

# Métodos de inoculación para la detección de germoplasma de frijol resistente a la pudrición carbonosa del tallo *Macrophomina phaseolina* tassii (goid).<sup>1</sup>

INOCULATION TECHNIQUES TO IDENTIFY COWPEA GERMOPLASM RESISTANCE TO CHARCOAL ROT *Macrophomina phaseolina* (TASSI) GOID.

A. HIGUERA <sup>2</sup>

1)Proyecto de Tesis N A-40/87 financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.

2)Profesor Asociado del Departamento de Agronomía de la Universidad del Zulia.

---

## RESUMEN

Se pretende con este trabajo evaluar la eficiencia de diferentes métodos de inoculación con esclerocios de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., que permita detectar fuentes de resistencia a dicho hongo, en germoplasma de frijol. Los métodos de inoculación probados utilizando líneas de frijol de semilla negra y semilla tipo ojo negro fueron: inoculación con granos de arroz colonizados por esclerocios del hongo, inoculación con esclerocios secos e inoculación con palillos de bambú colonizados por esclerocios de *M. phaseolina*. Se sugiere que los métodos; de inoculación evaluados a nivel de umbráculo, no deberían recomendarse para la detección de germoplasma de frijol resistente a *M. phaseolina* sino se prueban a nivel de campo, ya que la expresión de la resistencia depende de las condiciones ambientales existentes en un momento determinado, las cuales son difíciles de controlar en umbráculo y en macetas con volúmenes reducidos de suelo.

Palabras claves: frijol, resistencia, *Macrophomina phaseolina*, métodos de inoculación

## ABSTRACT

Lodging of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. can be a serious problem at harvest time under certain environmental conditions such as water or heat stress. Lodging at the base of the stalk has been attributed to a stalk rotting organism, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. The green house study reported here evaluated the use of there inoculation techniques to artificially infect cowpea germoplasm with this organism such as: toothpick inoculation, dry sclerotiums and rice seeds inoculated with sclerotiums, in order to identify germoplasm resistance to charcoal rot. To identify cowpea germoplasm resistance to *Macrophomina phaseolina* is very important to evaluated inoculation techniques in the field because there are relations hips among stalk rot development, environmental stresses that are not easily simulated and controlled in a green house.

Key words: Cowpea, resistance to Charcoal rot, *Macrophomina phaseolina*, inoculation techniques.

## INTRODUCCION

El hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. produce serios daños económicos a las siembras comerciales de frijol, ubicadas en la planicie de Maracaibo del Estado Zulia, pues ocasiona una pudrición carbonosa a nivel del tallo que provoca el acame de las plantas e impide la cosecha en forma mecanizada, lo que limita la expansión del cultivo a nivel empresarial.

Como el hongo en referencia se perpetúa en el suelo atacando otros cultivos de la región, tales como, sorgo, ajonjolí, quinchoncho, frijol chino y guayaba, y no existe hasta el momento un control químico o cultural efectivo contra *M. phaseolina* (Tassi) Goid., resulta indispensable la iniciación de estudios tendientes a encontrar genotipos resistentes a dicho patógeno. La existencia de germoplasma resistente a *M. phaseolina* (Tassi) Goid. en sorgo y cultivos de otras; latitudes es alentadora, ya que permite asumir la posibilidad de lograr variedades resistente en frijol.

Por tanto, se requiere el establecimiento de estrategias de mejoramiento genético, mediante las cuales se logre encontrar una metodología eficiente que permita detectar resistencia a pudrición carbonosa del tallo, en germoplasma de frijol.

Agarwal y Sarbhoy (2) evaluaron plantas de soya para resistencia a *Macrophomina phaseolina*, las cuales fueron inoculadas mediante la técnica de Youngs (21) y también aplicando inóculo al suelo. Las observaciones se realizaron un mes después arrancando de raíz las plantas y abriendo longitudinalmente los tallos para medir la distancia recorrida por el hongo en el interior del hospedero, encontrándose 64 líneas moderadamente resistentes y 4 resistentes.

