Thesis
F363e

Fernández

# Estudios sobre la nutrición y desarrollo del Cercospora musae, causante de la "Sigatoka" del banano

I.I.C.A.
Tesis

, F363e

D98

# INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS

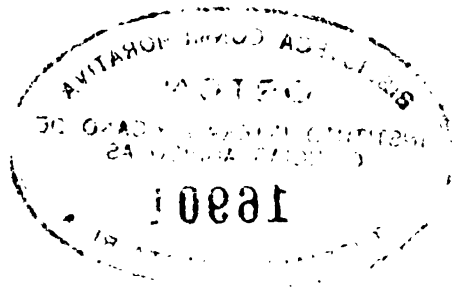
Turrialba, Costa Rica

A. 74384

# ESTUDIOS SOBRE LA NUTRICION Y DESARROLLO DEL CERCOSPORA MUSAE, CAUSANTE DE LA "SIGATOKA" DEL BANANO.

por

Octavio Fernández B.



INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS

TURRIALBA, COSTA RICA

Septiembre de 1953

# ESTUDIOS SOBRE LA NUTRICION Y ENFERMEDAD DEL CAFETO

## EN SUELOS DE LA "SIGATOKA" DEL TAMARCO.

por

Octavio Fernández B.

BIBLIOTECA CONMEMORATIVA
ORTON
INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS
16901
TURRIALBA, COSTA RICA

INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS

TURRIALBA, COSTA RICA

Septiembre de 1953

ESTUDIOS SOBRE LA NUTRICION Y DESARROLLO DEL CERCOSPORA MUSAE, CAUSANTE DE LA "SIGATOKA" DEL BANANO.

Tesis

Sometida al Comité de Estudios Graduados como requisito parcial para optar el grado de

Magistri Agriculturae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas

APROBADA: R. J. Ordúsana
Consejero

William J. Loegering
Asociado

Asociado

Fecha: Sept. - 1963.

/

ESTUDIOS SOBRE LA NUTRICION Y DESARROLLO DEL CERCOSPORA MUSAE, CAUSANTE DE LA "SIGATOKA" DEL BANANO.

Tesis

Sometida al Comité de Estudios Graduados como requisito parcial para optar el grado de

Magister Agriculturae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas

APROBADA:

Consejero

Asociado

Asociado

Fecha: Sept. - 1963

## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos al Dr. Rodrigo Orellana por su constante ayuda a través de todo el trabajo y por la corrección del manuscrito.

A los Drs. William Q. Loegering y Kenneth L. Olsen por sus valiosas sugestiones y revisión del manuscrito.

Al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas y a la Shell Oil Co., Modesto, California, por hacer posible el presente estudio.

A los Drs. Carlos Madrid S. y Carlos Garcés O. quienes le brindaron la oportunidad de venir a este Instituto.

## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos al Dr. Rodrigo Orellana por su constante ayuda a través de todo el trabajo y por la corrección del manuscrito.

A los Drs. William G. Loegering y Kenneth L. Olsen por sus valiosas sugestiones y revisión del manuscrito.

Al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas y a la Shell Oil Co., Modesto, California, por hacer posible el presente estudio.

A los Drs. Carlos Madrid S. y Carlos Garcés O. quienes le brindaron la oportunidad de venir a este Instituto.

## BIOGRAFIA DEL AUTOR

Octavio Fernández Borrero nació en Aracataca, Magdalena, Colombia. Hizo sus estudios primarios en su ciudad natal. En 1945 recibió el grado de Bachiller Superior en el Liceo Celedón de Santa Marta, Colombia. De 1946 a 1950 hizo sus estudios de Ingeniería Agronómica en la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín. De octubre de 1951 a septiembre de 1953 permaneció en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, en calidad de estudiante graduado, realizando el presente estudio. Actuó como asistente de laboratorio en el curso de Fitopatología dictado en este Instituto en el trimestre septiembre-diciembre de 1952.

## BIOGRAFIA DEL AUTOR

Octavio Fernández Borrero nació en Aracataca, Magdalena, Colombia. Hizo sus estudios primarios en su ciudad natal. En 1945 recibió el grado de Bachiller Superior en el Liceo Celedón de Santa Marta, Colombia. De 1946 a 1950 hizo sus estudios de Ingeniería Agronómica en la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín. De octubre de 1951 a septiembre de 1953 permaneció en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, en calidad de estudiante graduado, realizando el presente estudio. Actuó como asistente de laboratorio en el curso de Fitopatología dictado en este Instituto en el trimestre septiembre-diciembre de 1952.

CONTENIDO


| | Pagina |
|---|---|
| AGRADECIMIENTOS. . . . . | i |
| BIOGRAFIA DEL AUTOR. . . . . | ii |
| CONTENIDO. . . . . | iii |
| INTRODUCCION . . . . . | 1 |
| REVISION DE LITERATURA . . . . . | 3 |
| Hábitos esporulativos de las Cercospora . . . . | 4 |
| MATERIALES Y METODOS . . . . . | 6 |
| Aislamiento del hongo . . . . . | 7 |
| Medios de cultivos usados . . . . . | 10 |
| Pruebas de patogenicidad. . . . . | 12 |
| Estudios sobre la nutrición de C. musae . . . . | 13 |
| RESULTADOS EXPERIMENTALES. . . . . | 17 |
| Características culturales. . . . . | 17 |
| Producción de conidias. . . . . | 18 |
| Influencia de la dextrosa sobre la esporulación | 19 |
| Mantenimiento de los cultivos en esporulación . | 20 |
| Inoculaciones artificiales. . . . . | 22 |
| Utilización de vitaminas. . . . . | 24 |
| Efectos de la aireación . . . . . | 30 |
| Efectos de diferentes concentraciones de tiamina. . . . . | 32 |
| Efectos del pH sobre el crecimiento . . . . . | 37 |
| Efectos de diferentes fuentes de carbono. . . . | 40 |
| Efectos de diferentes fuentes de nitrógeno. . . | 40 |
| DISCUSION Y CONCLUSIONES . . . . . | 44 |
| RESUMEN. . . . . | 58 |
| SUMMARY. . . . . | 61 |
| BIBLIOGRAFIA . . . . . | 64 |

CONTENIDO


Página

AGRADECIMIENTOS. . . . . 1

BIOGRAFIA DEL AUTOR. . . . . 11

CONTENIDO. . . . . iii

INTRODUCCION . . . . . 1

REVISION DE LITERATURA . . . . . 3
Medios esporulativos de las Cercosporas . . . . 4

MATERIALES Y METODOS . . . . . 6
Aislamiento del hongo . . . . . 7
Medios de cultivos usados . . . . . 10
Pruebas de patogenicidad. . . . . 12
Estudios sobre la nutrición de C. musae . . . . 13

RESULTADOS EXPERIMENTALES. . . . . 17
Características culturales. . . . . 17
Producción de conidias. . . . . 18
Influencia de la dextrosa sobre la esporulación 19
Mantenimiento de los cultivos en esporulación . 20
Inoculaciones artificiales. . . . . 22
Utilización de vitaminas. . . . . 24
Efectos de la aireación . . . . . 30
Efectos de diferentes concentraciones de
tiamina. . . . . 32
Efectos del pH sobre el crecimiento . . . . . 37
Efectos de diferentes fuentes de carbono. . . 40
Efectos de diferentes fuentes de nitrógeno. . . 40

DISCUSION Y CONCLUSIONES . . . . . 44

RESUMEN. . . . . 58

SUMMARY. . . . . 61

BIBLIOGRAFIA . . . . . 64

# INTRODUCCION

La "Sigatoka", causada por el hongo Cercospora musae Zimm., es una de las enfermedades de mayor importancia económica que atacan a la planta de banano. En las regiones de la América tropical en donde se presenta con caracteres epifitóticos, es practicamente imposible establecer una plantación de banano sin antes pensar en un adecuado plan de combate de la enfermedad.

