

# Efecto de extractos etanólicos de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *Sesami*

## Sesame (*Sesamum indicum* L.) ethanolic extracts effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*

Pedro Fernández y Hernán Laurentin\*

Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, UCLA, Venezuela. \*Autor para correspondencia: [hlaurentin@ucla.edu.ve](mailto:hlaurentin@ucla.edu.ve)

Rec.:19.01.2015 Acep.: 06.05.2015

### Resumen

La producción de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) en Venezuela tiene entre sus principales enemigos la incidencia del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*, el cual causa la enfermedad conocida como marchitez fungosa. Una de las potenciales opciones para su control es la utilización de extractos vegetales. En el ensayo, utilizando celdas de placas de ELISA se evaluó el efecto de extractos etanólicos de raíz y tallo de los cultivares (cvs.) de ajonjolí Fonucla, INIA y UCLA295 sobre el crecimiento de este hongo. En las celdas se colocaron 0.2 ml de una suspensión de esporas del patógeno de 200 conidias/ml en caldo de papa-dextrosa que recibieron la aplicación de 0.2 ml de los extractos obtenidos de raíz y tallo de cada uno de los tres cultivares, en un ensayo con tres tratamientos (extractos de cultivares) por cada órgano de planta utilizado y 24 repeticiones. La densidad óptica se evaluó cada 12 horas, durante 192 horas. Los extractos de raíz de ajonjolí en general inhibieron el crecimiento y desarrollo del hongo, mientras que los extractos de tallo tendieron a estimular el crecimiento del mismo. Solo los extractos de raíz del cultivar INIA afectaron de una manera significativa ( $P < 0.05$ ) el desarrollo del fitopatógeno. Los extractos de raíz inhibieron hasta en 25% el crecimiento del hongo con respecto al control, mientras que los extractos de tallo promovieron el crecimiento hasta en 20%. Estos resultados demuestran la existencia de diferencias en la composición bioquímica de raíces y tallos de ajonjolí y diferencias entre cultivares, lo cual es deseable al momento de utilizar el criterio de composición bioquímica en un programa de mejoramiento genético orientado hacia la obtención de cultivares con resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*.

**Palabras clave:** Conidias, densidad óptica, hongo del suelo, raíz, tallo, ajonjolí.

### Abstract

One of the most important constraint in Venezuela sesame production is the incidence of the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*, which causes the disease called fungus wilt. A control option is to use plant extracts. The objective of this research was to evaluate the effect of sesame root and stem extracts of the three sesame cultivars Fonucla, INIA and UCLA295 on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*. It was evaluated by means of the record of *in vitro* growth in ELISA microplates cells in presence of 0.2 mL of sesame root or stem extracts. Each treatment (root and stem extracts of each sesame cultivar was replicated 24 times. Each cell contained 0.2 mL of spore suspension (200 conidia mL<sup>-1</sup>) in potato dextrose broth and one of the treatments. Optical density was recorded each 12 h during 192h. Root extracts had the trend of inhibiting fungus growth, however only extracts coming from cultivar INIA had statistical differences ( $P < 0.05$ ); it inhibited up to 25% of fungus growth. On the contrary, stem extracts had the trend of stimulating fungus growth, but only INIA cultivar had a significant effect ( $P < 0.05$ ) as compared to the control treatment, reaching to promote up to 20% of growth. These results display difference in biochemical composition of root and stem metabolites in sesame. This situation is desirable because it indicates genetic diversity in the sesame defense strategies against the fungus, and it could be taken into account for designing sesame breeding programs against biotic stress.

**Keywords:** Conidia, optical density, soil borne fungus, root, stem

## Introducción

El ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) es uno de los cultivos más antiguos en el mundo y se produce en regiones tropicales y subtropicales (Ashri, 1998). Este cultivo es importante por el aceite que se extrae de su semilla, el cual se considera de excelente calidad debido al balance de ácidos grasos (Bedigian, Seigler y Harlan, 1985) y al alto contenido de antioxidantes naturales (Cheung, Szeto, y Benzie, 2007) que presenta. En América el ajonjolí es un cultivo de importancia económica; Venezuela, Paraguay, México y Guatemala, en conjunto abarcan el 3% de la producción mundial y el 12% del mercado de exportación (FAO, 2015).

