

Efectos de los Medios de Cultivo, Regímenes Luminosos y Temperaturas sobre el Crecimiento y Esporulación de *Septoria lycopersici* Speg.¹

S.M. Wolcan*

ABSTRACT

The aim of this paper was to determine the effects produced by external conditions on *S. lycopersici* growth and sporulation. The assays carried out were the following: 1) to test the interaction of three light regimens (short day, long day and continuous darkness), two temperatures (21 and 27°C) and four artificial media (potato dextrose agar, V8 juice agar, Czapek's agar and tomato agar); 2) to compare the behaviour of 13 artificial media exposed to near ultraviolet light in a controlled environment room (20 ± 2°C, 12 h light, 12 h darkness). The observations were taken after 16 and 14 days of incubation, respectively. The results were: 1) growth by *S. lycopersici* was significantly increased only by light at 21°C. Media and light regimens had different behaviours for each temperature. Sporulation was increased at 21°C only in the two illuminated treatments and in tomato agar. At 27°C sporulation was observed only in tomato agar in short and long days; 2) sporulation was significantly increased in malt extract agar with peptone and yeast and in V8 juice agar. In the latter, as with tomato agar, the spore production was abundant from the sixth day on. Colonies, fructifications and spore characteristics in the different treatments are described.

INTRODUCCION

Los factores externos que afectan las funciones fisiológicas de los hongos son muchos: temperatura, nutrición, humedad, iluminación, pH, etc. Estos factores, sumados a las individualidades genéticas de cada organismo, pueden determinar distintas combinaciones de condiciones favorables para su crecimiento y esporulación (3, 4, 5, 10).

¹ Recibido para publicación el 21 de julio 1987.

Trabajo realizado en la Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía, UNLP.

La autora agradece al Ing. R. Boggio por su asistencia en el análisis estadístico, al Ing. H. Alippi por la lectura crítica del manuscrito y al Ing. Montaldi por permitirle el uso de las cámaras climatizadas, pertenecientes al Instituto de Fisiología Vegetal.

* Becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, bajo la dirección de los Ings. Agrs. H. Alippi y L. Ronco. Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía, 60 y 119, C.P.: 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina

COMPENDIO

El objeto de este trabajo fue determinar los efectos producidos por condiciones externas sobre el crecimiento y esporulación de *Septoria lycopersici* Speg. En un ensayo se probó la interacción de tres regímenes luminosos (día largo, día corto y oscuridad continua), dos temperaturas (21 y 27°C y cuatro medios de cultivo (agar de papa glucosado, agar V8, agar Czapek y agar tomate). En otro ensayo, se probaron 13 medios de cultivo a 20 ± 2°C con alternancia de luz y oscuridad, incluyendo irradiación cercana a la ultravioleta. Las observaciones se hicieron a los 16 y 14 días. En el primer ensayo se observó que, sobre el crecimiento, sólo la luz tuvo efecto altamente significativo, estimulándolo a 21°C. Los distintos medios y regímenes luminosos tuvieron distinta respuesta dentro de cada temperatura. Sobre la esporulación la temperatura más favorable fue la de 21°C, destacándose significativamente en los dos regímenes iluminados y en los medios agar tomate y agar V8. A 27°C sólo se observó sobre agar tomate con presencia de luz. En el segundo ensayo, la esporulación se estimuló significativamente sobre agar malta con peptona y levadura y sobre agar V8. En este último medio, al igual que sobre agar tomate, la producción de esporas comenzó a ser abundante a los seis días de la siembra. Se incluyen características de las colonias, de las fructificaciones y de las esporas en los distintos tratamientos.

Con el hongo *Septoria lycopersici* Speg. se probaron los efectos de distintos medios nutritivos (9, 12, 13, 17), bajo distintas temperaturas (12, 15, 16, 17) y con la combinación de iluminación y medios de cultivo (8)

Para probar la existencia de interacciones entre algunos factores externos, en este trabajo se ensayaron las combinaciones de cuatro medios de cultivo, tres regímenes luminosos y dos temperaturas afectando el crecimiento y la esporulación de *S. lycopersici*. Por otro lado, se seleccionaron los medios de cultivo que estimularon la mayor producción de picnidiosporas en el menor tiempo de incubación, con el objeto de acelerar la obtención de inóculo.