Aun cuando se han empleado muchos fungicidas para su combate, algunos de los cuales han dado buenos resultados, especialmente el caldo bordelés, sin embargo, todavía existe un interés común tanto por parte del cultivador como de las compañías productoras de fungicidas, en encontrar un fungicida que a más de tóxico para el hongo, sea económico y de más fácil preparación y aplicación que el bordelés.

El personal de la Shell Oil Co., Agricultural Research Laboratories, Modesto, California, es uno de los más interesados en desarrollar nuevos compuestos químicos que sean efectivos contra esta enfermedad. Esta compañía cuenta con algunos fungicidas prometedores y desea llevar a cabo pruebas de combate químico en el laboratorio y en el invernadero contra la "Sigatoka". Para el efecto, pidió al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas

# INTRODUCCION

La "Sigatoka", causada por el hongo Cercospora musae Zimm., es una de las enfermedades de mayor importancia económica que atacan a la planta de banano. En las regiones de la América tropical en donde se presenta con caracteres epilfitóticos, es practicamente imposible establecer una plantación de banano sin antes pensar en un adecuado plan de combate de la enfermedad.

Aun cuando se han empleado muchos fungicidas para su combate, algunos de los cuales han dado buenos resultados, especialmente el caldo bordelés, sin embargo, todavía existe un interés común tanto por parte del cultivador como de las compañías productoras de fungicidas, en encontrar un fungicida que a más de téxico para el hongo, sea económico y de más fácil preparación y aplicación que el bordelés.

El personal de la Shell Oil Co., Agricultural Research Laboratories, Modesto, California, es uno de los más interesados en desarrollar nuevos compuestos químicos que sean efectivos contra esta enfermedad. Esta compañía cuenta con algunos fungicidas prometedores y desea llevar a cabo pruebas de combate químico en el laboratorio y en el invernadero contra la "Sigatoka". Para el efecto, pidió al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas

que se le enviaran cultivos puros esporulados de C. musae. Fué ésta una de las razones que se tuvo para iniciar el presente estudio.

Muchos son los trabajos que se han realizado sobre la etiología, descripción y combate de la enfermedad, pero todavía quedan varios problemas que necesitan estudiarse.

Unido al problema del aislamiento del organismo en cultivo puro, estaba el de su esporulación. Todavía no se ha logrado hacerlo esporular abundantemente en cultivo artificial y existe interés en encontrar el medio y condiciones apropiados para su esporulación. Posiblemente una de las razones que existe para que se haya descuidado este aspecto es la relativa facilidad con que se obtienen conidias naturales directamente de hojas infectadas.

Por otra parte, hasta donde el autor conoce, no se sabe nada sobre la nutrición del hongo. Por esta razón se decidió estudiar este aspecto. Estos trabajos sobre nutrición parecen ser los primeros que se realizan, y se espera que sirvan de base para posteriores estudios.

En general, los objetivos que se persiguen con el presente trabajo son tres:

1. Determinar la técnica más adecuada para el aislamiento del hongo en forma pura;
2. Conseguir el medio de cultivo y determinar

que se le enviaran cultivos puros esporulados de C. musae. Fué ésta una de las razones que se tuvo para iniciar el presente estudio.

Muchos son los trabajos que se han realizado sobre la etiología, descripción y combate de la enfermedad, pero todavía quedan varios problemas que necesitan estudiarse.

Unido al problema del aislamiento del organismo en cultivo puro, estaba el de su esporulación. Todavía no se ha logrado hacerlo esporular abundantemente en cultivo artificial y existe interés en encontrar el medio y condiciones apropiados para su esporulación. Posiblemente una de las razones que existe para que se haya descuidado este aspecto es la relativa facilidad con que se obtienen conidias naturales directamente de hojas infectadas.

Por otra parte, hasta donde el autor conoce, no se sabe nada sobre la nutrición del hongo. Por esta razón se decidió estudiar este aspecto. Estos trabajos sobre nutrición parecen ser los primeros que se realizan, y se espera que sirvan de base para posteriores estudios.

En general, los objetivos que se persiguen con el presente trabajo son tres:

1. Determinar la técnica más adecuada para el aislamiento del hongo en forma pura;

2. Conseguir el medio de cultivo y determinar

las condiciones más apropiadas para su esporulación.

3. Estudiar la nutrición de este organismo, para determinar los factores que influyen en su crecimiento.

## REVISION DE LITERATURA

Riker & Riker (37) y Wolf & Wolf (51) describieron los métodos más comunmente empleados para el aislamiento de organismos en forma pura, y Hildebrand (14, 15) y Dickinson (5) hicieron una revisión de literatura sobre los métodos que se han seguido para la obtención de microorganismos en forma pura y, en especial, para el aislamiento de una sola espora.

La mayoría de los trabajos consultados sobre C. musae no describen la técnica de obtención del hongo en cultivo puro. Stahel (43) considera que es fácil aislarlo de conidias, a la manera descrita por Campbell y Simmonds*, pero no transcribe el método seguido por ellos. Dantas

---

*Campbell, J. G. C. Banana disease. Fiji Legisl. Council Paper No. 32 and 70, May and Nov. 1926.

Simmonds, J. H. Banana leaf spot. Queensland Dep. Agr. and Stock Div. Ent. & Plant Path., Pamphlet No. 6. 1933, pp 18-19.

Estas publicaciones no se pudieron consultar por no tenerse disponibles.

las condiciones más apropiadas para su esporulación.

3. Estudiar la nutrición de este organismo, para determinar los factores que influyen en su crecimiento.

## REVISION DE LITERATURA

Riker & Riker (37) y Wolf & Wolf (51) describieron los métodos más comunmente empleados para el aislamiento de organismos en forma pura, y Hildebrand (14, 15) y Dickinson (5) hicieron una revisión de literatura sobre los métodos que se han seguido para la obtención de microorganismos en forma pura, en especial, para el aislamiento de una sola espora.

La mayoría de los trabajos consultados sobre C. musae no describen la técnica de obtención del hongo en cultivo puro. Stahel (43) considera que es fácil aislarlo de cortadas, a la manera descrita por Campbell y Simmonds*, pero no transcribe el método seguido por ellos. Dantas

*Campbell, J. G. C. Banana diseases. Fiji Legisl. Council Paper No. 32 and 70, May and Nov. 1926.

Simmonds, J. H. Banana leaf spot. Queensland Dep. Agr. and Stock Div. Ent. & Plant Path., Pamphlet No. 6. 1933, pp 18-19.