Robles (16) realizó evaluaciones en el Estado Zulia para detectar resistencia a *Macrophomina* en 12 genotipos de frijol de semilla negra, blanca y tipo ojo negro, y aplicó suspensiones de esclerocios secos y micelio de *Macrophomina*, con asperjadora de espalda en el momento de la siembra y al inicio de la floración, sometiendo las plantas una vez florecidas, a un agotamiento por sequía durante cinco días consecutivos. Se detectaron diferencias altamente significativas entre los genotipos evaluados, resultando los cultivares ON-30 (17), S. J. - 50 (4) y Floricream negro los más resistentes. El autor también detectó una correlación negativa y significativa entre índice de intensidad y rendimiento.

En la actualidad se están desarrollando procedimientos de campo e invernadero para evaluar germoplasma de caraota para resistencia a *Macrophomina phaseolina*. Al respecto, Abawi y Pastor Corrales (1) han desarrollado una técnica de inoculación a nivel de campo utilizando semillas enteras de arroz colonizadas por el hongo en referencia. También se encontró que para condiciones de invernadero la fuente más efectiva de inóculo de *M. phaseolina* son los esclerocios.

Según Abawi y Pastor- Corrales (1) en. Las pruebas de invernadero los esclerocios secos se mezclan totalmente con el suelo infectado. En prueba de campo se adicionan 4 gramos de semillas enteras de arroz colonizadas por el hongo, por surco de 2 metros de las semillas de los genotipos de caraota que se van a evaluar. Tales métodos permitieron seleccionar germoplasma resistente a *M. phaseolina*.

En melón, Reuvini y colaboradores (15) han utilizado 100 mililitros de esclerocios en suspensión (3 por 10 menos 3 ml.) cultivados en P.D.A. durante 10 días. Dicha suspensión es aplicada sobre las semillas, las cuales son sembradas en macetas conteniendo suelo estéril y cubiertas con dicho suelo. Los autores también aplicaron 0,5 ml. de esclerocios en suspensión a una concentración de 5 x 10<sup>-3</sup> ml. a nivel del pedúnculo del fruto. Ambas técnicas permitieron comprobar que *M. phaseolina* se puede encontrar tanto en los cotiledones de las semillas, como en el tegumento; tanto en el suelo, como en los frutos.

Simosa (17) realizó un trabajo de investigación con la finalidad de obtener información en cuanto a variabilidad del hongo *Macrophomina phaseolina* con 4 cepas provenientes de las zonas productoras de ajonjolí, en Venezuela y se estudiaron otros aspectos que condicionan las relaciones hospedero-patógeno, las cuales inciden sobre la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad pata negra, causada por el hongo en referencia. La concentración de inóculo de 350 esclerocios por gramo de suelo fue la que produjo mayor porcentaje de plantas muertas sin alterar el comportamiento de las variedades.

En consecuencia, se pretende con este trabajo evaluar la eficiencia de diferentes métodos de inoculación con esclerocios de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., que permitan detectar fuentes de resistencia a dicho hongo, en germoplasma de frijol.

## MATERIALES Y METODOS

## Germoplasma a evaluar

El material evaluado estuvo conformado por semillas provenientes de tres líneas de frijol. Dos de las líneas eran de semilla negra y fueron obtenidas mediante selección individual en un programa de selección de cultivares de frijol llevado a cabo por la Facultad de Agronomía, de la Universidad del Zulia.

La línea denominada P1, se caracteriza por ser de semilla negra y susceptible al hongo *Macrophomina*. La línea denominada P2 y también de semilla negra se caracteriza por ser resistente a *Macrophomina*. Finalmente, la línea P3 identificada por Avila y Murty (3) como ON-30(4) fue incluida por su hábito de crecimiento determinado, porte erecto y semilla tipo ojo negro, de alta demanda en el mercado local.

