

ACTIVIDAD FUNGICIDA DE LOS PROPÓLEOS SOBRE *Fusarium oxysporum* Y *Sclerotium rolfsii*.

Teresa de Jesús Aceves Esquivias¹; Gil Virgen Calleros¹; Pedro Posos Ponce¹; María de Lourdes Contreras Pacheco¹. Departamento de Producción Agrícola, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jal., 450101, México. Correo-e: taceves@cucba.udg.mx

Introducción

En México, los fungicidas sintéticos son ampliamente utilizados para el control de hongos fitopatógenos, lo que ha originado diversos problemas como, toxicidad a los usuarios y daños al medio (Wilson y Wisniewski 1989). Una alternativa prometedora ante esta problemática, es el uso de productos naturales derivados de las plantas (Montes y Figueroa 1995); como lo son los propóleos. El propóleo es una sustancia resinosa, que elaboran las abejas a partir de exudados de las yemas de las plantas que circundan el apiario. Los metabolitos secundarios que constituyen la resina apícola, tienen una estrecha relación con sus propiedades biológicas.

La mayor proporción de constituyentes de los propóleos son del tipo fenólico; entre los que se encuentran los flavonoides como principales representantes (Bankova et al. 1982). Existen estudios sobre el comportamiento de diversos flavonoides, extraídos de madera de *Salix caprea*, frente a una amplia variedad de hongos destructores de madera (Malterud et al. 1985). Estas propiedades fungicidas, asociadas también a dihidroflavonoles y flavonoles, contribuyen a la durabilidad y protección de la madera. Fuerte actividad fungicida presentan flavonoles como la quercitina y sus glicósidos; rutina, isoquercitina y el kaempferol, flavononas como la apigenina y derivados (Singh et al. 1988). No obstante, la máxima capacidad fungicida se asocia siempre con el grupo de isoflavonoides; se ha considerado la posibilidad de utilizar estos compuestos como sustitutos de fungicidas convencionales. Por ello, se han analizado las relaciones estructura/actividad, así como los mecanismos de acción de los isoflavononas (Weidenbörner et al. 1990).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad fungicida *in vitro* de los propóleos de distinto origen sobre *fusarium oxysporum* y *sclerotium rolfsii*.

Materiales y Métodos

La obtención de las muestras de propóleos se realizó en 10 apiarios, ubicados en la Región Sur y Sureste del Estado de Jalisco. Se seleccionaron aleatoriamente 5 colmenas de 10 apiarios localizados en diferentes sitios (Cuadro 1) y se identificaron con un número progresivo. La recolección de propóleos se efectuó mediante raspado de las estructuras de la colmena y con mallas colocadas en el techo de la misma. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico rotuladas con los datos correspondientes y se almacenaron a una temperatura de menos 10°C para su posterior análisis.

Cuadro 1. Listado de las localidades de Jalisco, donde se obtuvieron las muestras de propóleos.

No.	MUNICIPIO	APIARIO
1	Sierra El Alo, Tecalitlán	El Ciego
2	Aserradero, Tuxpan	La Pila
3	Aserradero, Tuxpan	Matacuato
4	Concepción de Buenos Aires	El Gatillo
5	Zapotiltic, Zapotiltic	Los Aguacates
6	Aserradero, Tuxpan	La Jabalina
7	Jilotlán de los Dolores	Escalame
8	Zapotiltic, Zapotiltic	La Presita
9	Aserradero, Tuxpan	El Veladero
10	Zapotiltic, Zapotiltic	Barranca de la Cal

Los extractos de propóleos en etanol se filtraron asépticamente con papel filtro estéril y se evaporó el solvente a alto vacío a 40 °C.

El aislamiento de *Fusarium oxysporum* y *Sclerotium rolfsii*, se realizó tomando muestras de tejido afectado por los hongos en plantas enfermas; inoculadas en medio de cultivo específico. Los bioensayos se llevaron a cabo mediante la técnica de alimento envenenado (Grover y Moore, 1962), en medio (PDA) ajustado a un pH de 5.5.

