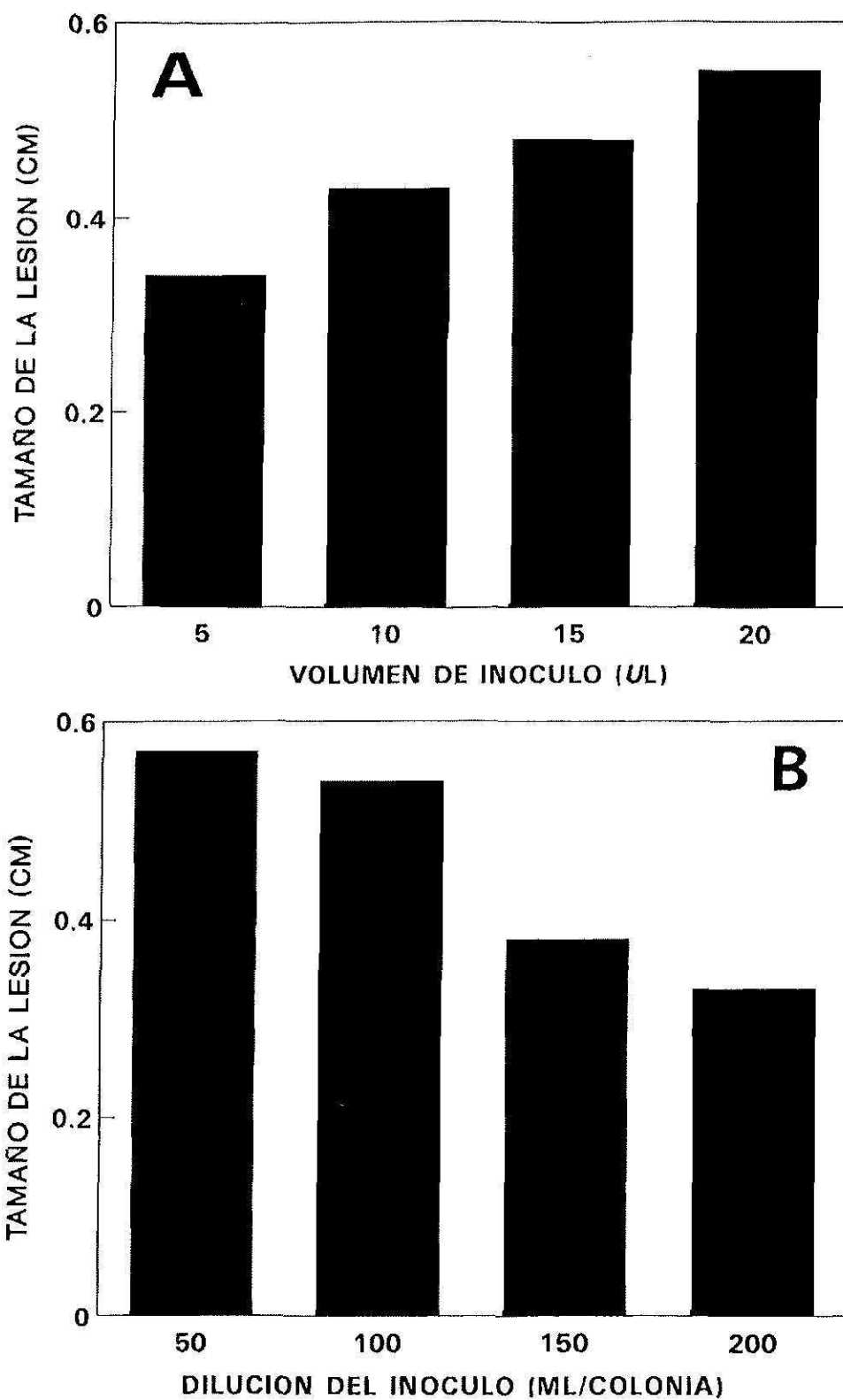


FIGURA 2. Efecto del volumen (A) y dilución (B) del inóculo de *Rhizoctonia solani* en el tamaño de la lesión en trifolios de *Phaseolus vulgaris*.

