

Crecimiento y Esporulación de *Moniliophthora roreri* en Diversas Fuentes de Nitrógeno y Carbono¹

F. Herrera*, J.J. Galindo**, C. Ramírez**

ABSTRACT

The effect of different sources of N and C on vegetative growth and sporulation, *in vitro*, of *Moniliophthora roreri*, causal agent of moniliasis disease of cocoa was investigated. Nitrogen sources studied were asparagine, aspartic acid, proline, phenylalanine, urea, sodium nitrate and ammonium chloride at concentrations of 15, 75 and 150 mg N L⁻¹; C sources were maltose, saccharose, lactose, glucose, galactose, xylose and arabinose at 0.2, 2 and 4 g C L⁻¹. The fungus produced the maximum colony diameter and the highest sporulation area with urea at 75 and 150 mg N L⁻¹, whereas the maximum spore density per cm² and per colony was observed with asparagine at 150 and 75 mg N L⁻¹ respectively. In regard to N, it was found that the colonies of the fungus *M. roreri* attained maximum vegetative growth and the greatest sporulation zone with urea at 75 mg and 150 mg of N L⁻¹, while the greatest production of conidia per cm² of sporulation zone and per colony was observed with asparagine at 150 mg and 75 mg N L⁻¹ respectively. In regard to C, the greatest colony diameter and sporulation zone was found with maltose at 2 g C L⁻¹. The number of conidia produced with the sources of C were considerably lower than the ones obtained with N sources.

INTRODUCCION

La moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.) ataca los frutos y reduce seriamente la producción. El agente causal, *Moniliophthora roreri*, ha sido poco estudiado y un mejor conocimiento sobre su biología permitiría complementar los estudios patológico y epidemiológicos necesarios para reducir las pérdidas causadas por esta enfermedad.

No se conocen las condiciones apropiadas de crecimiento, *in vitro*, así como la composición de los substratos en el medio de cultivo ni la temperatura y luminosidad necesarios para una abundante esporulación. En los medios de cultivo se debe suplir nutrimentos esenciales como fuente de carbono y nitrógeno en

COMPENDIO

El efecto sobre el crecimiento y esporulación de colonias del hongo causante de la moniliasis del cacao, *Moniliophthora roreri* de diferentes fuentes de N y de C fue estudiado *in vitro*. Como fuente de N se usaron: asparagina, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, urea, nitrato de sodio y cloruro de amonio en dosis de 15, 75 y 150 mg de N L⁻¹ así como fuente de C la maltosa, sacarosa, lactosa, glucosa, galactosa, xilosa y arabinosa en dosis de 0.2, 2 y 4 g de C L⁻¹. Con respecto al N se encontró que las colonias del hongo *M. roreri* alcanzaron el máximo crecimiento vegetativo y la mayor área esporulada con urea a 75 y 150 mg de N L⁻¹, mientras que la mayor producción de conidios por cm² de área esporulada y por colonia se observó con asparagina a 150 y 75 mg N L⁻¹ respectivamente. Con relación al C, se encontró el mayor diámetro de las colonias y de la zona esporulada con maltosa a 2 g C L⁻¹. La producción de conidios con la fuente de C fue marcadamente inferior a la obtenida con las fuentes de N, posiblemente por el N limitante en el medio.

concentración y tipo adecuados para optimizar el crecimiento vegetativo y la esporulación. Dada la enorme diversidad de los hongos no es posible hacer generalizaciones sobre las condiciones de crecimiento (5)

El nitrógeno es requerido para sintetizar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas y aminoazúcares (3, 12). Los hongos pueden utilizar el nitrógeno en forma de nitratos, nitritos, amonio y aminoácidos u otras moléculas orgánicas como las bases púricas o pirimídicas, sus precursores o productos de su catabolismo. Aunque la mayoría de los hongos pueden utilizar estas fuentes con facilidad, algunos requieren fuentes específicas de N (3, 12). Así ningún patrón de utilización de N puede recomendarse para todos los hongos.

Phillips y Galindo (14), observaron diferencias en el crecimiento micelial de *M. roreri* con diversas fuentes de N. Simonson y Liberta (15) estudiaron la esporulación de *Sistotrema brinkmannii* en 20 fuentes de nitrógeno en concentraciones desde 0.005% hasta 0.25%, y observaron la mayor esporulación con ácido

¹ Recibido para publicación el 26 de enero 1990.