Estas publicaciones no se pudieron consultar por no tenerse disponibles.

(3) obtuvo cultivos monospóricos separando las conidias distribuídas sobre la superficie de agar en platos de Petrí utilizando un microcolector adaptado al objetivo del microscopio. Meredith y Butler (32) aislaron el organismo de la manera siguiente: mantuvieron hojas de banano con manchas típicas de Cercospora bajo condiciones de alta humedad, durante 15 a 20 horas. Al cabo de este tiempo separaron las conidias pasando sobre las manchas una "loop" con agua destilada esterilizada y transfiriéndolas entonces al medio de cultivo.

Hábitos esporulativos de las Cercospora.

Varios investigadores han observado que muchas especies del género Cercospora esporulan con dificultad o no lo hacen del todo en medio artificial. Duggar (6) mantuvo cultivos de C. beticula bajo varias condiciones en el laboratorio, en medio natural, pero nunca desarrollaron conidias. El mismo investigador y Bailey (7, p. 206) y Lewis (25) reportaron que aislamientos de C. apii Fres. esporularon en pocos días cuando se cultivaron en tallos de frijol y peciolos de apio estériles, y en un medio compuesto de suelo y hojitas de apio, respectivamente. Hopkins (16) obtuvo abundante conidias de C. medicaginis sometiendo los platos de cultivo a un secamiento parcial. Welles (49) no observó fructificación

(3) obtuvo cultivos monospóricos separando las conidias diseminadas sobre la superficie de agar en platos de Petri utilizando un microcolector adaptado al objetivo del microscopio. Meredith y Butler (32) aislaron el organismo de la manera siguiente: mantuvieron hojas de banano con manchas típicas de Cercospora bajo condiciones de alta humedad, durante 15 a 20 horas. Al cabo de este tiempo separaron las conidias pasando sobre las manchas una "loop" con agua destilada esterilizada y transfirieron dolas entonces al medio de cultivo.

Hábitos esporulativos de las Cercospora.

Varios investigadores han observado que muchas especies del género Cercospora esporulan con dificultad o no lo hacen del todo en medio artificial. Duggar (6) mantuvo cultivos de C. beticula bajo varias condiciones en el laboratorio, en medio natural, pero nunca desarrollaron conidias. El mismo investigador y Bailey (7, p. 206) y Lewis (25) reportaron que aislamientos de C. apii Pres. esporularon en pocos días cuando se cultivaron en tallos de frijol y pecíolos de apio esterilizes, y en un medio compuesto de suelo y hojitas de apio, respectivamente. Hopkins (16) obtuvo abundante conidias de C. medicaginis sometiendo los platos de cultivo a un secamiento parcial. Welles (49) no observó fructificación

en cultivos artificiales de C. melongenae mantenidos en observación durante 5 semanas. Diachum y Valleau (4) reportaron haber obtenido conidias de C. nicotianae en un medio preparado con extracto de hojas de tabaco. Jenkins (18) no observó fructificaciones de C. cerasella en medios de papa-agar, harina de maíz-agar, frijol-agar, dextrosa-agar y decocción de hojas de cereza-agar, a cada uno de los cuales les agregó fragmentos de hojas enfermas como una fuente adicional de nutrientes. Pero, si tubos con dichos medios, en los cuales el organismo había crecido por algún tiempo, fueron nuevamente esterilizados e inoculados, se produjeron conidias cuando usó cultivos de ascosporas como fuente de inóculo. Nagel (35) y Nagel y Dietz (36) trabajando con varias especies de Cercospora lograron hacerlas esporular en un medio como papa-dextrosa-agar y mantenerlas en esporulación durante varias generaciones por transferencias sucesivas de conidias a intervalos de 3 a 6 días.

No menos dificultad se ha encontrado en la producción de conidias en cultivos puros de C. musae. Los sistemas hasta ahora desarrollados son limitados y ofrecen sus inconvenientes. Stahel (43) indica que en cultivo puro este hongo no produce conidias. Sin embargo, este investigador obtuvo alguna esporulación sobre hojas verdes de

en cultivos artificiales de C. melongenae mantenidos en observación durante 5 semanas. Discum y Vallean (4) re-portaron haber obtenido conidias de C. picoliana en un medio preparado con extracto de hojas de tabaco. Jenkins (16) no observó fructificaciones de C. cerasella en medios de papa-agar, harina de maíz-agar, trifol-agar, dextrosa-agar y decocción de hojas de cereza-agar, a cada uno de los cuales les agregó fragmentos de hojas enfermas como una fuente adicional de nutrientes. Iero, si tubos con dichos medios, en los cuales el organismo había crecido por algún tiempo, fueron nuevamente esterilizados e inoculados, se produjeron conidias cuando usó cultivos de ascosporas como fuente de inóculo. Nagel (35) y Nagel y Dietz (36) trabajando con varias especies de Cercospora lograron hacerlas esporular en un medio como papa-dextrosa-agar y mantenerlas en esporulación durante varias generaciones por transferencias sucesivas de conidias a intervalos de 3 a 6 días.

No menos dificultad se ha encontrado en la producción de conidias en cultivos puros de C. musae. Los sistemas hasta ahora desarrollados son limitados y ofrecen sus inconvenientes. Stanel (43) indica que en cultivo puro este hongo no produce conidias. Sin embargo, este investigador obtuvo algunas esporulación sobre hojas verdes de

banano con manchas primarias de la enfermedad, lavadas y desinfestadas con sublimado corrosivo y puestas en tubos de ensayo esterilizados. Agrega, además, que este método es laborioso e inconveniente. Simmonds (40, 41) indica que el hongo no esporula en cultivo artificial. En un intento para producir conidias en cultivos puros, usó 20 diferentes medios naturales, pero no obtuvo resultado satisfactorio alguno. Meredith y Butler (32) consiguieron esporulación en un medio preparado con extracto de hojas de banano, usando secciones de hoja de 8 por 12 pulgadas, finamente cortadas y hervidas por 5 minutos en 500 ml. de agua destilada. Con el filtrado preparó un litro de medio, agregándole agua destilada y 2% de agar. El agua empleada la destiló en vasijas Pyrex y evitó todo posible contacto de cobre con el medio. Conidias fueron observadas (3) también en cultivo puro en un medio compuesto de 10 gm. de avena, 5 gm. de dextrosa, 5 gm. de peptona, 20 gm. de azúcar comercial cristalizada, 20 gm. de agar, y extracto de carne al 1% o extracto de hoja joven de banano al 5%.

## MATERIALES Y METODOS

Los trabajos aquí descritos fueron realizados en el campo y en el laboratorio en el Instituto Interamericano

banano con manchas primarias de la enfermedad, lavadas y desinfestadas con sublimado corrosivo y puestas en tubos de ensayo esterilizados. Luego, además, que este método es laborioso e inconveniente. Simmonds (40, 41) indica que el hongo no esporula en cultivo artificial. En un intento para producir conidias en cultivos puros, usó 20 diferentes medios naturales, pero no obtuvo resultado satisfactorio alguno. Meredith y Butler (32) consiguieron esporulación en un medio preparado con extracto de hojas de banano, usando secciones de hoja de 6 por 12 pulgadas, finamente cortadas y hervidas por 5 minutos en 500 ml. de agua destilada. Con el filtrado preparó un litro de medio, agregándole agua destilada y 2% de agar. El agua empleada la destiló en vasijas Pyrex y evitó todo posible contacto de cobre con el medio. Conidias fueron observadas (3) también en cultivo puro en un medio compuesto de 10 gm. de avena, 5 gm. de dextrosa, 5 gm. de peptona, 20 gm. de azúcar comercial cristalizada, 20 gm. de agar, y extracto de carne al 1% o extracto de hoja joven de banano al 5%.