Esta planta tiene una serie de enemigos biológicos que pueden limitar su producción en campo, siendo los principales la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y los hongos del suelo *Phytophthora parasitica*, *Alternaria sesami*, *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum*. Las dos últimos son los hongos más frecuentes en los campos de producción de ajonjolí en Venezuela.

*Fusarium oxysporum* (fusarium) es un hongo del suelo que sobrevive como saprófito; sin embargo, bajo condiciones favorables tiene la capacidad de ser patógeno a una amplia variedad de especies vegetales cultivadas, entre ellas ajonjolí. Este hongo se clasifica en la subdivisión Deuteromycota (Fungi imperfecto) porque carece de reproducción sexual (Ohara y Tsuge, 2004). Infecta las plantas y crece internamente a través de la corteza causando marchitamiento de la planta (Bowers y Locke, 2000) y pérdidas de importancia económica (Ohara y Tsuge, 2004).

Tiene amplia variabilidad y por su gran poder de dispersión se encuentra infectando más de 150 hospederos específicos (Baayen *et al.*, 2000), lo que ha llevado a agrupar la especie en distintas formas especiales. La forma especial para el ajonjolí ha sido identificada como *F. oxysporum* f. sp. *sesami*, que causa la enfermedad llamada pudrición basal del ajonjolí. Según Pineda (2002) los síntomas y signos de la enfermedad se caracterizan inicialmente por el amarillamiento de las hojas sólo por un lado de la planta, también se puede observar encorvamiento de las hojas, cápsulas y tallo. Con el tiempo, las hojas se secan y aparece una franja de color pardo a lo largo del tallo, sobre la cual se observa un polvillo de color rosado constituido por estructuras de fructificación del hongo. Finalmente la enfermedad invade todo el tallo y la planta muere. El tallo de la planta muerta es vano y en sus paredes internas se presenta un color rosado debido a la lisis causada por las toxinas y enzimas del patógeno. En plantas pequeñas, la enfermedad se manifiesta por necrosis húmeda del tallo, marchitamiento y muerte repentina. La semilla de la planta enferma es infectada por el hongo en forma sistémica y si el ataque es temprano, la semilla es abortada.

El control de la pudrición causada por *Fusarium* se realiza principalmente mediante la aplicación de agentes químicos en el suelo y el uso de cultivares resistentes (Fravel, Olivain y Alabouvette, 2003). La aplicación de extractos de plantas para reducir la incidencia de microorganismos es una estrategia que ha tenido auge en los últimos años, no obstante se requiere una rigurosa evaluación con el fin de conocer el efecto de los extractos sobre el patógeno. Existen cerca de 500,000 especies de plantas, pero la actividad antimicrobiana de sus extractos ha sido estudiada solo en unas pocas de ellas (De Lucca, Cleveland y Wedge, 2005). La mayoría de estudios que buscan identificar extractos o moléculas con un potencial efecto antimicrobiano se han concentrado en la variabilidad interespecífica, pero no en la variabilidad dentro de la especie (Ghosh, 2006). Los estudios del efecto de extractos de plantas sobre microorganismos son un punto de partida de nuevas estrategias de control y de identificación de genotipos de plantas que posean moléculas con actividad antimicrobiana, de manera que puedan ser incorporados en programas de mejoramiento genético. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de extractos etanólicos de raíz y tallo de ajonjolí sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*.

## Materiales y métodos

### Aislamiento del hongo

El hongo *F. oxysporum* f. sp. *sesami* fue aislado de una planta cultivada en una unidad de producción comercial de Turén, estado Portuguesa (Venezuela), la cual presentaba síntomas de marchitamiento desde la base hacia las partes apicales. Las secciones aisladas del tejido enfermo se colocaron en agar-agua (1.5% p/v) y las secciones del micelio característico de *Fusarium oxysporum* se transfirieron a medio agar-papa-dextrosa (PDA) (Merck, Darmstadt, Alemania) al 3.9% (p/v). El hongo que se desarrolló fue identificado como *F. oxysporum* por el personal del laboratorio de Fitopatología del Decanato de Agronomía de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. El aislamiento obtenido fue conservado a 4 °C en cajas Petri conteniendo PDA.