* Estación Experimental Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica, Barrio San José, Alajuela, Costa Rica

** Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales, CATIE, Turrialba 7170, Costa Rica

aspártico (0.025%), fenilalanina (0.1%), prolina (0.005%) y asparagina (0.01%). Moore-Landecker (12), informó que la asparagina permitía el mejor crecimiento de los hongos, seguida de la glicina, ácido glutámico y ácido aspártico.

La habilidad de los hongos de utilizar el carbono en sus diversas formas varía mucho según la fuente de carbono (12). La D-glucosa, D-fructuosa y D-manosa son los monosacáridos que permiten el crecimiento del mayor número de hongos; de los disacáridos comunes son la maltosa, celobiosa, sacarosa y lactosa (12).

Phillips y Galindo (14) observaron mayor crecimiento lineal de colonias de *M. royeri* al aumentar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo base a pH 6.5 e incubados a 28°C. En estudios similares Simonson y Liberta (15) observaron la mayor esporulación de *S. brinkmannii* con sacarosa al 0.05%, maltosa, xilosa, celobiosa al 0.1% y galactosa al 0.25%.

El presente trabajo se realizó con el propósito de conocer el efecto de diferentes concentraciones y fuentes de C y N sobre el crecimiento y esporulación de *M. royeri*, para seleccionar aquellas más favorables con el fin de incluirlas en medios de cultivo de uso rutinario.

MATERIALES Y METODOS

Para evaluar el efecto de varias fuentes de N y C sobre el crecimiento lineal y la esporulación de *M. royeri*, se utilizó un medio basal mineral, al cual se agregó la fuente y concentración en estudio. El medio basal mineral ha sido empleado por Ko y Hora (10) en estudios con *Rhizoctonia solani* (estado imperfecto del basidiomicete *Thanatephorus cucumeris*), al cual se adicionó 0.1 g L⁻¹ de extracto de levadura (14), modificación empleada en previas investigaciones con *M. royeri*. Los componentes del medio basal mineral son en g L⁻¹: K₂HPO₄ 1; MgSO₄·7H₂O 0.5, KCl 0.5 FeSO₄·7H₂O (10 mg), agar 20, glucosa 5 (o las diferentes fuentes y concentraciones de carbono) y extracto de levadura 0.1. En una primera fase del experimento se evaluaron siete fuentes de N, a saber asparagina, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, urea, nitrato de sodio y cloruro de amonio a 15, 75 y 150 mg N L⁻¹. En un segundo experimento, se evaluaron las fuentes de C: maltosa, sacarosa, galactosa, glucosa, arabinosa, xilosa, lactosa a tres concentraciones 0.4, 2 y 4 g de C L⁻¹ además se incluyó un testigo sin C y otro con C de glucosa a 1.5 g L⁻¹. El pH de los medios estériles se corrigió a 6.5 con NaOH 0.1 N estéril. Se agregaron 25 ml de medio a platos de Petri. Cada plato fue inoculado al centro con un disco de 5 mm de diámetro obtenido de la periferia de colonias del hongo *M. royeri* (aislamiento 873) de 15 días de edad. Los cultivos se incubaron por 16 días

a 25°C y luz continua de 50 lumen m² en una incubadora modelo 805 (Precision Scientific Co, Chicago, Estados Unidos de America)

El diseño experimental fue de irrestricto al azar igualmente repetido (6 veces) con arreglo factorial 7 x 3 y un tratamiento adicional. Cada unidad experimental consistió de un plato Petri. Se evaluaron las siguientes variables: diámetro de las colonias y diámetro de la zona esporulada. En ambos casos se tomaron las lecturas cada 48 horas a partir del momento que apareció el crecimiento vegetativo y la zona esporulada. Para determinar el número de conidios por cm² se tomó un disco de 5 mm de diámetro del centro del radio de la zona esporulada de cada colonia y se depositó en un Beaker de 50 ml con 10 ml de solución Tween 80 al 0.001%, se agitó durante 5 min. e inmediatamente después se colocó una muestra en un hematocimetro para contar los conidios de acuerdo a la metodología descrita por French y Herbert (7). Además se determinó el número total de conidios por colonia. Otras observaciones cualitativas que se anotaron cada tres días fueron la forma, color y zonación de las colonias.