## MATERIALES Y METODOS

Los trabajos aquí descritos fueron realizados en el campo y en el laboratorio en el Instituto Interamericano

de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica. El material infectado fué obtenido de plantas de banano del mismo Instituto.

Aislamiento del hongo. Las siguientes 6 técnicas se emplearon para aislar el organismo causante de la "Sigatoka" del banano:

1. Pedacitos de hojas infectadas en diferentes estados de desarrollo, previamente desinfestados con $Cl_2Hg$ al 1:1000 durante 1 minuto y luego lavados con agua destilada esterilizada, fueron sembrados directamente en medio de cultivo.

Debido al crecimiento lento de C. musae en medio artificial y a la presencia en las manchas de las hojas de otros hongos secundarios que rapidamente invaden el medio de cultivo, este método no dió resultados satisfactorios.

2. En un intento para evitar la ocurrencia de los organismos secundarios, se recurrió al siguiente método: hojas sobre las cuales aun no se habían manifestado los síntomas de la enfermedad, pero que se supusieron infectadas, se mantuvieron en cámara húmeda en el laboratorio hasta cuando se hicieron visibles los síntomas primarios de la enfermedad. A los 7 días aparecieron algunas manchas primarias de la enfermedad. Estas manchas se utilizaron para la siembra como en el caso anterior. Tampoco

de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica. El material infectado fué obtenido de plantas de banano del mismo Instituto.

Aislamiento del hongo. Las siguientes técnicas se emplearon para aislar el organismo causante de la "Sigatoka" del banano:

1. Pedacitos de hojas infectadas en diferentes estados de desarrollo, previamente desinfestados con $ClHg$ al 1:1000 durante 1 minuto y luego lavados con agua desti lada esterilizada, fueron sembrados directamente en medio de cultivo.

Debido al crecimiento lento de C. musae en medio artificial y a la presencia en las manchas de las hojas de otros hongos secundarios que rapidamente invaden el medio de cultivo, este método no dió resultados satisfactorios.

2. En un intento para evitar la ocurrencia de los organismos secundarios, se recurrió al siguiente método: hojas sobre las cuales aun no se habían manifestado los síntomas de la enfermedad, pero que se supusieron infectadas, se mantuvieron en cámara húmeda en el laboratorio hasta cuando se hicieron visibles los síntomas primarios de la enfermedad. A los 7 días aparecieron algunas manchas primarias de la enfermedad. Estas manchas se utilizaron para la siembra como en el caso anterior. Tampoco

se obtuvo resultados satisfactorios por este método.

3. Método de dilución: De hojas infectadas se separaron directamente las conidias de las manchas necróticas a la manera descrita por Stahel (43) y se depositaron en un tubo de ensayo con agua destilada esterilizada. De esta suspensión de esporas se hicieron 5 diluciones, cada una con diferente concentración. Posteriormente, se echó 1 ml. de cada dilución en sendas cajas de Petrí y se les agregó el medio de cultivo. Se dejaron en incubación durante 7-8 días. Al cabo de este tiempo, las pequeñas colonias de micelio que aparecieron sobre la superficie del agar, se transfirieron a nuevo medio.

Este método fué mas satisfactorio, pero ocurrió mucha contaminación y fué necesario hacer demasiadas transferencias para lograr unos pocos cultivos en forma pura.

4. Similar al 3, pero en este caso se mantuvieron las conidias en incubación solamente hasta cuando comenzaron a germinar. Siguiendo la técnica de Keitt (19) se localizaron las conidias con el bajo poder del microscopio, siempre con la caja de Petrí invertida, y se señalaron poniendo un punto con tinta en el lugar exacto en que se encontraba cada conidia. Después se transfirieron individualmente con la pequeña porción de agar que las rodeaba, a papa-dextrosa-agar.

se obtuvo resultados satisfactorios por este método.

3. Método de dilución: De hojas infectadas se separaron directamente las conidias de las manchas necróticas a la manera descrita por Stahel (43) y se depositaron en un tubo de ensayo con agua destilada esterilizada. De esta suspensión de esporas se hicieron 5 diluciones, cada una con diferente concentración. Posteriormente, se echó 1 ml. de cada dilución en sendas cajas de Petri y se les agregó el medio de cultivo. Se dejaron en incubación durante 7-8 días. Al cabo de este tiempo, las pequeñas colonias de micelio que aparecieron sobre la superficie del agar, se transfirieron a nuevo medio.

Este método fué más satisfactorio, pero ocurrió mucha contaminación y fué necesario hacer demasiadas transferencias para lograr unos pocos cultivos en forma pura.

4. Similar al 3, pero en este caso se mantuvieron las conidias en incubación solamente hasta cuando comenzaron a germinar. Siguiendo la técnica de Leach (19) se localizaron las conidias con el bajo poder del microscopio, siempre con la caja de Petri invertida, y se señalaron poniendo un punto con tinta en el lugar exacto en que se encontraba cada conidia. Después se transfirieron individualmente con la pequeña porción de agar que las rodeaba, a papa-dextrosa-agar.

Para este método es necesario que el agar sea lo suficientemente claro y que se ponga en la caja de Petrí una cantidad apenas necesaria para formar una delgada capa, lo que permite la fácil localización de las conidias. El agar agua dió buenos resultados. Este método como el 3, fué algo satisfactorio, pero hubo mucha contaminación.

5. Método Meredith y Butler (32), descrito anteriormente: Este método resultó demasiado azoroso. Al pasarse una "loop" con agua por sobre la mancha de la hoja, sin estarse observando las conidias, bien puede suceder que se las desprenda de sus conidióforos o que no. Por otra parte, las conidias no se separan muy facilmente y hay manchas que a las 15 o 20 horas de estar en cámara húmeda aún no han producido conidias. En estas circunstancias, no se pueden esperar con seguridad cultivos puros del hongo. Por este método no se logró obtener cultivos del hongo.

6. Siguiendo el método empleado por Nagel (35) con otras especies de Cercospora, se trajeron al laboratorio hojas de banano infectadas, se lavaron ligeramente y se mantuvieron en cámara húmeda durante 15 a 20 horas. Al cabo de este tiempo, con ayuda del microscopio de disección se localizaron las conidias sobre las manchas y se transfirieron al medio de cultivo removiéndolas con una

Para este método es necesario que el agar sea lo suficientemente claro y que se ponga en la caja de Petri una cantidad apenas necesaria para formar una delgada capa, lo que permite la fácil localización de las contidias. El agar agua dió buenos resultados. Este método como el 3, fué algo satisfactorio, pero hubo mucha contaminación.