### Extractos etanólicos

Con base en los estudios de diversidad genética de ajonjolí de Laurentin y Karlovsky (2007) se usaron tres cultivares (cvs.) como fuente de extractos etanólicos: Fonucla (Montilla y Cedeño, 1991), UCLA295 (Laurentin, Montilla y García 2004) e INIA (obtención no publicada). De cada uno de los cultivares se tomaron 50 semillas que fueron colocadas en vasos plásticos, utilizando como sustrato una mezcla de suelo orgánico y

arena en proporción 1:1. Después de 3 semanas de germinación se seleccionaron plantas de cada uno de los cultivares en buen estado fisiológico a las que se les desprendieron las hojas y separaron las raíces de los tallos. Tanto las raíces como los tallos de cada cultivar fueron triturados en mortero antes de agregar etanol al 80% en una proporción de 1:5 (p/v), es decir, por cada gramo de peso fresco de raíz o tallo, fueron agregados 5 ml de etanol al 80%. Luego de este procedimiento, el material triturado se pasó a través de filtros número 5 y se transfirió a tubos de ensayos de 50 ml para almacenarlos a -20 °C. De esta manera, se obtuvieron seis tratamientos, dos por cada cultivar: extractos etanólicos de raíz y tallo de cvs. Fonucla, UCLA295 e INIA.

### Bioensayos

Inmediatamente antes del establecimiento del bioensayo, se obtuvo una suspensión de conidias del hongo mediante la adición de 10 ml de agua destilada en la caja Petri donde se encontraba el hongo, complementado con raspado superficial. Dicha suspensión fue ajustada a 2000 conidias/ml mediante la adición de volúmenes de agua destilada y conteo en un hematocímetro. El efecto de cada tratamiento sobre el crecimiento de *F. oxysporum* se evaluó en placas de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) de 96 celdas. Cada tratamiento consistió en 24 repeticiones (24 celdas de la placa), y en cada uno de ellos se colocaron 200 µl del extracto de cada tratamiento (equivalente a 40 mg de peso fresco de tejido). Como tratamiento control se colocaron 200 µl de etanol al 80%, igualmente en 24 repeticiones. Luego de la evaporación total del etanol durante 12 h, tanto en los extractos como en el tratamiento control, se agregaron 0.2 ml de la mezcla de 9 ml de PDB (caldo de papa dextrosa) con 1 ml de la suspensión de conidias, en cada una de las celdas (aproximadamente 40 conidias). Al momento del establecimiento del ensayo, se tomó la lectura de la densidad óptica de cada una de las celdas con el lector de ELISA µQuant Universal (BioTekInstrument, Inc. USA) a una longitud de ondas de 450 nm. Esta operación se realizó cada 12 h hasta el momento en el cual no se observaron variaciones en las lecturas. Se infirió que los cambios en la densidad óptica fueron debidos a la variación en la turbidez en las celdas, como consecuencia de la formación y crecimiento de micelio.

### Análisis estadístico de datos

Para el análisis del crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de cada uno de los extractos de los tres genotipos de ajonjolí, se utilizó un diseño factorial, donde los factores principales fueron cultivares de ajonjolí, tiempo de medición y la

interacción entre ambos. Luego de realizar un análisis de varianza, en aquellas fuentes de variación donde hubo diferencias significativas se probaron las medias con respecto al control para cada hora de medición mediante la prueba de Dunnet. Los análisis se hicieron con el programa estadístico Statistix for Windows versión 8.0.