MATERIALES Y METODOS

Se investigó con una cepa de *S. lycopersici*, aislada de hojas de tomate, mediante la siembra de los exudados de esporas (cirros) en APG. Estos cirros se forma-

ron a partir de picnidios que maduraron después de mantener el material enfermo, durante 24 a 48 h, en cámara húmeda. Este método fue más efectivo que el aislamiento tradicional por desinfección externa de trocitos de hojas afectadas con alcohol y bicloruro de mercurio, el cual no dio resultado positivo.

Para realizar los ensayos, se partió de una colonia de origen monospóricamente desarrollada sobre APG. Luego de 14 días de incubación a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con régimen de alternancia de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, se transfirieron las picnidiosporas mediante el extendido de las mismas por medio de un asa, a tubos inclinados y cajas de Petri con agar glucosa = AG (glucosa 10 g, agar 17 g y agua destilada 1 000 ml). En este medio pobre se obtuvo, luego de 10 días, una capa translúcida de conidios secundarios (libres), tal como lo probaron Kurozawa y Balmer (10). Este tipo de esporas se empleó como inóculo en los siguientes ensayos:

Ensayo 1:

Efectos de la luz, temperatura y medios de cultivo sobre el crecimiento y la esporulación

Se emplearon los medios agar de papa glucosado = APG (1); agar Czapek = AC (1); agar V8 = AV8 (14) y agar tomate = (filtrado de 300 g de hojas de tomate licuadas, agar 17 g y agua destilada c.s.p. 1 000 ml). Las colonias se incubaron en dos cámaras climatizadas a temperaturas de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Estos valores se aproximan a los citados por otros autores, como rango óptimo para la esporulación de esta especie; generalmente coinciden con el rango que estimula el crecimiento (12, 15, 16, 17). Cada cámara se dividió en dos compartimientos con dos regímenes de iluminación (las cámaras fueron cedidas por el Instituto de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agronomía, UNLP y estaban graduadas con ciclos luminosos coincidentes con la duración aproximada de los períodos fotosintéticos de verano e invierno, en las latitudes medias): día largo = DL (16 h de luz compuestas por 8 h con todos los tubos fluorescentes encendidos, los cuales brindaron una intensidad de $180 \mu\text{em}^{-2} \text{seg}^{-1}$ y 8 h con dos tubos ($28 \mu\text{em}^{-2} \text{seg}^{-1}$) y 8 h de oscuridad y día corto = DC (8h de luz con dos tubos encendidos y 16 h de oscuridad). El tratamiento con oscuridad continua = OC se obtuvo envolviendo las cajas y tubos con papel de aluminio. El material se mantuvo en las cámaras sobre bandejas colocadas a 40 cm de la fuente lumínica.

Crecimiento

Las cajas con los cuatro medios de cultivo se sembraron en el centro con conidios secundarios. Estos

provinieron del desarrollo sobre placas delgadas de AG solidificado en cajas, de las cuales se cortaron trocitos uniformes con un sacabocado de 3.5 mm de diámetro.

Se establecieron cuatro repeticiones para cada tratamiento (24 cajas con cada medio) y se incubaron en las condiciones de temperatura e iluminación detalladas en el Ensayo 1.

Las observaciones se efectuaron a los 16 días después de la siembra. Se consideraron las características de las colonias y el diámetro de las mismas, para lo cual se tuvo en cuenta el promedio de dos diámetros opuestos. Estos últimos valores se analizaron estadísticamente, mediante el método de varianza factorial de 4 (medios de cultivo) x 3 (regímenes de iluminación) x 2 (temperaturas). Los factores altamente significativos se analizaron con la prueba de Tukey.

Esporulación

Los cuatro medios de cultivo, solidificados en tubos inclinados, se sembraron mediante el extendido de conidios secundarios. Estos se obtuvieron a partir de tubos inclinados con AG, de los cuales se tomaron cantidades homogéneas de esporas con ayuda de un asa.