5. Método Meredith y Butler (32), descrito anteriormente: Este método resultó demasiado azaroso. Al pasarse una "loop" con agua por sobre la mancha de la hoja, sin estarse observando las conidias, bien puede suceder que se las desprenda de sus conidióforos o que no. Por otra parte, las conidias no se separan muy fácilmente y hay manchas que a las 15 o 20 horas de estar en cámara húmeda aún no han producido conidias. En estas circunstancias, no se pueden esperar con seguridad cultivos puros del hongo. Por este método no se logró obtener cultivos del hongo.

6. Siguiendo el método empleado por Nagel (35) con otras especies de Cercospora, se trajeron al laboratorio hojas de banano infectadas, se lavaron ligeramente y se mantuvieron en cámara húmeda durante 15 a 20 horas. Al cabo de este tiempo, con ayuda del microscopio de disección se localizaron las conidias sobre las manchas y se transfirieron al medio de cultivo removiéndolas con una

aguja, previamente desinfestada y humedecida con el medio de cultivo para facilitar la adherencia.

Este método resultó ser el mejor por lo seguro y sencillo. Un alto porcentaje de los aislamientos resultaron libres de contaminación.

Cuando se necesitan hacer cultivos monospóricos y no se dispone de un micromanipulador, el método 4 da buenos resultados pero haciendo una suspensión con conidias recolectadas a la manera empleada en el método 6 y siguiendo el sistema Keitt (19) con la modificación de Ezequiel (8). Empleando esta técnica se obtuvieron rapidamente cultivos monospóricos.

Medios de cultivos usados.

Se emplearon los siguientes medios de cultivos naturales:

1. Papa-dextrosa-agar, preparado con 200 gm. de papa, 20 gm. de dextrosa y 17 gm. de Bacto-Agar por litro de medio.
2. Tres clases de medios utilizando diferentes partes de la hoja de banano así:
   A. Utilizando las partes de la hoja solubles en agua;
   B. Utilizando las partes de la hoja insolubles en agua; y

agua, previamente desinfestada y humedecida con el medio de cultivo para facilitar la adherencia.

Este método resulta ser el mejor por lo seguro y sencillo. Un alto porcentaje de los aislamientos resultaron libres de contaminación.

Cuando se necesitan hacer cultivos monospóricos y no se dispone de un micromanipulador, el método + da buenos resultados pero haciendo una suspensión con conidias recolectadas a la manera empleada en el método 6 y siguiendo el sistema Reitt (19) con la modificación de Dezquiel (8). Empleando esta técnica se obtuvieron rápidamente cultivos monospóricos.

Medios de cultivos usados.

Se emplearon los siguientes medios de cultivos naturales:

1. Papa-dextrosa-agar, preparado con 200 gm. de papa, 20 gm. de dextrosa y 17 gm. de Bacto-Agar por litro de medio.
2. Tres clases de medios utilizando diferentes partes de la hoja de banano así:
   A. Utilizando las partes de la hoja sumergidas en agua;
   B. Utilizando las partes de la hoja sumergidas en agua; y

C. Utilizando las proteínas de la hoja, precipitadas con sulfato de amonio.

Estos medios se prepararon en 3 concentraciones diferentes, usando 5, 20 y 30 gm. de hoja por litro. Los medios de cada concentración se dividieron en 2 series: una agregándoles dextrosa en la proporción de 20 gm. por litro y otra sin dextrosa. Estos medios se solidificaron con 17 gm. de agar. El sistema para obtener las diferentes partes consistió en cortar el pedazo de hoja y agitarlo en un "Waring Blender" con 500 ml. de agua destilada, durante 3 minutos. Por centrifugación se separaron las partes solubles e insolubles. Para obtener las proteínas se agregó a las partes solubles en agua, sulfato de amonio a razón de 22 gm. por 100 ml. Se dejó el tiempo necesario para que ocurriera la precipitación completa y luego se hizo la separación por centrifugación.

3. También se usó un medio de cultivo similar al de Meredith y Butler (32) descrito anteriormente. No se tuvo el cuidado, como ellos lo tuvieron, de evitar todo posible contacto del medio con cobre. En un ensayo efectuado no se encontró diferencias aparentes en cuanto a esporulación y desarrollo del organismo cuando se cultivó en 2 medios compuestos de papa-dextrosa-agar, uno preparado con agua destilada que contenía 50 ppm. de

c. Utilizando las proteínas de la hoja, precipitadas con sulfato de amonio.

Estos medios se preparan en 3 concentraciones diferentes, usando 5, 20 y 30 gm. de hoja por litro. Los medios de cada concentración se dividieron en 2 series: una agregándoles dextrosa en la proporción de 20 gm. por litro y otra sin dextrosa. Estos medios se solidificaron con 17 gm. de agar. El sistema para obtener las diferentes partes consistió en cortar el pedazo de hoja y agitarlo en un "Waring Blender" con 500 ml. de agua destilada, durante 3 minutos. Por centrifugación se separaron las partes solubles e insolubles. Para obtener las proteínas se agregó a las partes solubles en agua, sulfato de amonio a razón de 22 gm. por 100 ml. Se dejó el tiempo necesario para que ocurriera la precipitación completa y luego se hizo la separación por centrifugación.

3. También se usó un medio de cultivo similar al de Meredith y Butler (32) descrito anteriormente. Fo se tuvo el cuidado, como ellos lo tuvieron, de evitar todo posible contacto del medio con cobre. En un ensayo efectuado no se encontró diferencias aparentes en cuanto a esporulación y desarrollo del organismo cuando se cultivó en 2 medios compuestos de papa-dextrosa-agar, uno preparado con agua destilada que contenía 50 ppm. de

cobre* y otro preparado con agua redestilada, sin trazas de cobre.

Las inoculaciones se hicieron en algunos casos directamente con conidias naturales y en otros con fragmentos de micelio obtenidos de cultivos en medio artificial. Todos los cultivos se mantuvieron en las condiciones del laboratorio (25-27° C.) en tubos de ensayo con aproximadamente 10 ml. de medio.

Pruebas de patogenicidad.

Con el objeto de determinar la patogenicidad de los cultivos de C. musae, se hicieron varias inoculaciones en plantas de banano en el campo del Instituto. Estas inoculaciones se hicieron por el envés de las hojas y preferiblemente sobre las 3 hojas más nuevas de la planta. El área de inoculación fué de unos 50 $cm^2$. Las aplicaciones de las suspensiones de conidias se hicieron algunas veces con un atomizador de mano y otras con un pincel. Para estas inoculaciones se utilizaron suspensiones conidiales hechas con cultivos originales y subcultivos de 9, 16, 20, 28, 39 y 106 días de incubación, producidos en papa-dextrosa-agar. El cultivo de 106 días presentaba poca

---

*El análisis fué efectuado en el laboratorio del Instituto por María Eugenia Peralta.

cobre* y otro preparado con agua redestilada, sin trazas de cobre.

Las inoculaciones se hicieron en algunos casos directamente con conidias naturales y en otros con fragmentos de micelio obtenidos de cultivos en medio artificial. Todos los cultivos se mantuvieron en las condiciones del laboratorio (25-27° C.) en tubos de ensayo con aproximadamente 10 ml. de medio.

Pruebas de patogenicidad.