El extracto para las pruebas antifúngicas se preparó usando como disolvente al dimetil sulfóxido (DMSO) mezclado con propóleos secos, a concentraciones de: 0mg/ml, 5mg/ml y 100mg/ml. La actividad antifúngica de los extractos de propóleos para cada zona, se evaluó con base a la capacidad de inhibición de desarrollo micelial en *Fusarium oxysporum* e inhibición de la formación de esclerocios en *Sclerotium rolfsii*.

El crecimiento radial del micelio de *Fusarium oxysporum* y *Sclerotium rolfsii*, se evaluó hasta el momento en el que el testigo alcanzó el diámetro total de la caja de petri. La eficacia del tratamiento (R_f) se determinó mediante la fórmula de Abbott (Cañizares y Forbes 1995).

$$R_f = \frac{Ca - Ta}{Ca} * 100$$

Donde:

Ca = Infección en el testigo (individuos con daño que cambiaron de categoría)

Ta = Infección en el tratamiento (individuos con daño que cambiaron de categoría)

Los datos fueron transformados mediante la función: $\arcsen \sqrt{(X_i/100)}$ en donde:

X_i = % de germinación; procediéndose a efectuar el análisis de la varianza y la comparación de medias utilizando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En el bioensayo se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con arreglo factorial, considerando como factores principales: 2 hongos (*Fusarium oxysporum* y *Sclerotium rolfsii*); 10 zonas geográficas de donde procedían los extractos de propóleos; 2 épocas del año (Invierno y Primavera), y 3 concentraciones de extracto (0mg/ml, 5mg/ml y 100mg/ml). Se efectuaron 4 mediciones del diámetro de la colonia de cada hongo y el número de esclerocios formados por *Sclerotium rolfsii*, las mediciones se hicieron hasta que el tratamiento testigo (0% de concentración del extracto) llenó por completo las cajas de petri. Con los valores obtenidos se realizó el análisis de varianza de cada tratamiento y las pruebas de comparación de medias por el método de Tukey ($P \leq 0.05$).

El análisis estadístico de los bioensayos se efectuó con el software Agriculture Research Manager, Versión 6.1.5 2000, Gylling Data Management, Inc. La similitud entre los sitios de estudio, se determinó por medio del Coeficiente de Asociación Dice (1955), en NTSYSpc versión 2.1. EXETER SOFTWARE. (Rohlf 2002). El análisis cluster se basó en las señales del cromatograma para cada zona de estudio y su agrupamiento como datos cualitativos (presencia 1 y ausencia 0).

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos sobre la eficacia de los propóleos colectados en invierno (época 1) y primavera (época 2) en 10 localidades de Jalisco, en el número de esclerocios de *Sclerotium rolfsii*, se resume en los Cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Eficacia de extractos de propóleos procedentes de diez zonas, sobre el número de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* muestreo de invierno (época 1)

TRAT	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E110
0 mg/ml	2.670 lm (0%)	196.0 gh (0%)	163.0 J (0%)	231.0 bcd (0%)	189 hi (0%)	251 a (0%)	201 fgh (0%)	188 hi (0%)	219 de (0%)	233 bcd (0%)
5 mg/ml	0.0 m (100%)	4.750 lm (98%)	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	73 k (64%)	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	2.0 lm (99%)	15 lm (93%)	0.0 m (100%)
100 mg/ml	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	7.25 lm (96%)	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	3.25 lm (98%)	0.0 m (100%)

Los promedios con la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$ Tukey's) 16.9484

Desviación estandar = 6.7658 CV = 9.74

E1= época 1(invierno, seguido por el numero de zona= 1...10.