## Diseño Experimental y análisis estadístico

Para detectar las posibles diferencias entre los métodos de inoculación y entre las líneas P1, P2 y P3, en cuanto a daños causados por *M. phaseolina* y expresados como severidad de la enfermedad (SV). El diseño experimental utilizado fue el de parcelas divididas con arreglo en bloques al azar. Las líneas a evaluar se sembraron en macetas de polietileno, de 2 Kg. de capacidad provista de una mezcla de arena, materia orgánica y fertilizante fórmula completa 15-15-15. Por cada macetas se sembraron cinco semillas para dejar posteriormente cuatro plantas por macetas. Por cada línea se evaluaron 16 plantas (macetas) en cada repetición y se sembraron cuatro repeticiones. Las líneas se consideraron las parcelas principales y los métodos de inoculación las parcelas secundarias.

Para determinar la severidad de la enfermedad (SV), cada una de las plantas evaluadas fue clasificada dentro de una escala señalada en la Figura 1, en donde el grado 1 equivale a una planta con el tallo totalmente sano y el grado 9 a una planta con el tallo completamente destruido. Como los datos para severidad dentro del rango observado se distribuyen como una variable no paramétrica, para su posterior análisis se recurrió a la metodología sugerida por Fisher y Yates (9), la cual se basa en la transformación de datos escalares mediante una ponderación de los valores obtenidos dentro de la escala, reduciendo los promedios de severidad a un rango de amplitud menor que corrige los datos a una distribución normal más precisa.

Los valores ponderados para cada uno de los nueve grados de la escala para evaluar la severidad de la enfermedad se presentan en la tabla 1.

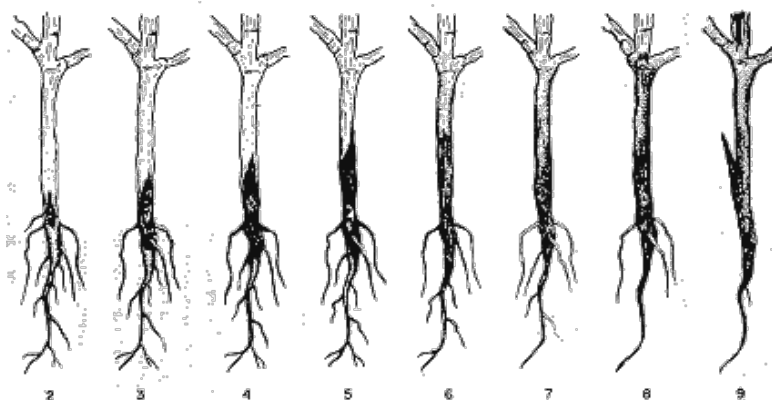


Figura 1. Escala para Evaluación de Severidad de Daño Causado por *Macrophomia phaseolina* (Tassi) Goid. en Frijol.

TABLA 1. Valores ponderados de los grados de la escala de grados de severidad de la enfermedad (SV).

Número Ordinal	Valor Promedio
	( $\mu r$ )
1	1,84
2	1,38
3	1,10
4	0,89
5	0,71
6	0,55

0	0,55
7	0,40
8	0,26
9	0,13

$$r = +/- [n! / (r-l)!(-r)! ] p^{n-r} q^{r-i} x z dx$$

Donde:

n= número de observaciones

r= observación más desviada

z= ordenada de la curva normal

p= probabilidad de obtener una planta resistente

q= probabilidad de obtener una planta susceptible.

### Métodos de inoculación

Los métodos de inoculación utilizados fueron:

1. Inoculación con granos de arroz colonizados por esclerocios del hongo
2. Inoculación con esclerocios secos
3. Inoculación con palillos de bambú colonizados por esclerocios del hongo

#### **Inoculación con granos de arroz colonizados por esclerocios del hongo.**

Se implementó la metodología sugerida por Abawi y Pastor- Corrales (1). El objetivo del método fue la producción de esclerocios en forma abundante en medio líquido (10 gramos de peptona, 15 gramos de dextrosa, 0,25 gramos de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O y 0,5 gramos de KHPO<sub>4</sub> disueltos en un litro de agua destilada). El medio antes de ser sembrado con micelio del hongo, se esteriliza en autoclave.