Con el objeto de determinar la patogenicidad de los cultivos de C. musae, se hicieron varias inoculaciones en plantas de banano en el campo del Instituto. Estas inoculaciones se hicieron por el envés de las hojas y preferiblemente sobre las 3 hojas más nuevas de la planta. El área de inoculación fué de unos 50 $cm^2$. Las aplicaciones de las suspensiones de conidias se hicieron algunas veces con un atomizador de mano y otras con un pincel. Para estas inoculaciones se utilizaron suspensiones conidiales hechas con cultivos originales y subcultivos de 9, 16, 20, 28, 39 y 106 días de incubación, producidos en papa-dextrosa-agar. El cultivo de 106 días presentaba poca

---

*El análisis fué efectuado en el laboratorio del Instituto por María Eugenia Peralta.

esporulación.

Las conidias se pusieron en suspensión echando un poquito de agua en el tubo con el cultivo y haciendo un suave raspado sobre la superficie de la colonia. Este proceso se repitió 2 o 3 veces en el mismo cultivo, con el fin de obtener la mayor cantidad posible de conidias. La suspensión fué filtrada a través de gaza para separar el micelio desprendido.

Estudios sobre la nutrición de C. musae.

La influencia de ciertas vitaminas, fuentes de carbono y de nitrógeno y de la concentración del ion hidrógeno fué estudiada sobre el crecimiento del hongo en medio de cultivo artificial.

En un ensayo realizado para determinar si el hongo crecía tanto en medio sólido como en líquido, se encontró que este organismo desarrolló mejor en medio líquido. Los estudios subsiguientes, por lo tanto, se realizaron de preferencia en medio líquido, aunque medios sólidos fueron también empleados.

Para la preparación de medios sólidos se utilizó 15 gm. de agar purificado previamente con piridina, según el método descrito por Lilly y Barnett (26).

A través de todo el experimento se usó glucosa-caseína hidrolizada como medio basal, cuya composición es la siguiente:

esporulación.

Las conidias se pusieron en suspensión echando un poquito de agua en el tubo con el cultivo y bacteando un suave raspado sobre la superficie de la colonia. Este proceso se repitió 2 o 3 veces en el mismo cultivo, con el fin de obtener la mayor cantidad posible de conidias. La suspensión fué filtrada a través de gasa para separar el micelio desprendido.

Estudios sobre la nutrición de C. musae.

La influencia de ciertas vitaminas, fuentes de carbono y de nitrógeno y de la concentración del ion hidrógeno fué estudiada sobre el crecimiento del hongo en medio de cultivo artificial.

En un ensayo realizado para determinar si el hongo crecía tanto en medio sólido como en líquido, se encontró que este organismo desarrolló mejor en medio líquido. Los estudios subsiguientes, por lo tanto, se realizaron de preferencia en medio líquido, aunque medios sólidos fueron también empleados.

Para la preparación de medios sólidos se utilizó 1% gm. de agar purificado previamente con piridina, según el método descrito por Hilly y Barnett (26).

A través de todo el experimento se usó glucosa-caseína hidrolizada como medio basal, cuya composición es la siguiente:

| | | |
|---|---|---|
| Glucosa | 25 | gm. |
| Caseína hidrolizada equivalente a | 2 | gm. de caseína |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.5 | gm. |
| $KH_2PO_4$ | 1.0 | gm. |
| Acido fumárico | 1.32 | gm. |
| $Na_2CO_3$ | 1.12 | gm. |
| $Fe^{+++}$ como sulfato | 0.2 | mg. |
| $Zn^{++}$ como sulfato | 0.2 | mg. |
| $Mn^{++}$ como sulfato | 0.2 | mg. |
| Agua destilada hasta hacer | 1 | litro |

Lo primero que se hizo fué determinar si el C. musae era o no deficiente en vitaminas. Para esto se usó tanto medio líquido como sólido. En estos estudios, efectos de diferentes concentraciones de tiamina y del pH, la caseína hidrolizada empleada fué GBI, libre de vitaminas. En los demás casos se usó caseína en polvo "Stuard". Los otros ingredientes empleados fueron químicamente puros.

Con excepción del estudio sobre deficiencia de vitaminas, para el cual se usó como inóculo un aislamiento diferente, en todos los demás estudios se empleó un mismo aislamiento, cultivado originalmente en papa-dextrosa-agar y mantenido en este mismo medio por transferencias periódicas de fragmentos de micelio. El cultivo se conservó estable en todas sus características a través de

| | | |
|---|---|---|
| Glucosa | 25 | gm. |
| Caseína hidrolizada equivalente a | 2 | gm. de caseína |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.5 | gm. |
| $KH_2PO_4$ | 1.0 | gm. |
| Acido fumárico | 1.32 | gm. |
| $Na_2CO_3$ | 1.12 | gm. |
| Fe+++ como sulfato | 0.2 | mg. |
| Zn++ como sulfato | 0.2 | mg. |
| Mn++ como sulfato | 0.2 | mg. |
| Agua destilada hasta hacer | 1 | litro |

Lo primero que se hizo fué determinar si el C. musae era o no deficiente en vitaminas. Para esto se usó tanto medio líquido como sólido. En estos estudios, efectos de diferentes concentraciones de tiamina y del pH, la caseína hidrolizada empleada fué CEI, libre de vitaminas. En los demás casos se usó caseína en polvo "Stuard". Los otros ingredientes empleados fueron químicamente puros.

Con excepción del estudio sobre deficiencia de vitaminas, para el cual se usó como inóculo un aislamiento diferente, en todos los demás estudios se empleó un mismo aislamiento, cultivado originalmente en psps-dextrosa-agar y mantenido en este mismo medio por transferencias periódicas de fragmentos de micelio. El cultivo se conservó estable en todas sus características a través de

las sucesivas transferencias. A menos que se haga notar lo contrario, siempre se usó como inóculo fragmentos de micelio no esporulados.

Toda la cristalería utilizada se lavó primero con una solución de bicromato de potasio y ácido sulfúrico, luego repetidas veces con agua corriente y, por último, con auga destilada.

El hongo se cultivó en 25 ml. de medio líquido en frascos Erlenmeyer Pyrex de 125 ml. Cuando se usó medio sólido se cultivó en 10 ml. de medio en tubos de ensayo Pyrex. En el primer caso el pH del medio se ajustó, antes de esterilizar, al nivel decidido por medio del potenciómetro Beckman, con electrodos de vidrio y calomel y en el segundo caso colorimetricamente, de acuerdo con el método descrito por Riker & Riker (37). En ambos casos el ajuste se hizo agregando una solución normal de KOH.

Con excepción del estudio sobre utilización de vitaminas, en donde el pH del medio fué de 6.5, en todos los demás el medio tuvo un pH de 5.5. Este nivel de acidez demostró ser el mejor para el desarrollo vegetativo del hongo.

La esterilización del medio se hizo siempre a 15 lbs. de presión durante 15 minutos, después de su preparación completa y distribución en los recipientes empleados.

las sucesivas transferencias. A menos que se haga notar lo contrario, siempre se usó como inóculo fragmentos de micelio no esporulados.

Toda la cristalería utilizada se lavó primero con una solución de bicromato de potasio y ácido sulfúrico, luego repetidas veces con agua corriente y, por último, con agua destilada.