Cuadro 3. Eficacia de extractos de propóleos procedentes de diez zonas, sobre el número de esclerocios en *Sclerotium rolfsii* muestreo de primavera (época 2)

TRAT	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E210
0 mg/ml	211 efg (0%)	179 ij (0%)	239 abc (0%)	244 ab (0%)	163 j (0%)	189 hi (0%)	251 a (0%)	223 cde (0%)	217 def (0%)	210 efg (0%)
5 mg/ml	2.75 lm (99%)	0.0 m (100%)	17.75 l (91%)	0.0 m (100%)	15 lm (93%)	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	3.75 lm (98%)	0.0 m (100%)
100 mg/ml	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	11.75 lm (94%)	1.25 lm (99%)	0.0 m (100%)	0.0 m (100%)	5.98 f- m (27%)	0.0 m (100%)
Los promedios con la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$ Tukey's) = 16.9484 Desviación estandar = 6.7658 CV = 9.74										

E2= época dos (primavera) seguido por el numero de zona= 1...10.

La actividad fungicida de los propóleos en cultivos con *Sclerotium rolfsii* fue significativa ($P \leq 0.05$) respecto al testigo, con dosis de 5 mg/ml y 100 mg/ml.

Las muestras de propóleos de invierno en las zonas 1, 3, 4, 6, 7 y 10, tuvieron una eficacia del 100% a una concentración de 5 mg/ml. Con una dosis de 100 mg/ml, se observó también una eficacia del 100% en propóleos procedentes de las zonas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 10. Una menor respuesta se obtuvo con el extracto de propóleos de la zona 5 con el 64% de eficacia.

Los propóleos de primavera mostraron una respuesta similar a los de la época 1 con ambos tratamientos, obteniéndose valores para la mayoría de los ensayos del 100% de eficacia, a excepción de la zona 9 que mostró una eficacia del 27% con una concentración del 100 mg/ml, este resultado difiere significativamente ($P \leq 0.05$) del los valores obtenidos para ambas épocas y 10 localidades.

Georgiou et al. (2003), demostraron que los esclerocios están conformados por una corteza o cubierta, la cual contiene el 13.9 % de melanina del total de su composición química, asociada con proteínas, azúcares reductores, aminoácidos, además de lípidos, cenizas, y secreciones llamadas exudados escleroidales. Estos exudados cubren la superficie de los esclerocios, y su producción está ligada al exceso de nutrientes, agua y otros materiales como: cationes, proteínas, carbohidratos, aminoácidos, enzimas, ácido oxálico etc., que transforman el desarrollo de esclerocios, incrementando la actividad metabólica que puede contribuir en la formación de exudados (Punja 1985).

Los resultados obtenidos en esta investigación con relación a la escasez de esclerocios y su deformación, pueden explicarse por una reducción de los exudados escleroidales, al aplicar al medio de cultivo extractos de propóleos, lo que modificó el desarrollo de los esclerocios; esto concuerda con lo reportado por Singh et al. (2002), que observaron una disminución significativa en el tamaño y peso de esclerocios, al reducir los exudados escleroidales debido a la síntesis de compuestos fenólicos provocada por la aplicación de ácido oxálico y el filtrado de un cultivo de *S. rolfsii* obtenido de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum*). Los datos obtenidos en los ensayos con *Sclerotium rolfsii*, demuestran un control sobre el desarrollo de éste

fitopatígeno, debido a la inhibición notoria en la formación de esclerocios con respecto al grupo testigo. Además, se observó, que en los casos donde se presentaron pocos esclerocios, éstos se caracterizaron por una deformación de su estructura. Punja (1985), reportó que el ácido oxálico es un componente de los exudados escleroidales, y afirmaron que esta sustancia es elemental en la patogenicidad del hongo, sin embargo, otros investigadores demostraron que el ácido oxálico provocó resistencia en las plantas contra los fitopatógenos (Toal y Jones 1999) (Nabila 1999); (Singh et al. 2002), ya que indujo la síntesis de compuestos fenólicos.