Luego se incubaba por 15 días aproximadamente, dando oportunidad a que se produzca una abundante colonia de hongo la cual es posteriormente licuada para ser mezclada con los granos de arroz en una proporción 1:0,5 (peso:volumen), es decir, cada kilo de granos de arroz se esteriliza en botellas cuadradas de vidrio previamente desinfectadas y esterilizadas antes de mezclarse en medio líquido. El llenado de las botellas se realiza en condiciones de asepsia total y se deja incubar por 22 días aproximadamente hasta ver esclerocios cubriendo completamente los granos de arroz con cáscara.

En el momento de hacer la inoculación se utilizaron de 2 a 3 semillas de arroz colonizadas por el hongo, por cada semilla de frijol a sembrar.

#### **Inoculación con esclerocios secos.**

Para utilizar este método (Méndez, 11) se requiere de una serie de tamices usados para filtrar nemátodos (No. 60,120,140,200,325, y 400), a objeto de lavar el medio que rodea a los esclerocios con agua destilada estéril y así obtener esclerocios separados también separado del micelio. Para facilitar la operación, el medio de PDA se prepara con 200 gramos aproximadamente de papa, 20 gramos de dextrosa y 5 gramos de agar, lo cual alcanza a llenar 50 cajas de Petri. Una vez separados los esclerocios, estos son depositados completando el volumen hasta un litro. En esta suspensión se determinó la concentración de esclerocios por mililitros para lo cual se utilizó una micropipeta de precisión marca Gilson graduada a 10 ml. Dicho volumen de suspensión fue extendido sobre una cena porta objeto realizándose el conteo de esclerocios con ayuda de una lupa estereoscópica. Esta operación se repitió 10 veces promediando los resultados se determinó el número de esclerocios por ml., obteniéndose aproximadamente diez mil esclerocios por ml.

Una vez hecho esto, se procedió a calibrar la cantidad de esclerocios de 500 por gramos de suelo, dividiendo el total de esclerocios entre la cantidad requerida por gramo de suelo, es decir, que se necesitaría pesar 20 gramos de suelo para obtener la concentración deseada. La técnica de inoculación requiere que las plantas sean colocadas previamente en cámara húmeda durante 16 horas con el propósito de crear condiciones favorables para la penetración del hongo.

Al cabo de los siete días posteriores a la inoculación se observan síntomas y signos de la enfermedad, según Méndez (11)

### Inoculación con palillos de bambú colonizados por esclerocios del hongo.

Este método consiste tal como indica Quintero (13), en utilizar palillos de bambú de 2 cm. de longitud cortado longitudinalmente en dos, a objeto de disminuir el grosor de los mismos, los cuales tienen la particularidad de ser porosos internamente. Dichos palillos se sumergen en agua y se hierven tres veces en forma consecutiva, a fin de eliminar la resina que los cubre y de esta manera lograr que el hongo pueda invadir el palillo y posteriormente el tallo de la planta al hacer la inoculación. Los palillos ya cortados y sin resina son colocados en número de veinte en el fondo de un frasco de compotas, al cual se añaden 2 ml. de PDA., de tal manera que apenas cubra los palillos. A cada frasco preparado de esta manera se le coloca su respectiva tapa con un orificio mínimo en donde se introduce algodón y de esa manera se llevan los frascos al autoclave. Una vez esterilizados los frascos, el inóculo se siembra en pedazos de aproximadamente medio centímetro.