CUADRO 2.—Tendencia lineal y cuadrática del efecto volumen, dilución y edad del inóculo de *Rhizotonia solani* en el tamaño de la lesión de *Phaseolus vulgaris*.

a. Volumen y dilución¹

Fuente de Variación	gl	C.M.
Volumen Lineal	1	418*
Volumen Cuadrática	1	5.2*
Dilución Lineal	1	605*
Dilución Cuadrática	1	3.5*
Error		0.002

b. Edad del inóculo²

Fuente de Variación	gl	C.M.
Edad Lineal	1	264*
Edad Cuadrática	1	33*
Error		0.005

*Significativo a $P \leq 0.05$.

¹Análisis combinado de dos ensayos con cuatro repeticiones.

²Análisis combinado de dos ensayos con seis repeticiones.

virulencia variable. El éxito de las inoculaciones con las colonias de *R. solani* de ocho días de edad fue muy pobre y algunos de los folíolos tenían lesiones muy pequeñas con poca clorosis. Los inóculos de dos, cuatro y seis días son más confiables siendo el de cuatro días el más recomendado debido a la consistencia en la expresión de síntomas. El efecto de edad fue significativamente lineal y negativo; a medida que aumenta la edad del inóculo se reduce el tamaño de la lesión (Cuadro 2b).

Edad de la hoja. Las hojas cotiledóneas continuaron su crecimiento aún después de inoculadas. Los síntomas de mustia hilachosa se manifestaron cuando aparecieron las unifoliadas. La clorosis y defoliación comenzó después del cuarto día de la inoculación. Las hojas unifoliadas presentaron clorosis total y defoliación a las 72 hrs después de inoculadas. Los datos de estas hojas no se incluyeron en el análisis ya que tenían menos puntos de inoculación que las demás.

No se observaron diferencias marcadas en la expresión de síntomas de las hojas trifoliadas de diferentes edades. Se observó mayor clorosis en los folíolos más viejos. Todas las hojas manifestaron síntomas a las 48 hrs, con clorosis y defoliación el tercer y cuarto día después de la inoculación. No hubo diferencias significativas en el tamaño de la lesión de los folíolos inoculados (Cuadro 1b).

Evaluación de genotipos. El periodo de incubación fue igual para los genotipos ya que todos mostraron síntomas de mustia hilachosa a las 48 hrs después de la inoculación. La mayoría de los genotipos presentó clorosis después del tercer día y en otros genotipos ocurrió defoliación después del cuarto día de la inoculación. Todos los genotipos evaluados tuvieron lesiones significativamente más pequeñas que el control susceptible (Cuadro 3).

El análisis de regresión fue significativo. La ecuación de regresión $T = 0.009 + 0.21 E$, donde T = tamaño de lesión y E = escala de evaluación, indica que por cada unidad de los valores de la escala hay un aumento de 0.21 cm en el tamaño de la lesión. El coeficiente de determinación indicó que la escala explica el 76% de la variación en la reacción de los genotipos. La magnitud de la correlación de rangos Spearman entre tamaño de la lesión y valor de la escala fue de 0.57.