RESULTADOS

Efecto de las fuentes y de las dosis de nitrógeno

Diámetro de las colonias y la zona esporulada

Se observaron diferencias significativas en el diámetro de las colonias y de la zona esporulada según la fuente de N, dosis y tiempo de incubación, al igual que las respectivas interacciones. En todos los tratamientos el diámetro de las colonias aumentó con el tiempo de incubación, mientras que el diámetro de la zona esporulada siguió este comportamiento sólo en las fuentes de N, urea, asparagina, ácido aspártico y cloruro de amonio (Cuadro 1).

En los medios con urea, el mayor diámetro de las colonias se observó a partir de los siete días de incubación mientras que con la asparagina y ácido aspártico (75 mg N L⁻¹) solo superaron el tratamiento sin N a partir de los 13 días de incubación. El desarrollo de la zona esporulada con urea, asparagina, ácido aspártico y cloruro de amonio fue mayor que en el tratamiento sin N, a partir del noveno día de incubación. Con el resto de las fuentes y dosis de N el diámetro de las colonias y su zona esporulada fue similar o menor al obtenido en las colonias que no recibieron nitrógeno (Cuadro 1).

A los 16 días de incubación el diámetro máximo de las colonias y la zona esporulada se obtuvo con urea, y los mismos aumentaron conforme se aumentó la dosis de N. Les siguieron en crecimiento las colonias que crecieron en medios con 75 mg de N L⁻¹ como asparagina o ácido aspártico (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de fuentes y dosis de N sobre el crecimiento y esporulación de *Moniliophthora roreri* en medio de cultivo sólido.

Fuente	N g L ⁻¹	Diámetro ¹ (mm)		Producción total conidios X10 ⁶
		Colonia	Zona esporulada	
Urea	15	72	52	76.8 de
	75	75	62	407.7 c
	150	78	67	1 002.4 b
Asparagina	15	61	29	72.4 de ³
	75	66	54	1 299.0 a
	150	54	48	944.3 b
Acido Aspártico	15	28	27	15.5 e
	75	67	52	231.2 d
	150	56	40	145.3 de
Cloruro de amonio	15	61	33	2.7 e
	75	50	39	0.0 e
	150	55	44	9.0 e
Prolina	15	54	26	3.3 e
	75	52	23	13.2 e
	150	42	18	1.2 e
Nitrato de sodio	15	27	17	0.0 e
	75	43	22	0.6 e
	150	48	24	1.1 e
Fenilalanina	15	33	14	2.9 e
	75	25	13	8.2 e
	150	21	17	8.0 e
Medio básico ²	0	49	17	0.9 e

1 Datos tomados a los 16 días de crecimiento Promedio 6 rep.

2 g L⁻¹ (K₂HPO₄ 1; MgSO₄ · 7H₂O 0.5, KCl 0.5, FeSO₄ · 7H₂O (10 mg), agar 20, glucosa 5 y extracto de levadura 0.1)

3 Promedios con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí, según la prueba de Duncan (P: 0.05)

Producción de conidios

La mayor producción de conidios por cm² de área esporulada (54.5 millones) se obtuvo en las colonias que recibieron 150 mg L⁻¹ seguido de 75 mg L⁻¹ (34.6 millones) de N de asparagina. Cuando se aplicó 150 mg L⁻¹ de N como urea, en contraste se obtuvo para el mismo parámetro 26.7 millones y en las colonias crecidas en ausencia de N se obtuvo apenas 0.3 millones por cm² de área esporulada (Cuadro 1).

Al analizar la producción de conidios por colonia, el comportamiento de las diversas fuentes de N varió ligeramente, la mayor producción de conidios correspondió a la asparagina 75 mg N L⁻¹ con 1 299 millones, seguido de la asparagina y urea (150 mg N L⁻¹) con 1 000 y 944 millones, respectivamente. La mayor

producción de conidios por colonia se obtuvo con la asparagina a 75 mg N L⁻¹ posiblemente debido a una mayor área esporulada (Cuadro 1).

Descripción y morfología de las colonias

En las colonias que recibieron asparagina, urea y ácido aspártico, la zona de esporulación se inició con formación de tejido estromático denso y blanco intenso que fue oscureciéndose hasta tornarse pardo claro, rodeada de una zona amarilla clara con cierta tonalidad rosada y un borde blanco poco denso.