El hongo se cultivó en 25 ml. de medio líquido en frascos Erlenmeyer Pyrex de 125 ml. Cuando se usó medio sólido se cultivó en 10 ml. de medio en tubos de ensayo Pyrex. En el primer caso el pH del medio se ajustó, antes de esterilizar, al nivel deseado por medio del potenciómetro Beckman, con electrodos de vidrio y calomel y en el segundo caso colorimétricamente, de acuerdo con el método descrito por Riker & Riker (37). En ambos casos el ajuste se hizo agregando una solución normal de KOH.

Con excepción del estudio sobre utilización de vitaminas, en donde el pH del medio fué de 6.5, en todos los demás el medio tuvo un pH de 5.5. Este nivel de acidez demostró ser el mejor para el desarrollo vegetativo del hongo.

La esterilización del medio se hizo siempre a 15 lbs. de presión durante 15 minutos, después de su preparación completa y distribución en los recipientes empleados.

A càusa del lento desarrollo del hongo en medio artificial, los cultivos se mantuvieron en incubación de 30 a 36 días en las condiciones del laboratorio, antes de tomar el dato final. En los casos en que se tomaron datos a determinados períodos de incubación, el primero de ellos fué tomado a los 12 días después de las inoculaciones, fecha en la cual el hongo ya había hecho algún desarrollo. Los demás datos fueron tomados a los 18, 24, 30 y 36 días de incubación.

La cantidad de crecimiento fué determinada en base al peso seco del micelio. Cuando se usó medio líquido, el micelio fué recogido y lavado repetidas veces con agua destilada, en papel de filtro N° 1 de 11 cm. de diámetro, previamente secado y tarado, y puesto a secar a 60° C. durante 24 horas. Cuando se usó medio sólido, se emplearon frascos pesadores y secados a 95-100° C. durante toda la noche.

El método de tomar datos de crecimiento en base al peso seco del micelio en medio sólido no está muy generalizado por la dificultad que ofrecen ciertos hongos para separarlos totalmente del medio. Sin embargo, el C. musae puede separarse facilmente del medio por la forma compacta como crece. Una vez cosechada la colonia, se lavó con agua caliente para separar los restos de agar que quedaron adheridos.

A causa del lento desarrollo del hongo en medio artificial, los cultivos se mantuvieron en incubación de 30 a 36 días en las condiciones del laboratorio, antes de tomar el dato final. En los casos en que se tomaron datos a determinados períodos de incubación, el primero de ellos fue tomado a los 12 días después de las inoculaciones, fecha en la cual el hongo ya había hecho algún desarrollo. Los demás datos fueron tomados a los 18, 24, 30 y 36 días de incubación.

La cantidad de crecimiento fue determinada en base al peso seco del micelio. Cuando se usó medio líquido, el micelio fue recogido y lavado repetidas veces con agua destilada, en papel de filtro N° 1 de 11 cm. de diámetro, previamente secado y tarado, y puesto a secar a 60° C. durante 24 horas. Cuando se usó medio sólido, se emplearon trozos pesados y secados a 95-100° C. durante toda la noche.

El método de tomar datos de crecimiento en base al peso seco del micelio en medio sólido no está muy generalizado por la dificultad que ofrecen ciertos hongos para separarlos totalmente del medio. Sin embargo, el C. murale puede separarse fácilmente del medio por la forma compacta como crece. Una vez cosechada la colonia, se lavó con agua caliente para separar los restos de agar que quedaron adheridos.

En los estudios sobre efectos de diferentes fuentes de carbono, de nitrógeno y del pH, se incluyó tiamina y biotina en el medio de cultivo, ya que estas vitaminas fueron esenciales para un buen desarrollo del hongo.

## RESULTADOS EXPERIMENTALES

### Características culturales.

Generalmente, el crecimiento de C. musae fué lento en todos los medios de cultivos empleados. Colonias originadas de conidias empezaron a desarrollar a los 3 o 4 días de incubación. A partir de este tiempo, sin embargo, el hongo se desarrolló más rapidamente en papa-dextrosa-agar que en los otros medios y presentó 2 tipos de crecimiento: aéreo y sumergido. Desde un principio la colonia crece adherida al medio y en forma compacta. Luego va profundizándose hasta llegar a cubrir todo el espesor del medio. La topografía de la colonia es generalmente ondulante y al ir profundizándose fractura al medio a su alrededor. La parte aérea de la colonia se recubre de un fino micelio de color grisaceo al principio, tornándose más tarde blanquecino y por último rosaceo. En cultivos jóvenes generalmente el medio alrededor de la colonia se torna amarillento, y en cultivos viejos el substratum se vuelve completamente negro.

En los estudios sobre efectos de diferentes fuentes de carbono, de nitrógeno y del pH, se incluyó tiamina y biotina en el medio de cultivo, ya que estas vitaminas fueron esenciales para un buen desarrollo del hongo.

## RESULTADOS EXPERIMENTALES

### Características culturales.

Generalmente, el crecimiento de C. musae fue lento en todos los medios de cultivos empleados. Colonias originadas de conidias empezaron a desarrollar a los 3 o 4 días de incubación. A partir de este tiempo, sin embargo, el hongo se desarrolló más rapidamente en papa-dextrosa-agar que en los otros medios y presentó 2 tipos de crecimiento: aéreo y sumergido. Desde un principio la colonia crece aplanada al medio y en forma compacta. Luego va profundizándose hasta llegar a cubrir todo el espesor del medio. La topografía de la colonia es generalmente ondulante y al ir profundizándose fractura al medio a su alrededor. La parte aérea de la colonia se recubre de un fino micelio de color grisaceo al principio, tornándose más tarde blanquecino y por último rosaceo. En cultivos jóvenes generalmente el medio alrededor de la colonia se torna amarillento, y en cultivos viejos el substratum se vuelve completamente negro.

En los medios preparados con las partes solubles e insolubles de la hoja de banano la colonia fué floja, plana y extendida y profundizó un poco en el medio en forma ramificada. No hubo, como en papa-dextrosa-agar, un crecimiento aéreo notable. El crecimiento en el medio con las proteínas fué semejante al crecimiento adquirido en papa-dextrosa-agar en cuanto al desarrollo compacto y ondulante de la colonia, pero de color negro y sin micelio superficial. En todos los casos, el mejor desarrollo ocurrió en el medio preparado con las partes insolubles.

Producción de conidias.

En ningún caso hubo producción de conidias cuando se usaron 30 gm. de hoja en el medio. Cuando se usaron 20 gm. hubo producción de conidias a los 5 días de incubación, en el medio preparado con las partes insolubles, pero dejó de esporular por completo a los 12 días. En el medio con las partes solubles sólo 1 de 10 cultivos produjo pocas conidias a los 7 días de incubación. En el medio preparado con las proteínas no hubo formación de conidias. Cuando se usaron 5 gm. de hoja, sólo hubo limitada producción de conidias, a los 7 días de incubación en el medio con las partes insolubles. En el medio preparado según la fórmula de Meredith y Butler (32) también se obtuvo producción de conidias.