### Resultados y discusión

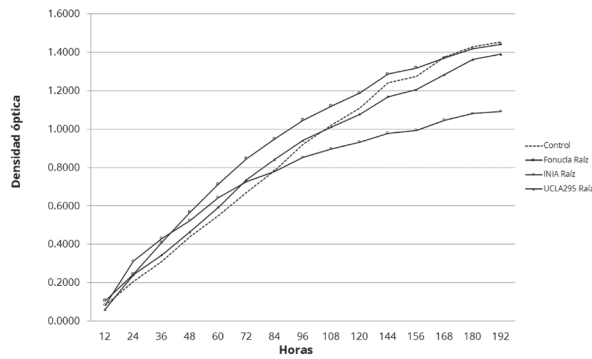
Las mediciones de la densidad óptica se hicieron hasta la hora 192, momento en el cual los cambios en los valores de esta variable no fueron significativos. El análisis de varianza (C.V. = 11%) mostró significancia ( $P < 0.05$ ) para la interacción cultivar x tiempo de medición para los extractos de raíz y de tallo. A partir de la hora 108, la densidad óptica en las celdas que contenían extracto de raíz del cv. INIA fue menor ( $P < 0.05$ ) en relación con el tratamiento control (Tabla 1), lo que indica que los extractos de raíz de este cultivar tienen capacidad para inhibir el crecimiento in vitro del hongo a partir de esa hora. Las densidades ópticas de las celdas ocupadas por extractos de raíz de los otros dos cultivares resultaron estadísticamente iguales al control; es decir, no tenían capacidad de afectar el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *sesami*.

**Tabla 1.** Densidad óptica medida en celdas de las placas de ELISA al comparar el efecto de extractos de raíces de tres genotipos de ajonjolí vs. el tratamiento control. Estado Portuguesa, Venezuela.

Horas de incubación	Genotipo o cultivar		
	Fonucla	INIA	UCLA295
24	0.0379	0.1074	0.0366
36	0.0987	0.1203	0.0335
48	0.1279	0.0842	0.0254
60	0.1642	0.0943	0.0440
72	0.1743	0.0559	0.0651
84	0.1626	0.0110	0.0560
96	0.0265	-0.1677	-0.0784
108	0.0099	-0.2127*	-0.0339
120	0.0101	-0.2222*	-0.0551
132	0.0242	-0.2457*	-0.0554
144	0.0433	-0.2625*	-0.0747
156	0.0426	-0.2815*	-0.0779
168	-0.0048	-0.3282*	-0.0917
180	-0.0095	-0.3472*	-0.0660
192	-0.0105	-0.3589*	-0.0534

valores seguidos por un asterisco (\*) difieren estadísticamente del control,  $P < 0.05$  según la prueba de Dunnet.

La dinámica de cambios en la densidad óptica como indicador del crecimiento del hongo en presencia de los extractos de raíz de los tres cultivares de ajonjolí aparece en la Figura 1. Los extractos etanólicos de tallo obtenidos de los cvs. UCLA295 y Fonucla no afectan el hongo, de tal manera que no se presentaron diferencias ( $P > 0.05$ ) en la densidad óptica comparadas con las celdas del control. Por el contrario, en el extracto etanólico obtenido de tallo del cv. INIA se registró una densidad óptica significativa ( $P < 0.05$ )



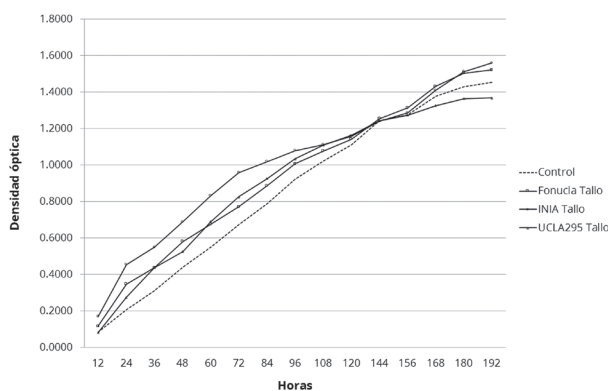
**Figura 1.** Crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* en presencia de extractos etanólicos de raíz de tres cultivares de ajonjolí. Estado Portuguesa, Venezuela

a la registrada en las celdas del control entre las horas 24 y 84 (Tabla 2). Lo anterior indica que este extracto contiene nutrientes que son aprovechados por el hongo para lograr un mayor crecimiento. La dinámica de cambios en la densidad óptica como indicador del crecimiento del hongo en presencia de los extractos de tallo de los tres cultivares de ajonjolí se observa en la Figura 2.

**Tabla 2.** Diferencias en la densidad óptica medida en las celdas de las placas de ELISA al comparar el efecto de los extractos de tallos de tres genotipos de ajonjolí con respecto al control. Estado Portuguesa, Venezuela.