Las anteriores afirmaciones, nos permiten dilucidar el posible mecanismo que provocó la inhibición de esclerocios y su relación con formación del micelio de *S. rolfsii*. En los bioensayos que sirvieron como testigos, se observó el ciclo normal de *Sclerotium rolfsii*, que comenzó con la germinación de los esclerocios del inoculo y posteriormente se desarrolló el cuerpo vegetativo característico del hongo. Con el desarrollo se disminuyeron las reservas alimenticias del medio, lo que provocó una situación de estrés oxidativa y la consecuente formación de esclerocios, a partir de las hifas terminales del micelio. Se conoce que durante el estrés oxidativo se forman radicales libres los cuales afectan la permeabilidad de las membranas celulares, lo que trae como consecuencia la peroxidación de lípidos, lo que provoca una modificación de la funcionalidad de las mismas y una alteración del metabolismo de fitopatígeno (Fito 2003). La peroxidación de lípidos y la producción de melanina se incrementa con la subsistencia del cultivo y la maduración de los esclerocios (Abo-Ellil 1999), éste fenómeno nos permitió inferir que éstos procesos actúan paralelamente durante la biogénesis escleroidal y su maduración; lo cual también se relaciona con la teoría del estrés oxidativo que condicionó el desarrollo y crecimiento del hongo.

Otro resultado que es importante comentar, se relaciona con la ornamentación y consistencia del soma vegetativo o micelio de *Sclerotium rolfsii*, que se exhibió en esta investigación. Los cultivos de *S. rolfsii* con aplicación de extractos de propóleos con dosis de 5mg/ml y 100mg/ml de las 10 localidades en estudio, mostraron diferencias significativas con relación a la estructura del micelio, en comparación con el grupo control. En la mayoría de los ensayos con dosis de 5 mg/ml, el micelio ocupó el volumen total de la caja de petri, y en algunos casos se desbordó el micelio por un excesivo crecimiento de esta estructura.

A una concentración de 100mg/ml de extractos de propóleos, se observó un micelio abundante, con una estructura algodonosa compacta de consistencia viscosa, con espacios entre los agregados del micelio que mostró una forma distinta a la que se presentó en el cultivo testigo y con la dosis de 5mg/ml.

Los resultados obtenidos en los bioensayos de *Sclerotium rolfsii* donde se aplicaron extractos de propóleos, sugieren que el estrés oxidativo adoptado como mecanismo natural de sobrevivencia y propagación del fitopatígeno, se reguló por la presencia de sustancias antioxidantes contenidas en los extractos de propóleos, lo que modificó la relación de compuestos reducidos/oxidados lo que provocó la diferenciación de estructuras de reproducción.

Por otra parte, los resultados obtenidos de la eficacia de los propóleos del muestreo de invierno, sobre la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, se observa en el Cuadro 4 donde se muestra una diferencia significativa de los tratamientos con respecto al grupo control.

Cuadro 4. Eficacia de extractos de propóleos procedentes de diez zonas, sobre el crecimiento radial del micelio en *Fusarium oxysporum* muestreo de invierno (época 1)

TRAT	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E110
0 mg/ml	8.50 a (0%)	8.10 abc (0%)	8.30 ab (0%)	8.0 a-d (0%)	8.0 a-d (0%)	8.30 ab (0%)	8.50 a (0%)	8.0 a-d (0%)	8.5 a (0%)	8.10 abc (0%)
5 mg/ml	4.82 k-r (41%)	7.07 a-g (14%)	2.27 t (72%)	7.65 a-e (7%)	4.65 l-r (43%)	5.05 j-q (39%)	3.92 p-s (52%)	3.30 rst (60%)	4.97 j-q (40%)	6.40 d-k (22%)
100 mg/ml	4.63 l-r (44%)	6.90 a-i (16%)	2.08 t (75%)	7.05 a-g (14%)	4.07 o-s (50%)	5.40 h-p (34%)	2.80 st (66%)	3.90 p-s (53%)	5.65 g-o (31%)	5.57 g-o (32%)
Los promedios con la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$ Tukey's) 1.622 Desviación standard = 0.647 CV = 10.48										

E1= época 1(invierno) seguido por el numero de zona= 1...10.