Con fenilalanina, prolina, nitrato de sodio, cloruro de amonio y en el testigo sin N, el crecimiento micelial fue lento, la zona esporulada fue rala, de bordes indefinidos y color pardo amarillento

Efecto de la fuente y dosis de carbono

Diámetro de las colonias y la zona esporulada

El crecimiento de las colonias y la zona esporulada varió según la fuente de C, dosis y tiempo de incubación.

Se alcanzó el máximo crecimiento de las colonias a partir del sexto día de incubación en el medio con 2 g L⁻¹ de C de maltosa. En los tratamientos sin carbono el diámetro de las colonias fue similar al obtenido en el resto de los tratamientos, excepto lactosa, con la cual el hongo *M. royeri* no esporuló (Cuadro 2)

Producción de conidios

No se observaron diferencias significativas entre fuentes y dosis de C, aunque las colonias que recibieron maltosa mostraron una mayor tendencia a una mayor producción de conidios.

El inicio de la esporulación varió entre fuentes de C. Con glucosa se inició al sexto día, con arabinosa, galactosa, maltosa, sacarosa y xilosa a los 8-9 días y con lactosa no hubo esporulación.

Morfología colonial

En general al inicio el micelio fue hialino y ralo, posteriormente en la parte central se definió el tejido

Cuadro 2. Efecto de fuentes y dosis de C sobre el crecimiento y esporulación de *Moniliophthora royeri* en medio de cultivo sólido.

Fuente	C g L ⁻¹	Diámetro ¹ (mm)		Producción total conidios X 10 ⁴
		Colonias	Zona esporulada	
Maltosa	0.4	54	28	9.5 a ³
	2.0	74	31	1.6 a
	4.0	60	23	6.3 b
Sucrosa	0.4	42	23	6.3 b
	2.0	49	19	4.3 bc
	4.0	49	23	6.3 b
Galactosa	0.4	61	15	2.7 cd
	2.0	40	18	3.9 bc
	4.0	37	16	3.1 cd
Glucosa	0.4	47	18	3.9 bc
	2.0	36	19	4.4 bc
	4.0	28	15	2.7 cd
Arabinosa	0.4	38	19	4.3 bc
	2.0	29	18	3.9 bc
	4.0	34	14	2.3 cde
Xilosa	0.4	34	15	2.7 cd
	2.0	31	13	2.0 cde
	4.0	19	10	1.2 de
Lactosa	0.4	19	0	0.0 e
	2.0	16	0	0.0 e
	4.0	15	0	0.0 e
Medio básico ²	—	—	17	3.4 cd

1 Datos tomados a los 16 días de crecimiento. Promedio 6 rep.

2 g L⁻¹ (K₂HPO₄ 1; MgSO₄ · 7H₂O 0.5 KCL 0.5, FeSO₄ · 7H₂O (10 mg), agar 20, glucosa 5 y extracto de levadura 0.1)

3 Promedios con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí, según la prueba de Duncan (P: 0.05).

estromático de aspecto denso y de color blanco. Al transcurrir la incubación se tornó pardo claro y luego se oscureció conforme se producían y maduraban los conidios. En las colonias que recibieron lactosa, el micelio no presentó el crecimiento circular típico, sino que creció ramificadamente sin llegar a unirse entre sí.

DISCUSION

Los resultados muestran que *M. roreri* es capaz de utilizar diversas fuentes de C y N en medios de cultivo de manera diferencial al igual que otros hongos (3, 12). En términos generales la demanda de N depende en gran medida de la fuente de C (D-glucosa) utilizable para los hongos (3). En los medios se agregó poco (0.1 g L^{-1}) extracto de levadura, como fuente de aminoácidos y de vitaminas (1). Este complementó el N, C y vitaminas en los medios en los cuales se evaluaron las diversas fuentes de N, pero fue la única fuente de N al probar las fuentes de C. El extracto de levadura tiene 43% de N de aminoácidos (1), así en este último caso concentración de N fue menor pero suficiente para diferencias del patrón de utilización de los carbohidratos.