Horas de incubación	Genotipo o cultivar		
	Fonucla	INIA	UCLA295
24	0.1411	0.2471*	0.0678
36	0.1255	0.2378*	0.1273
48	0.1405	0.2478*	0.0850
60	0.1256	0.2828*	0.1409
72	0.0986	0.2861*	0.1535
84	0.0993	0.2323*	0.1424
96	-0.0152	0.0572	0.0130
108	-0.0352	0.0465	-0.0025
120	0.0025	0.0013	-0.0021
132	0.1010	-0.0025	-0.0004
144	0.0107	-0.0043	0.0000
156	0.0372	0.0084	-0.0034
168	-0.0624	0.0330	-0.0503
180	0.0741	0.0833	-0.0653
192	0.0099	0.0789	-0.0691

Valores seguidos por un asterisco (\*) difieren estadísticamente del control,  $P < 0.05$  según la prueba de Dunnett.



**Figura 2.** Crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* en presencia de extractos etanólicos de tallo de tres cultivares de ajonjolí. Estado Portuguesa, Venezuela.

Los resultados obtenidos evidencian que las raíces del cv. INIA contienen metabolitos que impiden el libre crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *sesami*. Taiz y Zeiger (2010) consideran que los metabolitos secundarios son los responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales. En forma similar los extractos de tallo del cv. INIA son aprovechados por el hongo para su propio metabolismo, como lo indica el hecho que su adición en el medio permite un crecimiento más acelerado que en el tratamiento control. El hecho que extractos procedentes de distintos órganos de un mismo cultivar tengan efectos totalmente opuestos sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Sesami*, indica que la síntesis de metabolitos es diferencial y ajustada a las necesidades de la planta en cada órgano. Estos resultados, tanto del efecto de extractos de raíz como del de tallo sobre el crecimiento del hongo muestran la variabilidad intraespecífica de la composición metabólica en los distintos órganos de ajonjolí, resultados que fueron confirmados en los trabajos de Mendoza y Laurentin (2012) al evaluar el efecto de extractos etanólicos de cuatro cultivares de ajonjolí sobre el hongo *Macrophomina phaseolina*.

Aunque existen numerosos trabajos sobre la acción inhibitoria que poseen extractos de distintas especies de plantas sobre el crecimiento de fusarium (Sridhar Duggirala y Puchchakayala, 2014; Mikawlawng *et al.*, 2014; Singh, Singh, y Vidyasagar, 2014), la mayoría de ellos no usan especies vegetales que sean afectadas por este hongo, por lo cual el efecto de inhibición como consecuencia de la presencia de algún o algunos metabolitos no puede ser explicado por la coevolución. En el caso del presente trabajo, se considera que el efecto inhibitorio del extracto de raíces del cv. INIA puede ser debido a la presencia de metabolitos que han sido seleccionados naturalmente como un mecanismo de defensa de la planta. Una premisa similar fue propuesta por Khan, Ayub, y Ahmad (2007) quienes encontraron un efecto inhibitorio de extractos de raíces de girasol sobre el hongo *Macrophomina phaseolina*, el cual es patógeno de esta especie vegetal. La diferencia de composición metabólica entre raíz y tallo para un mismo cultivar puede ser explicada por la forma en que *F. oxysporum* f. sp. *sesami* logra la infección de la planta de ajonjolí. Siendo un hongo del suelo, la infección ocurre por penetración del micelio en las raíces de la planta (Wyllie, 1989), por esta razón los mecanismos de defensa de ésta contra este hongo deben estar concentrados en las raíces.

La identificación del efecto inhibitorio del extracto de raíz del cv. INIA, sugiere que este cultivar debe ser considerado como potencial progenitor en el momento de construir poblaciones

segregantes con fines de mejoramiento genético, ya que no obstante la inhibición ocurrió in vitro, se espera que el cultivar sea fuente de genes que permitan una composición metabólica, que de alguna manera, restrinjan el crecimiento de *F. oxysporum* in vivo. Este cultivar debe tener en cuenta como fuente de productos naturales para el control de fusarium.

## Conclusión

El efecto de los extractos de ajonjolí sobre el crecimiento in vitro de *F. oxysporum* f. sp. *sesami* depende del cultivar utilizado para obtener el extracto.