En general, se observó actividad fungicida de los propóleos obtenidos en invierno (época 1) y primavera (época 2) en las 10 localidades de Jalisco con una concentraciones de 5 mg/ml y 100 mg/ml, sobre cultivos in vitro de *F. oxysproum*. Los bioensayos con *Fusarium oxysporum* del grupo control mostraron un crecimiento y desarrollo típico para este fitopatógeno, en el cultivo se observó un agregado de micelio blanquecino de textura algodonosa cubriendo la superficie total de la caja de petri. El extracto de propóleos de la época de invierno, proveniente de la zona 3, mostró la mayor actividad fungicida con un inhibición del 72% y 75%, con 5mg/ml y 100mg/ml respectivamente y el extracto de la zona 4, sólo mostró una inhibición del 7% con 5mg/ml y 14% con 100mg/ml.

Las muestras de propóleos colectadas en primavera (época 2); también mostraron en la mayoría de los casos, eficacia con respecto a la inhibición del crecimiento del micelio de *Fusarium oxyxporum* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Eficacia de extractos de propóleos procedentes de diez zonas, sobre el crecimiento radial del micelio en *Fusarium oxysporum* muestreo de primavera (época 2)

TRAT	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E210
0 mg/ml	8.50 a (0%)	8.10 abc (0%)	8.30 ab (0%)	8.0 a-d (0%)	8.0 a-d (0%)	8.30 ab (0%)	8.50 a (0%)	8.0 a-d (0%)	8.5 a (0%)	8.10 abc (0%)
5 mg/ml	5.60 g-o (32%)	6.88 b-i (16%)	3.45 q-t (58%)	7.52 a-f (9%)	6.03 f-l (27%)	5.18 j-p (37%)	5.05 j-q (39%)	3.33 rst (60%)	5.55 g-o (33%)	6.43 d-k (22%)
100 mg/ml	4.88 k-r (41%)	6.55 c-j (20%)	2.93 st (64%)	6.98 a-h (15%)	5.30 i-p (36%)	6.18 e-i (25%)	4.38 m-s (47%)	4.10 n-s (50%)	5.98 f-m (27%)	5.70 g-n (31%)

TRAT	E21	E22	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E210
Los promedios con la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$ Tukey's) 1.622										
Desviación standard = 0.647 CV = 10.48										

E2= época 2 (primavera) seguido por el numero de zona= 1...10.

Los resultados obtenidos en los cultivos de *F. oxysporum*, evidenciaron que al igual que el muestreo de invierno; los extractos de propóleos de primavera de la zona 3, tuvieron mayor actividad fungicida con una inhibición del 58 y 64% en el crecimiento del micelio, a una concentración de 5mg/ml y 100mg/ml respectivamente, y con menor efectividad los extractos obtenidos en la zona 4, con una inhibición del 9% y 15% con el mismos tratamiento aplicados en la zona 3.

Mediante observaciones microscópicas, se reveló que algunas de las hifas que conforman el micelio de *F. oxysporum*, modificaron las paredes trasnsversales o septos, y como consecuencia el rompimiento de la cadena de microconidias, lo que ocasionó una alteración en el sistema de crecimiento y desarrollo del fitopatógeno.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por otros investigadores (Rao et al. 1992), (Guzmán et al. 2003), (Muller-Riebau et al. 1995), que demostraron la actividad fungicida de los metabolitos secundarios de las plantas, en concentraciones similares a las utilizadas en los bioensayos de ésta investigación contra hongos fitopatogenos, entre ellos *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum*.

En esta investigación sobre *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum*, se infirió que el control de fitopatógenos con extractos de propóleos, representa la posibilidad de elaborar un producto para uso agrícola, tomando como base la naturaleza química de la resina apícola, sin los riesgos que ocasionan los fungicidas tradicionales.

Conclusiones

- 1.- Los propóleos presentaron actividad fungicida contra *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum*.
- 2.- Los propóleos representan una alternativa promisoría para el control de hongos fitopatógenos, la síntesis de los constituyentes de la resina apícola podrían ser el activo de una nueva generación de productos naturales con base a los principios de sustentabilidad.