Se establecieron cuatro repeticiones para cada tratamiento (24 tubos con cada medio) y se incubaron durante 16 días en las condiciones detalladas en el Ensayo 1.

Las suspensiones de esporas se prepararon mediante el agregado de 3 ml de agua destilada a cada tubo y el raspado suave de los picnidios con un asa. El recuento de esporas se hizo con ayuda de la cámara de Neubauer.

La esporulación se analizó estadísticamente aplicando el método de varianza con los mismos factores considerados en 1.a. El diseño fue enteramente al azar con igual número de unidades (tubos con suspensiones de esporas) y de subunidades (observaciones dentro de cada tubo). Los factores principales se analizaron con la prueba de Tukey.

Se consideraron las dimensiones de las esporas producidas en cada tratamiento.

Ensayo 2:

Efecto de 13 medios de cultivo sobre la esporulación

Se probó el efecto de los medios agar de papa glucosado = APG (1); agar V8 = AV8 (14); agar harina

de avena = AHA (1); agar ciruela = (1); agar extracto de malta = AEM (1); agar tomate = AT (ver Ensayo 1); agar Czapek = AC (1); agar Fries levadura = AFL (3); agar Martin = AM (2); agar Leonian = AL (11); agar extracto de malta con peptona y levadura = AMPL (extracto de malta 30 g, peptona bacteriológica 5 g, extracto de levadura 2 g, agar 17 g y agua destilada c.s.p. 1 000 ml); agar Czapek Dox V8 = ACDV (6) y agar glucosa = AG (10).

Los medios se distribuyeron en tubos inclinados. Se sembraron con ayuda de un asa mediante el extendido de conidios secundarios desarrollados sobre AG. Se trabajó con cuatro repeticiones de cada medio. Se incubaron durante 14 días en cámara climatizada ajustada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con alternancia de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, incluyendo un período luminoso de 12 h de irradiación ultravioleta.

La preparación de las suspensiones y el recuento de esporas se hicieron según se indicó en el ensayo 1.b.

Los resultados se analizaron estadísticamente aplicando el método de varianza y la prueba de Tukey.

RESULTADOS

Ensayo 1:

Características culturales

Las colonias desarrolladas en cajas de Petri, sobre APG y AV8, mostraron características semejantes. A 21°C y en los regímenes iluminados presentaron estructura estromática, con abundantes picnidios negros, maduros. En oscuridad, se cubrieron con abundante micelio gris. A 27°C , además de reducir notablemente su desarrollo, produjeron muy pocos picnidios inmaduros y se cubrieron con abundantes hifas erectas y cortas que le dieron aspecto aterciopelado.

Sobre AC desarrollaron en ambas temperaturas colonias sumergidas en el medio, con hifas ramificadas, de crecimiento radial, que les dieron aspecto rizoidal, con picnidios separados entre sí, dispuestos sobre las hifas. A 21°C y en oscuridad continua, adoptaron características estromáticas, compactas. En todos los casos, los picnidios no alcanzaron a madurar.

Sobre AT, a 21°C y en los regímenes iluminados, las colonias consistieron en hifas gruesas dispuestas en forma radial, que sostenían picnidios color pardo claro, separados entre sí, con grandes cirros rosados. En oscuridad, desarrolló mayor cantidad de micelio sumergido. A 27°C , adoptaron características estro-

máticas con formación de numerosos picnidios gregarios, la mayoría inmaduros, con mayor cobertura micelial.

En general, la temperatura de 21°C estimuló el crecimiento y la formación de picnidios maduros, también estimulada por los regímenes iluminados. En oposición, en oscuridad continua, hubo mayor desarrollo de micelio en detrimento del desarrollo de fructificaciones.

Crecimiento

En el Cuadro 1 se incluyeron los valores que expresan el diámetro promedio de las cuatro colonias dentro de cada tratamiento.

De acuerdo con el análisis estadístico, sólo la temperatura tuvo efecto altamente significativo ($P = 0.01$) sobre el crecimiento de las colonias. La interacción triple temperatura (T) x medios (M) x luz (L), alcanzó significancia a nivel 0.05, si bien este tipo de interacciones tiene valor relativo.