Los extractos de raíz del cv. INIA presentaron efectos inhibitorios sobre *F. oxysporum* —25% de inhibición vs. el testigo en la hora 192 de incubación.

Los extractos de tallo del cv. INIA fueron aprovechados por el hongo para su propio metabolismo, como lo indica el hecho que su adición en el medio permitió un crecimiento más acelerado que en el tratamiento control.

## Referencias

- Ashri, A. (1998). Sesame breeding. En: Janick, J. *Plant Breeding Reviews*. John Wiley & Sons., 16, 179 - 228.
- Baayen, R., O'Donnell, K., Bonants, P., Cigelnik, E., Kroon, L., Roebroek, E., y Waalwijk, C. (2000). Gene genealogies and AFLP analysis in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic forma especiales causing wilt and rot disease. *Phytopath.* 90, 891 - 900.
- Bedigian, D., Seigler, D., y Harlan, J. (1985). Sesamin, sesamol and the origin of sesame. *Biochem. Syst. Ecol.*, 13(2), 133 - 139.
- Bowers, J. y Locke, J. (2000). Efecto of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse. *Plant Disease*, 84(3), 300 - 305.
- Cheung, S., Szeto, Y., y Benzie, I. (2007). Antioxidant protection of edible oils. *Plant Foods Hum. Nutr.* 62(1), 39 - 42.
- De Lucca, A., Cleveland, T., y Wedge, D. (2005). Plant-derived antifungal proteins and peptides. *Can. J. Microbiol.*, 51, 1001 - 1014.
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2015). Base de datos de producción agropecuaria FAOstat. Recuperado de: [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org)
- Fravel, D.; Olivain, C.; y Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol.*, 157, 493 - 502.
- Ghosh, M. (2006). Antifungal properties of haem peroxidase from *Acorus calamus*. *Ann. Bot.* 98, 1145 - 1153.
- Khan, S., Ayub, N., y Ahmad, I. (2007). Inhibitory effect of extracts of plant parts of sunflower hybrids on sclerotia production of *Macrophomina phaseolina*. *Pak. J. Phytopathol.*, 19, 150 - 154.
- Laurentin, H., Montilla, D., y García, V. (2004). Relación entre el rendimiento de ocho genotipos de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) y sus componentes. Comparación de metodologías. *Bioagro*, 16, 153 - 162.
- Laurentin, H., y Karlovsky, P. (2007). AFLP Fingerprinting of sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars: Identification, genetic relationship and comparison of AFLP informativeness parameters. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 54, 1437 - 1446.
- Mendoza, Y., y Laurentin, H. (2012). Efecto de extractos etanólicos de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) sobre *Macrophomina phaseolina*. Guanare, Venezuela. *Rev. Unellez Ciencia y Tecn.* 30, 51 - 60.
- Mikawlawng, K., Kaushik, S., Pushker, A., Kumar, S., Kameshwor, M., y Sharma, G. (2014). Comparative in vitro antifungal activities of *Simarouba glauca* against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Med. Plant Studies*, 2, 1 - 7.
- Montilla, D. y Cedeño, T. (1991). Fonucla: una nueva variedad de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). *Bioagro*, 3, 52 - 54
- Ohara, T., y T. Tsuge. (2004). FoSTUA, encoding a basic hélix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell*, 3, 1412 - 1422
- Pineda, J. (2002). II Curso sobre producción de ajonjolí, soya y otras leguminosas. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 78 p. Araure, Portuguesa: Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado.
- Singh, D.; Singh, P.; y Vidyasagar, G. (2014). Antimicrobial activity of ethanolic extract of *Alangium salvifolium* (L.f.) Wangerin. *Inter. J. Res. Plant Sci.*, 4, 77 - 80.
- Sridhar, N., Duggirala, S., y Puchchakayala, G. (2014). Antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Justicia neesii*. *Bangladesh J. Pharm.*, 9, 624 - 627.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. Quinta edición. Asociación Sinauer. Sunderland, Massachusetts. p. 782.
- Wyllie, T. (1989). *Charcoal rot*. (3ª. Ed.) En: *Compendium of soybean diseases*. En: J.B. Sinclair y P.A. Backman (eds.). Amer. Phytopath. Soc. St. Paul, MN. p. 30 - 33.