Transcurridos 15 días, el hongo ya ha invadido completamente la superficie de los palillos encontrándose éstos en óptimas condiciones para ser utilizados en la punción del tallo de las plantas de frijol a evaluar y de esta manera contribuir al establecimiento de la interacción hospedero- patógeno. Las plantas se inoculan una vez que alcanzan 50% de floración se evalúan al momento de la cosecha haciendo un corte longitudinal del tallo, con el objeto de observar el avance de la enfermedad a partir del punto de inoculación. Dicho avance es medido en centímetros con ayuda de una regla métrica es expresada como severidad de la enfermedad. En este caso la severidad también se cuantifica utilizando la escala sugerida por Robles (16) y la transformación señalada por Fisher y Yates (9) antes referida.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 2 se presenta el análisis de varianza para severidad del daño causado por *Macrophomina phaseolina* en frijol. Tal como se observa, existen diferencias significativas entre líneas, al igual que entre los métodos de inoculación y así mismo para la interacción líneas por métodos de inoculación. El coeficiente de variación obtenido fue del 15,14 %..

**TABLA 2. Análisis de varianza para severidad del daño (SV) ocasionado por *Macrophomina phaseolina* en frijol.**

Fuentes de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrado	cuadrados medios	F
Repeticiones	3	0,215	0,071	1,65
Líneas	2	1,271	0,635	14,63**
Repeticiones x líneas	6	0,098	0,016	-
Métodos de inoculación	3	3,261	1,087	25,03**
Líneas x met. de inoc.	6	2,076	0,346	7,96**
Error	27	1,173	0,043	-

Al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey, presentada en la Tabla 3, se deduce que la línea P3 se comportó de manera similar a la línea P1, la cual es susceptible en cuanto a la forma de reaccionar a la enfermedad.

**TABLA 3. Comparación de medias por Tukey para severidad de *M. phaseolina* en base a líneas y métodos de inoculación.**

Líneas	X	-	-
P3	2,453	a	M.D.S. 5%=0,183
P1	2,379	a	
P2	1,359	b	
Métodos de inoculación	X	-	
Palillos de bambú	3,159	a	M.D.S. 5% = 0,233
Granos de arroz	2,062	b	
Esclerocios secos	2,034	b	
Testigo	1,000	c	

Dentro de los métodos probados, se aprecia en la Tabla 3, que el método de palillos de bambú es el más eficiente en la detección de posibles diferencias entre el germoplasma de frijol inoculado, siendo un método económico y fácil de implementar. Los métodos de inoculación de esclerocios secos y granos de arroz fueron similares en la expresión de la enfermedad.

En vista de los resultados se procedió a realizar otro ensayo en parcelas divididas, evaluando la s mismas líneas señaladas en la Tabla 4 utilizando el método de palillos de bambú, en donde las épocas de inoculación, constituyeron las parcelas secundarias. Los datos de severidad en este caso fueron tomados midiendo el recorrido longitudinal en cm., del daño ocasionado por el hongo en el tallo tomando como punto inicial de medición, el punto de inoculación donde se introdujo el palillo.

**TABLA 4. Análisis de varianza para severidad del daño (SV) causado por *Macrophomina phaseolina* en tallos de frijol expresada en cm. de avance de la enfermedad. (\*)**

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F
Repeticiones	5	0,561	0,112	5,90
Líneas	2	0,239	0,119	6,31**
Repeticiones x líneas	10	0,190	0,019	-
Epocas de inoculación	1	1,374	1,374	14,95**
Líneas x epoc. inoc.	2	1,200	6,040	0,01
Error	15	1,379	0,919	-

Total 25

(\*)= Inoculación con palillos de bambú

De acuerdo al análisis de varianza presentado en la Tabla 4 para severidad del daño causado por *M. phaseolina*, se observan la existencia de diferencias significativas entre las líneas y así mismo entre las épocas de inoculación. En consecuencia, se procedió a realizar una prueba de medias por Tukey señalada en la Tabla 5, mediante la cual se deduce que las líneas probadas independientemente de su condición de resistencia o susceptibilidad presentaron en promedio mayor daño cuando fueron inoculadas a los 15 días, a diferencia de cuando se inocularon a los treinta días de sembradas. Así mismo, en las dos épocas de inoculación el material susceptible tuvo tendencia a presentar mayor daño que el material resistente, comportándose la línea P3 como intermedia.