Dentro de cada temperatura, los efectos de la luz y de los medios fueron diferentes. Se observó mayor crecimiento a 21°C (Fig. 1.a) y dentro de esta temperatura, se destacó APG en día corto y día largo. Por el contrario, a 27°C (Fig. 1.b) y en día largo, APG fue el medio que estimuló menor crecimiento. A esta temperatura, el mayor crecimiento se produjo sobre AT, en todos los regímenes lumínicos.

Esporulación

En el Cuadro 2 se observa que a 27°C sólo hubo esporulación en el medio AT, en los regímenes iluminados. Esto determinó que el análisis estadístico se hiciera con los resultados de los tratamientos a 21°C .

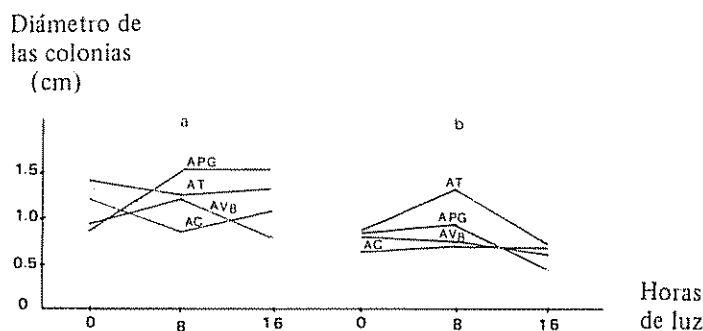
Se destacaron significativamente ($P = 0.01$) los efectos de la luz y de los medios. Al comparar los promedios de estos dos factores por el método de Tukey, se determinó lo siguiente: a) la esporulación fue significativamente mayor ($DMS 1\% = 0.714$), en los regímenes iluminados, con respecto al de oscuridad, y b) los medios AT y AV8 produjeron esporulación significativamente mayor ($DMS 1\% = 0.767$) que APG y AC. En este último, fue nula.

Características de las esporas

En el Cuadro 3 se observa que, a 21°C , la longitud y el número de tabiques de las esporas fueron superiores en los medios AT y AV8, con respecto a APG. A 27°C , las esporas producidas sobre AT fueron visible-

Cuadro 1. Diámetro de las colonias de *S. lycopersici* en los 24 tratamientos expresado en cm. Observación hecha a los 16 días.

Temperatura		21°C			27°C		
Horas de luz		0	8	16	0	8	16
Medios de cultivo	APG	0.93	1.53	1.53	0.81	0.93	0.45
	AC	1.25	0.87	1.02	0.63	0.67	0.58
	AV8	0.97	1.22	0.81	0.77	0.74	0.56
	AT	1.45	1.25	1.33	0.82	1.29	0.70

Fig. 1. Desdoblamiento del efecto de la interacción triple T x M x L sobre el crecimiento de *S. lycopersici*. a: Interacción M x L a 21°C. b: Interacción M x L a 27°C.

mente más cortas que las producidas en el mismo medio a 21°C. En todos los tratamientos, el ancho fue similar

Ensayo 2:

Características de las colonias

El tipo de colonias se dividió en dos grupos, de acuerdo con la formación o no de estroma.

a. Colonias no estromáticas

Los picnidios se encontraron predominantemente dispuestos sobre el medio en forma aislada, manteniendo la individualidad. De acuerdo con su morfología se agruparon en dos categorías:

a.1. Picnidios globosos

Fructificaciones globosas o subglobosas, con ostiolo visible. Desarrollaron sobre AV8 y AT donde tomaron color pardo claro y se cubrieron por grandes cirros, agrupándose en la porción más espesa del medio. En ACi se formaron además algunos picnidios alargados y otros ramificados. Sobre AHA y AG desarrolló poca cantidad de fructificaciones globosas de tamaño reducido.