CUADRO 3.—*Reacción de genotipos y variedades de Phaseolus vulgaris a inoculaciones con Rhizotonia solani utilizando el método de microgotas.*

Genotipos	Color del Grano	Valor en la Escala	Tamaño de la lesión (cm)
Arroyo Loro	Blanco	5	1.18
Anacaona	Blanco	5	0.95
9283-1	Blanco	3	0.87
9338-3	Rojo	4	0.85
9338-6	Rojo	3	0.77
9338-5	Rojo	3	0.77
9338-4	Rojo	3	0.67
9338-9	Rojo	3	0.63
9338-7	Rojo	3	0.63
9338-1	Rojo	3	0.60
9283-4	Blanco	2	0.60
BAT-477	Rojo Pinto	3	0.60
9276-35	Rojo Moteado	3	0.60
9338-2	Rojo	3	0.60
DOR-483	Rojo	3	0.53
9338-8	Rojo	2	0.50
9276-61	Rosado	4	0.50
9236-20	Rojo Pinto	2	0.50
Talamanca	Negro	3	0.47
DOR-482	Rojo	3	0.47
D.M.S. ($P < 0.05$)			0.13
C.V. (%)			6.63

DISCUSION

Las lesiones que induce un patógeno son el resultado de su patogenicidad. El tamaño de la lesión y la defoliación están sujetos a su virulencia y son indicadores de la severidad. Al evaluar genotipos en un programa de fitomejoramiento es necesario garantizar la patogenicidad del organismo pero también es vital evitar la excesiva severidad permitiendo así la expresión de niveles moderados de resistencia. El método que se utilice en las inoculaciones para evaluar genotipos debe simular lo mejor posible las inoculaciones naturales y debe ser reproducible. Dhingra y Sinclair (1985) determinaron que la cantidad y calidad del inóculo, la edad de la hoja y las condiciones de incubación son factores que afectan la severidad.

El método de discos de agar ha sido usado con éxito en las inoculaciones con *R. solani* en habichuela (Galindo et al., 1982). Sin embargo, en este estudio encontramos que este método no fue adecuado debido a que los discos no se mantenían en la superficie de la hoja. Es posible que estas diferencias se deban a que ellos utilizaron cámaras de humedad mientras nosotros mantuvimos la humedad por medio de riego aéreo.

De todos los métodos evaluados el de microgotas resultó ser el más confiable. Este método no sólo permite la distribución uniforme del inóculo en todas las superficies que se aplique sino también permite flexibilidad para determinar la concentración más adecuada. Además, al ser una inoculación localizada, permite observar directamente el punto de inoculación haciendo más eficiente la toma de datos. Este método ha sido utilizado no sólo para estudios básicos de patología (Fourie y Holtz, 1995; Pennypacker et al., 1995) sino también para evaluación de resistencia en genotipos promisorios (Cienfuegos, 1991; Eskes, 1982).

La combinación de 10 μ l y 100 ml de volumen y dilución, respectivamente, permite la expresión de síntomas de una manera gradual simulando el desarrollo de una infección bajo condiciones naturales. Posiblemente el efecto observado entre el tamaño de la lesión con el volumen de inóculo se deba a que gotas de mayor volumen ocupan mayor área y consecuentemente la exposición de la superficie es mayor. Por otro lado, el efecto de la dilución se relaciona con la cantidad de propágulos presentes en la suspensión.

Encontramos que a medida que aumentó la edad de la colonia de *R. solani* éste perdió virulencia, evidenciando la necesidad de estandarizar los métodos para este tipo de trabajo. En las inoculaciones con este patógeno la edad de las hojas trifoliadas no fue determinante para el éxito de la infección aunque sí para la defoliación ya que se observó que a medida que la hoja era más vieja se defoliaba más rápidamente.

El uso del método de microgotas para la evaluación de genotipos permite detectar diferencias entre las reacciones con más precisión. En la población examinada el rango de lesiones fue desde 1.18 cm hasta 0.47 cm, y las reacciones fluctuaron entre los valores 2 al 5 en la escala. Los resultados indican que la mayoría de los genotipos no poseen niveles altos de resistencia, sin embargo, se pudieron detectar genotipos con reacciones prometedoras.