**TABLA 5. Comparación de medias por Tukey para época de inoculación en base a severidad del daño causado por *Macrophomina phaseolina* (SV) en cm. de avance**

Línea	Epoca	SV
P1	15 Días	2,72 a
P2	15 Días	2,39 b
P3	15 Días	2,06 c
P2	30 Días	1,43 d
P1	30 Días	1,28 e
P3	30 Días	0,95 f

Una vez procesados y analizados los resultados obtenidos, se comprueba que el hongo *Macrophomina* por su naturaleza requiere de condiciones especiales señaladas en la literatura, de temperatura del suelo (Dhingra y Sinclair, Tompkins y Gardner, 19; Uppal y colaboradores, 20), humedad del suelo (Smith, 18; Reynolds y colaboradores, 14; Cook, 5; Cook y colaboradores, 6; Hodges, 10; Young, 22 Edmunds, 8) y tipo de suelo (Cook y colaboradores, 6) que son difíciles de conseguir en macetas sembradas en el umbráculo, a fin de predisponer a las plantas a la infección por parte de *M. phaseolina* y asegurar un desarrollo eficiente del inoculo, con el propósito de establecer la interacción hospedero- patógeno en todas las plantas objeto de la evaluación. En cambio en el campo, dichos requerimientos son más fáciles de garantizar escogiendo suelos de reconocida conductividad para el establecimiento de *Macrophomina*, es decir que poseen una microflora incapaz de realizar control biológico de la población del hongo bajo estudio.

Por tanto los métodos de inoculación evaluados a nivel de umbráculo no deberían recomendarse para la evaluación de

Por tanto, los métodos de inoculación utilizados a nivel de umbráculo, no ofrecen recomendaciones para la evaluación de germoplasma de frijol con fines de detectar fuentes de resistencia, ya que de acuerdo a la información obtenida a nivel de umbráculo y la literatura consultada, la expresión de la resistencia depende de las condiciones ambientales existentes en un momento determinado, las cuales son difíciles de controlar en un umbráculo y en macetas con volúmenes reducidos de suelo.

En consecuencia, se sugiere probar los métodos de inoculación utilizados a nivel de campo, sembrando el germoplasma a evaluar directamente en el suelo y no en macetas, ya que según Oropeza (12) se debe tomar en cuenta la relación entre ciclo reproductivo del cultivo de frijol, madurez fisiológica, morfología del tallo, sequía y desarrollo de la enfermedad en el tallo.

Por tanto, resulta indispensable realizar las evaluaciones de germoplasma de frijol para resistencia a pudrición carbonosa del tallo, a nivel del campo y no de umbráculo, utilizando el método de inoculación con granos de arroz sugerido por Abawi y Pastor-Corrales (1) o la técnica de los palillos de bambú (Youngs, 21) de probado éxito en evaluaciones de campo para evaluar resistencia a *Macrophomina* en genotipos de sorgo (Quintero, 13). Así mismo resulta adecuado establecer las evaluaciones de germoplasma del frijol, en localidades donde exista un nivel adecuado de inoculo en forma natural y en consecuencia el suelo no posea microflora antagonista, ya que la resistencia para hongos del suelo por lo general es de tipo parcial, la cual se expresa y evalúa más efectivamente en condiciones de campo (Borges, 4). También se requiere en forma paralela de un estricto control de la humedad del suelo si el ensayo de evaluación de resistencia es bajo riego, a fin de asegurar una predisposición de las plantas al establecimiento de la interacción hospeder- patógeno.