a.2. Picnidios atípicos ramificados y alargados

Una fructificación inicial que, bajo el microscopio, se ve más oscura, con paredes más gruesas, por brotación se ramifica en otras secundarias, oblongas. Estas, a su vez originan brotes terciarios elongados sobre los cuales se distinguen protuberancias que probablemente darán origen a futuras ramas. Desde los extremos de algunas de ellas se liberan las esporas maduras a través de ostiolos poco visibles. Desarrollaron sobre los medios AL y AEM, en los cuales se observaron también picnidios de forma alargada. Sobre el último medio se encontraron, además, picnidios globosos.

b. Colonias estromáticas

Los picnidios adoptaron forma más o menos globosa y se situaron sobre un grueso estroma negro, compacto, de aspecto rugoso. En AMPL se distinguieron abundantes cirros lechosos, los cuales sobre AFL tomaron coloración parda; en ACDV los picnidios adoptaron forma alargada y en APG y AM se destacaron hifas gruesas, pardo oscuro, con numerosas clamidosporas.

Cuadro 2. Esporulaci3n de *S. lycopersici* en los 24 tratamientos expresada en cantidad de esporas ($\times 10^6$) por ml de suspensi3n. Observaci3n hecha a los 16 d1as.

Temperatura		21°C			27°C		
Horas de luz		0	8	16	0	8	16
Medios de cultivo	APG	0 326	1 112	0 531	0 000	0 000	0 000
	AC	0 000	0 000	0 000	0 000	0 000	0 000
	AV8	9 887	11 525	12 000	0 000	0 000	0 000
	AT	6 681	9 769	10 650	0 001	1 262	0 225

Esporulaci3n

De acuerdo con el resultado de la prueba de Tukey (DMS 1% = 32.58) la esporulaci3n en los medios AMPL y AV8 fue significativamente superior a la de los restantes medios (Fig. 2)

Sobre AV8 y AT se comenzaron a distinguir cirros a partir del cuarto o quinto d1a de la siembra y fueron abundantes a los siete d1as. Sobre AMPL la esporulaci3n se inici3 a la semana y fue profusa a los 10-12 d1as.

DISCUSION

La fisiolog1a y la morfolog1a del desarrollo de los pat3genos, as1 se encuentren sobre sustratos naturales como artificiales, est1n directamente afectadas por factores intr1nicos y extr1nicos.

Sobre *S. lycopersici* el efecto de la luz, en los tratamientos ensayados, no tuvo significancia en el crecimiento pero s1 en la esporulaci3n, la cual fue altamente estimulada en su presencia. Kurozawa y Balmer (8) obtuvieron resultados semejantes al cultivar este hongo en distintas condiciones luminosas.

Cuadro 3. Dimensiones (en μm) y n1mero de tabiques de las picnidiosporas de *S. lycopersici* producidas en los distintos tratamientos (se excluye el medio AC, sobre el cual la esporulaci3n fue nula). (1) n1mero de tabiques m1s frecuente (m1s del 20% del total) en orden decreciente.

Temperatura		21°C			27°C		
Medios de cultivo	Horas de luz	Dimensiones		N1mero de tabiques	Largo (μm)	Ancho (μm)	N1mero de tabiques
		Largo (μm)	Ancho (μm)				
APG	0	49 0 a 74 0 $\bar{X} = 61.86$	2 4 a 3 7 $\bar{X} = 2.97$	3 a 6 (4 - 5)	—	—	—
	8	38 0 a 78 0 $\bar{X} = 56.18$	2 2 a 3 6 $\bar{X} = 2.81$	3 a 6 (3 - 4)	—	—	—
	16	39 0 a 68 0 $\bar{X} = 53.48$	2 2 a 3 7 $\bar{X} = 2.83$	2 a 5 (3 - 4)	—	—	—
AV8	0	62 0 a 120 0 $\bar{X} = 89.68$	2 3 a 3 7 $\bar{X} = 2.94$	4 a 12 (7-6-8)	—	—	—
	8	64 0 a 120 0 $\bar{X} = 85.42$	2 3 a 3 9 $\bar{X} = 3.06$	4 a 12 (7 - 8)	—	—	—
	16	52 0 a 109 0 $\bar{X} = 84.18$	2 3 a 4 0 $\bar{X} = 2.94$	4 a 11 (7 - 6)	—	—	—
AT	0	71 0 a 109 0 $\bar{X} = 86.88$	2 3 a 3 4 $\bar{X} = 2.74$	5 a 9 (5 - 6)	37 0 a 125 0 $\bar{X} = 66.98$	2 4 a 3 5 $\bar{X} = 2.72$	1 a 9 (5 - 4)
	8	49 0 a 127 0 $\bar{X} = 89.40$	2 2 a 4 0 $\bar{X} = 2.85$	3 a 9 (6-5-7)	37 5 a 97 0 $\bar{X} = 62.61$	2 0 a 3 6 $\bar{X} = 2.78$	2 a 11 (5 - 4)
	16	67 5 a 116 0 $\bar{X} = 91.48$	2 4 a 3 0 $\bar{X} = 2.62$	4 a 8 (6 - 5)	26 0 a 67 5 $\bar{X} = 42.03$	2 5 a 3 0 $\bar{X} = 2.75$	1 a 4 (3 - 2)