El crecimiento de los hongos se debe evaluar preferiblemente mediante el peso seco y el contenido de N o de proteínas (2, 4). Sin embargo se acepta, por reproducible, rápido y no destructivo, la medición del crecimiento radial de los hongos en medios sólidos (2, 3, 4). En realidad el crecimiento de las hifas es exponencial y el crecimiento lineal de las colonias se debe a la ramificación de las mismas.

En cuanto a la utilización de las fuentes de N es importante tomar en cuenta la relación C/N puesto que la misma puede influir en el patrón de esporulación (13). Esta varió, sin tomar en cuenta el aporte de N del extracto de levadura de 3.33/1 a 33.3/1. Generalmente se estima que las condiciones que favorecen el crecimiento vegetativo no son las mismas que favorecen el crecimiento reproductivo (5, 9). De esta manera el aumento de la esporulación, que se dio conforme se aumentó la concentración de fuentes de N que se utilizaron con eficiencia (asparagina), no parece deberse a un deterioro del status nutricional del medio, sino más bien a la posible producción de morfógenos en el micelio viejo de la colonia tal como se ha reportado para otros hongos (11). La mayoría de los aminoácidos son absorbidos como tales; una vez absorbidos son metabolizados para formar otros aminoácidos por transaminación. A su vez los mismos pueden servir como fuente de carbono al acoplarse los ácidos orgánicos derivados al ciclo de Krebs (3).

La concentración de un substrato indujo un comportamiento diferente de *M. roreri*. Por ejemplo la

urea como fuente de N, favoreció más el crecimiento vegetativo que la formación de esporas, lo cual también se ha observado con otros hongos (12).

El mayor crecimiento vegetativo con esta fuente puede deberse a su rápida hidrólisis por la enzima ureasa, de amplia distribución en los hongos, a amonio, fórmula de muy rápida utilización por los hongos (12). Esto fue en parte confirmado por los tratamientos con cloruro de amonio en los que el hongo creció de manera semejante, aunque en menor cuantía, no así cuando se agregó al medio de cultivo nitrato de sodio. Sin embargo no es fácilmente explicable la diferencia entre la urea y el cloruro de amonio, al menos que el NH_4^+ haya bajado el pH a niveles más bajos que la urea (3). En el presente trabajo no se cuenta con evidencia experimental sobre el pH final resultante de la utilización de este y ninguno de los sustratos, lo cual limita la interpretación de los resultados. El nitrato para ser asimilado requiere de la acción de la enzima nitrato reductasa (asimilatoria) (3) y además es un proceso que consume energía, lo cual podría explicar el menor crecimiento del hongo. Esta característica respalda la posibilidad que el mismo pertenezca a los Basidiomicetos, según lo propone Evans (6).

La asparagina favoreció el crecimiento vegetativo y la producción de conidios que confirma los resultados de Phillips y Galindo (14), quienes observaron un mayor crecimiento lineal de *M. roreri* al aumentar la dosis de cloruro de amonio y asparagina. Esta última, junto con el ácido aspártico se mencionan como excelentes fuentes de N para los hongos (3, 12). Simonson y Liberta (15) también encontraron alta producción de esporas en el Basidiomicete *S. brinkmannii* al usar asparagina al 0.01% como fuente de N.

Con respecto al C, los resultados sugieren que el hongo respondió más a la fuente que a la dosis de C, lo que coincide con observaciones realizadas en otros hongos (8, 12). Tanto el crecimiento vegetativo como la esporulación fueron menores en comparación a los obtenidos con las diversas fuentes de N posiblemente porque el crecimiento se vio limitado por el N y no por el C, pues la cantidad de N en el medio basal, como extracto de levadura, fue relativamente baja. Además posiblemente la diversidad de los aminoácidos y otras moléculas orgánicas disponibles en el extracto podría no ser de tan rápida asimilación como una fuente única, ya sea un aminoácido o el cloruro de amonio. Esta explicación es atractiva pues las relaciones C/N teóricas en este medio fueron similares a la relación C/N en los medios donde se evaluaron las fuentes de N (a las menores dosis) y con glucosa como fuente de C, donde hubo una esporulación mayor. Sin embargo fue posible establecer la utilización diferencial de las diferentes fuentes de C por el hongo. Por ejemplo, la maltosa fue la fuente de carbono que

permitió el mayor crecimiento micelial, área esporulada y tendencia a una mayor producción de conidios, que coinciden con las observaciones de Phillips y Galindo (14); por otro lado la lactosa no parece ser utilizada por el hongo.