Referencias

- Abo-Ellil, A., H. (1999).** Oxidative Stress in Relation to lipid Peroxidation, Scleroidal Development and Melanin Production by *Sclerotium rolfsii*. Journal of Phytopathology 147 (10), 561-566.
- Bankova, V. S.; Popov, S. S.; Marekov, N. L. (1982).** High performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. Journal of Chromatography 242 (1), 135-143.

- Cañizares C.A., Forbes G.A., (1995).** Foliage resistance to *Phytophthora infestans* Mont de Bary in the Ecuatorian national collection of *Solanum phureja* ssp. *Phureja* Juz. & Buk. Potato Research 38: 3-10. CIP, 2001. Laboratory manual for *P. infestans* work at CIP - Quito. International Potato Center. Lima, Perú. pp: 37.
- Fito, C, M. (2003).** Efectos antioxidantes del aceite de oliva y sus compuestos fenólicos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 160 pp
- Georgiou, C. D.; Zervoudakis, G.; Petropoulou, P. K. (2003).** Ascorbic acid might play a role in the sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfsii*. Mycologia 95 (2) pp. 308-316.
- Grover, R. K.; Moore, J.D. (1962).** Toxicometric studies of fungicides against the brown rot organism *Sclerotinia fructivola* and *Sclerotinia laxa*. Phytopathology 52: 876-880.
- Guzmán, G. A., Maya N. R., Maya N. J. (2003).** Control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* con aceites esenciales. Memorias: XXX Congreso Nacional y V Internacional de la sociedad Mexicana de Fitopatología. South Padre Island, Texas, U:S:A. pp. 133.
- Malterud, K. E.; Bremnes, T. C.; Faegri, A.; Moe, T.; Sandanger, E. (1985).** Flavonoids from the wood of *Salix caprea* as inhibitors of wood-destroying fungi. Journal of Natural Products 48 (4): 559-563.
- Montes, B. R. y Figueroa, B. R. (1995).** Biocontrol de hongos en granos almacenados. In: Plantas: Biotecnología, Agronomía, Nutrición. Bermúdez T., K. Y A. Jiménez P. (Eds.). COFAA-IPN. México. pp: 26-30.
- Müller-Riebau, M. F.; Berger, B.; Yegen, O. (1995).** Chemical composition and fungitoxic properties of phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43: 2262-2266.
- Nabila, A. A. (1999).** Effect of chemical and heat treatments of seeds on squash infection by cucumber mosaic virus (CMV). Assiut Journal Agricultural Science 30: 193-206.
- Punja, Z. K. (1985).** The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual Reviews Phytopathology 23: 97-127.
- Rao, G.; Singh, M.; Singh, H. (1992).** Fungitoxic evaluation of essential oils extracted from higher plants against some sugarcane pathogens *in vitro*. Tropical Science 32: 377-382.
- Rohlf, J. F. (2002).** Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System NTSYSpc Versión 2.1. Department of Ecology and Evolution. State University of New York.
- Singh, U. P.; Pandey, V. B.; Singh, K. N.; Singh, R. D. (1988).** Antifungal activity of some new flavones y flavone glycosides of *Echinops echinatus*. Canadian Journal of Botany 66: 1901-1908.
- Singh, U. P.; Sarma, B.K.; Singh, D.P.; and Amar Bahadur (2002).** Studies on exudate-depleted sclerotial development in *Sclerotium rolfsii* and the effect of oxalic acid, sclerotial exudate, and culture filtrate on phenolic acid induction in Chickpea (*Cicer arietinum*). Canadian Journal of Microbiology 48 (5): 443-448.

- Toal, E. S and Jones, P. W. (1999).** Induction of systemic resistance to *Sclerotium sclerotiorum* by oxalic acid in oilseed rape. *Plant Pathology* 48: 759-767.
- Weidenbörner, M.; Hindorf, H.; Chandra, H.; Tsotsonos, P.; Egge, H. (1990).** Antifungal activity of isoflavonoids in different reduced stages on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytochemistry* 29 (3): 801-807.
- Wilson, C. L.; Wisniewski, M. E. (1989).** Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Reviews Phytopath*