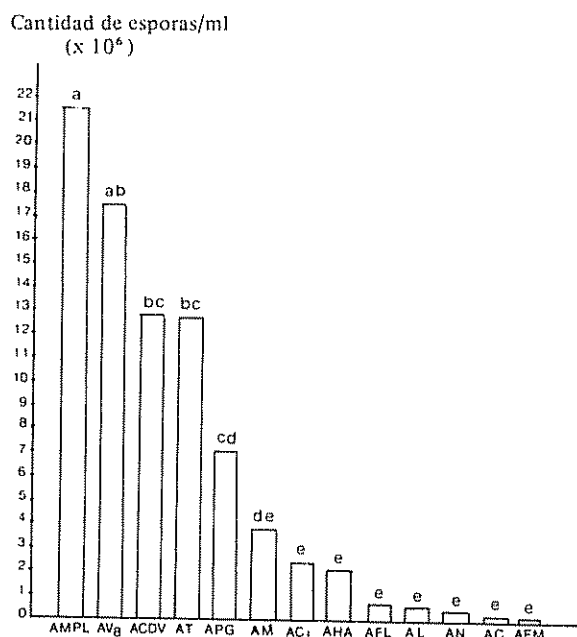


Fig 2. Producción de picnidiosporas de *S. lycopersici* en 13 medios de cultivo. Observación a los 14 días. Las mismas letras sobre las barras indican tratamientos entre los cuales no hubo diferencia significativa (DMS 1% = 32.58).

La temperatura afectó significativamente el crecimiento de las colonias, el cual se estimuló a 21°C. Con respecto a la esporulación, tuvo efecto limitante ya que a 27°C sólo se observó en AT en los regímenes luminosos. Los datos que dan otros autores difieren algo entre sí y con los presentes resultados, sobre todo, en relación con la esporulación: Marcinkovska (12) da un óptimo de 22 a 25°C (máximo 30°C) para el crecimiento y de 17 a 28°C para la maduración de picnidios; Sohi y Soki (17) citan un rango de 5 a 25°C para el crecimiento, 10 a 25°C para el desarrollo de picnidios y 20 a 25°C para el desarrollo de

esporas; Rizinsky (16) observó que el hongo crece entre 3 y 32°C (óptimo 20 a 27°C) y que esporula entre los 14 a 29°C (óptimo 22 a 27°C); Endrinal *et al*, citados por Walker (7), consideran que hay crecimiento entre los 5 y 34°C (óptimo 25°C) y Pritchard y Porte (15) hablan de un rango de 1.5 a 34.4°C (óptimo 25°C) para el crecimiento y 16 a 27°C (óptimo 25°C) para la esporulación. Las diferencias observadas se deberían a la interacción con otros factores, tales como cepas, medios de cultivo, iluminación, etc

Los medios de cultivo no afectaron significativamente el crecimiento, si bien éste, en general, fue mayor sobre AT y AV8. Su efecto varió según las distintas temperaturas y las horas de luz. La esporulación sí fue afectada de manera altamente significativa por los medios. Sobre AC fue nula y sobre AV8 y AT significativamente superior ($P = 0.05$). AT fue el único sobre el cual se produjeron esporas a 27°C (en presencia de luz). Si bien otros autores trabajaron con varios medios de cultivo (9, 13, 17), éstos no fueron los mismos que los probados en este ensayo, por lo cual no se pueden comparar resultados. Excepto en el caso de AV8, que, según Miller (14), estimuló la esporulación en mayor medida que APG.