Existen escalas que se utilizan comúnmente para la evaluación de genotipos bajo condiciones de campo (van Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987). Sin embargo, se evalúa toda la planta ya que en el campo la planta está expuesta al inóculo en su totalidad. La escala que intentamos desarrollar en este estudio tuvo como propósito examinar directamente el punto de inoculación y facilitar la evaluación bajo las condiciones de invernadero, sin necesidad de medir las lesiones, tarea que consume mucho tiempo y no es práctica para la evaluación de grandes poblaciones. El análisis indicó que hay que refinar la escala ya que no puede explicar el 24% de las reacciones obtenidas, debido posiblemente a las reacciones intermedias entre genotipos. Hubo genotipos como el 9276-61, Talamanca y DOR-482 a los cuales por el tamaño de la lesión les correspondía un valor de 2 en la escala pero debido a la clorosis avanzada y severidad obtuvieron valores de 3 y 4 (Cuadro 3). Lo inverso ocurrió con el genotipo 9338-6 que tenía un tamaño de lesión correspondiente a un valor de 4, sin embargo en la evaluación obtuvo un valor de 3 por manifestar poca clorosis.

La selección del método a utilizar en las inoculaciones con patógenos tiene que estar determinada por el objetivo del trabajo y las condiciones bajo las cuales se van a realizar las inoculaciones. La evaluación final de resistencia se realiza en el campo, sin embargo, una discriminación menos conservadora en el invernadero reduce el riesgo de eliminar genotipos promisorios, no está limitada por las épocas del año, reduce los costos de las evaluaciones en el campo y evita los escapes a la infección. El método que hemos desarrollado provee una alternativa para estudios de la relación *R. solani* - *P. vulgaris* y posee el potencial para identificar genes menores de resistencia al patógeno de la mustia hilachosa.

LITERATURA CITADA

- Cardona, C., C. A. Flor, F. J. Morales y M. A. Pastor-Corrales, 1982. Problemas de campo en los cultivos del frijol en América Latina. CIAT, Cali, Colombia. 7:36-39.
- Cienfuegos, R. E., 1991. Métodos de inoculación para cuantificar resistencia poligénica en añublo polvoriento en *Cucurbita moschata* (Duch). Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. 62 pp.

- Dhingra, O. D. y J. B. Sinclair, 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC, Press, Inc., Boca Raton, Fla. 355 pp.
- Eskes, A. B., 1982. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). *Neth. J. Pl. Path.* 88:127-141.
- Fourie, J. F. y G. Holtz, 1995. Initial infection processes by *Botrytis cinerea* on nectarine and plum fruit and the development of decay. *Phytopathology* 85:8287.
- Galindo, J. J., G. S. Abawi y H. D. Thurston, 1982. Variability among isolates of *Rhizoctonia solani* associated with snap bean hypocotyls and soils in New York. *Plant Disease* 66:390-394.
- Galindo, J. J., G. S. Abawi, G. Gálvez y H. D. Thurston, 1983. Source of inoculum and development of bean web blight in Costa Rica. *Plant Disease* 67:1016-1021.
- Gálvez, G. E., B. Mora y M. A. Pastor-Corrales, 1989. Web blight. In: Bean Production Problems in the Tropics, H. F. Schwartz y M. A. Pastor-Corrales (Eds.), CIAT, Cali, Colombia. 424 pp.
- Oyekan, P. O., P. T. Onesirosan y R. J. Williams, 1976. Screening for resistance in cowpea to web blight. *Trop. Grain Legume Bull.* 3:6-8.
- Pennypacker, B. W., D. P. Knievel, M. L. Risius y K. T. Leath, 1995. Phytosynthetic photon flux density \times pathogen interaction in growth of alfalfa infected with *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 84:1350-1357
- Thurston, H. D., 1984 Web blight of bean. In: Tropical Plant Diseases. APS Press, St. Paul, Minn. pág 88-93.
- van Schoonhoven, A. y M. A. Pastor-Corrales, 1987. Sistema Estándar para la Evaluación de Germoplasma de Frijol CIAT, Cali, Colombia p. 34-35.