## BIBLIOGRAFIA

1. ABAWI, G. y M. PASTOR-CORRALES. 1986. Enfermedades radicales frijol. Avances en su investigación. Boletín Informativo del Programa de Frijol del CIAT (Col.) p. 31,35-37.
2. AGARWAL, D. K. y A.K. SARBHOY. 1976. Evaluation of soybean germoplasm for resistance against *Macrophomina phaseolina*. Indian Phytopathology 29: 190-191.
3. AVILA, R. y B.R. MURTY. 1982. Rectificación mutacional de cultivares locales de frijol y frijol chino para tipo de planta y productividad. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. (Ven). Mimeografiado.
4. BORGES, O. 1987. Perspectivas del mejoramiento para resistencia a enfermedades. En Avances en Genética. Sociedad Venezolana de Genética. IBSN 980- 201- 010-3. E.G.N. Comunicaciones S.R.L. (Ven) p. 83-86.
5. COOK A.A. 1955. Charcoal rot of castor bean in the United States. Plant. Dis. Repr. 57:833-875.
6. COOK G.E., BOOSALIS, M. G., DUNKIE, L. D. y G.N. ODVODY. 1973. Survival of *Macrophomina phaseolina* in corn and sorghum, stalk residue. Plant Dis. Repr. 57:833-875.
7. DHINGRA, O y J.B. SINCLAIR. 1974. Effect of soil moisture and carbon: nitrogen ratio on survival of *Macrophomina phaseolina* in soybean stems in soil. Plant Dis. Repr. 58: 1034-1037.
8. EDMUNDS, L.K. 1964. Combined relation of plant maturity, temperature and soil moisture to charcoal rot stalk rot development in grain sorghum. Phytopathology 54: 514-517.
9. FISHER, R. A. y F. YATES. 1963, Statistical tables for biological agricultural and medical research. Harner Publishing Co. Inc. (N.Y.) p. 31- 32- 94- 95.
10. HODGES, C. S. 1962. Black root rot of pine seedlings. Phytopathology 59: 795-797.
11. MENDEZ, A, 1984. Eficacia de algunos fungicidas y herbicidas en el control de *Macrophomina phaseolina*. Instituto Tecnológico Universitario del Edo. Portuguesa (Ven) 124 p.
12. OROPEZA, F. 1979. Maduración y deterioro en el campo de la semilla de frijol (*Vigna unguiculata* L. Walp). Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia V. 5(3): 537- 558.
13. QUINTERO, E. 1982. Evaluación de 36 cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) al ataque de *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. trabajo de Ascenso. (Ven). p. 10-18.
14. REYNOLDS, R E., SMITH, W R. y K. F. 1972. Influence of constant and fluctuating temperatures on the growth of *Macrophomina phaseolina*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 58:512-515.
15. REUVINI, R., NACHIMIAS, A y J. KRIKUM. 1983. The role of seed borne inoculum on the development of *Macrophomina phaseolina* on melon. Plant. Dis 67:280-281.
16. ROBLES, L. 1984. Evaluación de genotipos de frijol (*Vigna unguiculata* L. Walp) para resistencia a *Macrophomina phaseolina* en frijol. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Tesis de Grado (Ven) 107 p.
17. SIMOSA, N. 1987. Comportamiento de cultivares de ajonjolí (*Sesamun indicum* L.) en presencia de cuatro cepas de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Postgrado en Fitopatología. Barquisimeto. (Ven) 60 p.
18. SMITH R. S. 1964. Effect of diurnal temperature fluctuations on linear growth rate of *Macrophomina phaseolina* in culture

18. SMITH, K.S. 1904. Effect of diurnal temperature fluctuations, on initial growth rate of *Macrophomina phaseolina* in culture. *Phytopathology* 54:849: 852.
19. TOMPKINS, C. M. y M. W. GARDNER. 1935. Reaction of temperature to infection of bean and cowpea seedlings by *Rhizoctonia bataticola* Hilgardia. 9:219-230.
20. UPPAL, B. N., KOLHATKAR, K. G. y M. K, 1936. Blight and hollow- stem of sorghum. *Indian J. Agric. Sci.* 6:1323-1334.
21. YOUNGS, H. C. 1943. The toothpick method of inoculating corn for ear and stalk rot. *Phytopathology*. 33:16.
22. YOUNG. P. A. 1944. Epidemic of charcoal rot of corn and other crops in east Texas. *Plant Dis. Reprt*, 28:898-899