En los dos ensayos se observó que sobre AT y Av8, la maduración de los picnidios fue profusa a los siete días de incubación, plazo muy inferior con respecto a los restantes medios. Ambos están elaborados exclusivamente con jugos de tejidos vegetales e incluyen a los de tomate, los cuales contendrían alguna sustancia estimulante de la esporulación de este hongo y que no se destruye por acción de la esterilización en autoclave.

LITERATURA CITADA

1. AINSWORTH, G.C. 1971. Dictionary of the fungi. Kew, Surrey, 6 ed Commonwealth Mycological Institute. 663 p.
2. ALIPPI, H.E.; CARRANZA, J.M. 1975. Métodos y técnicas generales fitopatológicas. In Fitopatología. Curso Moderno. Ed. by A.A. Sarasola, M.A. Roca de Sarasola, Buenos Aires, Hemisferio Sur. v.4, p. 189-214.
3. BOUSQUET, J.F.; SKAJENNIKOFF, M. 1974. Isolemente et mode d'action d'une phytotoxine produite en culture par *Septoria nodorum* Berk. Phytopathologische Zeitschrift 80:355-360.
4. CALPOUZOS, L.; STALLKNECHT, G.F. 1965. Sporulation of *Cercospora beticola* affected by an interaction between light and temperature. Phytopathology 55(12):1370-1371.
5. CHO, C.T. 1975. Effect of light and temperature on the sporulation and mycelial growth of *Mycosphaerella fragariae*. Korean Journal of Plant Protection 14(4):205-208.
6. COOKE, B.M.; JONES, G.D. 1970. A field inoculation method for *Septoria tritici* and *Septoria nodorum*. Plant Pathology 19:72-74.

7. ENDRINAL, D M ; CELINO, M S. 1940. *Septoria* leaf spot of tomato. Philippine Agriculturist 29:593. Citado en Walker, J.C. 1959. Enfermedades de las hortalizas
8. KUROSAWA, C.; BALMER, E. 1975. Efeito do regime de iluminação na esporulação de *Septoria lycopersici* Speg. em tres meios de cultura. Arquivos do Instituto Biologico 42:151-156.
9. KUROSAWA, C.; BALMER, E. 1977. Influencia de fatores nutricionais na produção de picnídios, cirros e picnídios férteis de *Septoria lycopersici* Speg. Summa Phytopathologica 3(1):52-58
10. KUROSAWA, C.; BALMER, E. 1977. Efeito de fatores nutricionais, iluminação e de cepas na formação de "conídios secundários" de *Septoria lycopersici* Speg. Summa Phytopathologica 3(1):59-65
11. LEONIAN, L H. 1924. A study of factors promoting picnidium formation in some Sphaeropsidales. American Journal of Botany 11:19-50
12. MARCINKOWSKA, J. 1977. *Septoria* leaf spot of tomato. II. Morphologic and development of *Septoria lycopersici* Speg. Acta Agrobotanica 30(2): 359-372.
13. MAC NEILL, B.H. 1950. Studies in *Septoria lycopersici* Speg. Canadian Journal Research 28:645-672
14. MILLER, P.M. 1955. V8 juice as a general purpose medium for fungi and bacteria. Phytopathology 45:461.
15. PRITCHARD, F.J ; PORTE, W.S. 1924. The relation of temperature and humidity to tomato leaf spot (*Septoria lycopersici* Speg.). Phytopathology 14: 155-165
16. RIZINSKI, S. 1966. A contribution to the study of the biology and control of tomato leaf spot (*Septoria lycopersici*) in the Vardar region. Arhivza poljoprivredne Nauke Teh 19(65):101-131.
17. SOHI, H.S ; SOKHI, S.S. 1974. Morphological, physiological and pathological studies in *Septoria lycopersici*. Indian Phytopathology 26:666-673,