El menor crecimiento vegetativo de *M. royeri* en presencia de glucosa con respecto a la maltosa y la sacarosa es un resultado no esperado, pues la glucosa es de más fácil asimilación ya que su utilización no requiere de la acción de enzimas hidrolíticas.

La esporulación fue mejor cuando se probaron las fuentes de N que las de C, pues en el primer caso existía una buena fuente de C, glucosa en el medio base. En el segundo caso el nutrimento base fue el extracto de levadura en concentración limitada y los cultivos posiblemente se vieron limitados por el N y C en el caso que la fuente de C no se utilizó. Esto no impidió

sin embargo identificar a la maltosa como una fuente óptima de C. Sin embargo la inducción de morfógenos con esta fuente de N pudo haberse afectada puesto que el crecimiento vegetativo del hongo, en las fuentes de C utilizadas fue denso.

Aunque en este estudio el máximo crecimiento se dió a los 16 días de incubación, fue posible observar diferencias consistentes a partir de los 11-13 días por lo que se podría reducir el mismo a unos días para efectos de incubación rutinaria del hongo.

En conclusión, el hongo *M. royeri* aprovechó diferentes fuentes y concentraciones de carbono y nitrógeno de manera diferencial. La urea y la asparagina a 150 y 75 mg N L⁻¹ como fuente de nitrógeno y la maltosa como fuente de carbono a 2 g de C L⁻¹ fueron los que más estimularon el crecimiento y esporulación de *M. royeri*.

LITERATURA CITADA

- BRIDSON, E.Y.; BRECKER, A. 1970 Design and formulation of microbial culture media. In *Methods in Microbiology*. Ed. by J.R. Norris, D.W. Ribbons. New York, Academic Press, v. 3A, p. 229-295.
- CALAM, C. I. 1969 The evaluation of mycelial growth. In *Methods in Microbiology*. Ed. by J.R. Norris, D.W. Ribbons. New York, Academic Press v. 1, p. 567-591.
- COCHRANE, V.W. 1958 *Physiology of fungi*. New York, Wiley. 524 p.
- CODNER, R.C. 1969. Solid and solidified growth media in microbiology. In *Methods in Microbiology*. Ed. by J.R. Norris, D.W. Ribbons. New York, Academic Press. p. 427-454.
- DAHLBERG, K.R.; VAN ETIEN, J.I. 1982 Physiology and biochemistry of fungal sporulation. *Annual Review of Phytopathology* 20:281-301.
- EVANS, C.H. 1986. A reassessment of *Moniliophthora royeri* (*Monilia*) pod rot of cacao. *Cocoa Grower's Bulletin* (England) 37:34-43.
- FRENCH, R.E.; HERBERT, I.T. 1982 Métodos de investigación fitopatológica. San José, C.R., IICA. 289 p.
- HAWKER, L.E. 1968. Environmental influences on reproduction. In *The fungi*. Ed. by G.C. Ainsworth, A.S. Sussman. New York, Academic Press. p. 435-459.
- JAMES, S.W.; MCLAGHLIN, D.J.M. 1988. The influence of carbohydrate source and concentration and light on fruit body development in *Clavicornora pyxidata*. *Mycologia* 80:89-98.
- KO, W.; HORA, F.K. 1972. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 61:707-710.
- MCLEAN, K.M.; PROSSER, J.I. 1987. Development of vegetative mycelium during colony growth of *Neurospora crassa*. *Transactions of the British Mycological Society* 88:489-495.
- MOORE-LANDECKER, E. 1972. *Fundamentals of the fungi*. Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall. 428 p.
- ORIENSEFOR, J.J. 1986. Carbon and nitrogen nutrition in relation to growth and sporulation of *Fusarium oxysporium* f. sp. *elaidis*. *Transactions of the British Mycological Society (England)* 87:519-524.
- PHILLIPS, W.; GALINDO, J.J. 1985. Effect of light, temperature, carbon and nutrition sources on growth and sporulation of *Monilia royeri* Cif y Par. *Phytopathology* 75:1178.
- SIMONSON, G.L.; LIBERTIA, G.A. 1973. Effects of carbon and nitrogen sources on sporulation of *Sistotrema brinkmannii*. *Mycologia* 65:972-974.