En los medios preparados con las partes solubles e insolubles de la hoja de banano la colonia fue floja, plana y extendida y profundizó un poco en el medio en forma ramificada. No hubo, como en papa-dextrosa-agar, un crecimiento aéreo notable. El crecimiento en el medio con las proteínas fue semejante al crecimiento adquirido en papa-dextrosa-agar en cuanto al desarrollo compacto y ondulante de la colonia, pero de color negro y sin micelio superficial. En todos los casos, el mejor desarrollo ocurrió en el medio preparado con las partes insolubles.

Producción de conidias.

En ningún caso hubo producción de conidias cuando se usaron 30 gm. de hoja en el medio. Cuando se usaron 20 gm. hubo producción de conidias a los 5 días de incubación, en el medio preparado con las partes insolubles, pero dejó de esporular por completo a los 12 días. En el medio con las partes solubles sólo 1 de 10 cultivos produjo pocas conidias a los 7 días de incubación. En el medio preparado con las proteínas no hubo formación de conidias. Cuando se usaron 5 gm. de hoja, sólo hubo litrada producción de conidias, a los 7 días de incubación en el medio con las partes insolubles. En el medio preparado según la fórmula de Meredith y Butler (32) también se obtuvo producción de conidias.

El medio más satisfactorio para la producción de conidias fué el de papa-dextrosa-agar. Siempre se obtuvo intensa esporulación. En observaciones hechas diariamente sobre 10 cultivos, durante 35 días, se notó que el hongo comienza a esporular a los 6 o 7 días de incubación. A este tiempo la colonia es aún demasiado pequeña y por tanto la cantidad de conidias producidas es limitada. A medida que el hongo va desarrollando más superficie, hay un aumento considerable en la producción de conidias. Sin embargo, esta esporulación no es continua: alcanza un máximo, comienza a decrecer progresivamente hasta dejar de esporular completamente por 2 o 3 días, luego recupera progresivamente la capacidad original, vuelve a decrecer y así sucesivamente hasta cuando el cultivo es demasiado viejo.

En todos estos medios se observó frecuentemente la formación de cuerpos globulares sin fructificación alguna, los que han sido considerados por otros investigadores (3, 40, 43) como picnidios o estructuras periteciales inmaturas.

Influencia de la dextrosa sobre la esporulación.

Con el objeto de conocer la posible influencia de la dextrosa sobre el desarrollo y esporulación de C. musae se prepararon 4 medios en los cuales la papa y el agar se

El medio más satisfactorio para la producción de conidias fué el de papa-dextrosa-agar. Siempre se obtuvo intensa esporulación. En observaciones hechas diariamente sobre 10 cultivos, durante 35 días, se notó que el hongo comienza a esporular a los 6 o 7 días de incubación. A este tiempo la colonia es aún demasiado pequeña y por tanto la cantidad de conidias producidas es limitada. A medida que el hongo va desarrollando más superficie, hay un aumento considerable en la producción de conidias. Sin embargo, esta esporulación no es continua: alcanza un máximo, comienza a decrecer progresivamente hasta dejar de esporular completamente por 2 o 3 días. Luego recupera progresivamente la capacidad original, vuelve a decrecer y así sucesivamente hasta cuando el cultivo es demasiado viejo.

En todos estos medios se observó frecuentemente la formación de cuerpos globulares sin fructificación alguna, los que han sido considerados por otros investigadores (3, 40, 43) como picnidios o estructuras pertecciales inmaturas.

<u>Influencia de la dextrosa sobre la esporulación.</u>

Con el objeto de conocer la posible influencia de la dextrosa sobre el desarrollo y esporulación de C. musae se prepararon 4 medios en los cuales la papa y el agar se

mantuvieron constantes y se varió la concentración de dextrosa en la siguiente forma: 0, 1, 15 y 30 gm. por litro.

Se inocularon con conidias naturales 5 cultivos de cada condición y se hicieron 5 observaciones microscópicas a intervalos de 2 días. A los 10 días de incubación todos los cultivos en los medios con 0 y 1 gm. de dextrosa estaban esporulados. A los 12 días, en el primero de los medios, el hongo bajó notablemente su producción de conidias, y dejó de esporular por completo a los 14 días. En el segundo de los medios, a los 12 días el hongo siguió esporulando en igual forma que a los 10; en adelante, fué decreciendo su esporulación hasta perderla por completo a los 16 días. De los 5 cultivos hechos en el medio que contenía 15 gm. de dextrosa, 4 esporularon bastante, sólo una vez en las observaciones hechas; en las demás la esporulación fué insignificante. Con 30 gm. de dextrosa, la esporulación, si alguna, fué muy baja.

El desarrollo vegetativo fué aparentemente proporcional al contenido de dextrosa. En los medios con 0 y 1 gm. el crecimiento micelial fué muy escaso mientras que con 15 y 30 gm. de dextrosa fué abundante.

Mantenimiento de los cultivos en esporulación.

Se observó que cultivos originados de conidias

mantuvieron constantes y se varió la concentración de dextrosa en la siguiente forma: 0, 1, 15 y 30 gm. por litro.

Se inocularon con conidias naturales y cultivos de cada condición y se hicieron 5 observaciones microscópicas a intervalos de 2 días. A los 10 días de incubación todos los cultivos en los medios con 0 y 1 gm. de dextrosa estaban esporulados. A los 12 días, en el primero de los medios, el hongo bajó notablemente su producción de conidias, y dejó de esporular por completo a los 14 días. En el segundo de los medios, a los 12 días el hongo siguió esporulando en igual forma que a los 10; en adelante, fué decreciendo su esporulación hasta perderla por completo a los 16 días. De los 5 cultivos hechos en el medio que contenía 15 gm. de dextrosa, 4 esporularon bastante, sólo una vez en las observaciones hechas; en los demás la esporulación fué insignificante. Con 30 gm. de dextrosa, la esporulación, si algun, fué muy baja.

El desarrollo vegetativo fué aparentemente proporcional al contenido de dextrosa. En los medios con 0 y 1 gm. el crecimiento micelial fué muy escaso mientras que con 15 y 30 gm. de dextrosa fué abundante.

<u>Mantenimiento de los cultivos en esporulación.</u>

Se observó que cultivos originados de conidias

naturales que habían dejado de esporular, volvían a producir conidias intensamente al transferir fragmentos de su micelio a nuevo medio de papa-dextrosa-agar (20 gm. de dextrosa). Sin embargo, segundas transferencias de micelio de estos cultivos, presentaban muy poca o ninguna esporulación.

Una intensa esporulación se consiguió mantener en cultivos hasta 12 generaciones, mediante sucesivas transferencias de micelio con conidias a nuevo medio de papa-dextrosa-agar, entre 7 a 14 días de intervalo. Esto se constató haciendo inspecciones diarias de estos cultivos al microscopio, entre los primeros 7 y 14 días de incubación. Una vez observada alta esporulación, se hizo un suave raspado sobre la colonia, desprendiendo por este método esporas y micelio con los que se inoculó al nuevo medio en varios puntos. Con esto se logró mayor y más rápido desarrollo y a los 7 días se obtuvo una colonia relativamente grande.

Las inoculaciones se hicieron con 2 aislamientos diferentes, cada uno con 5 repeticiones, durante 12 generaciones, y en todas ellas el hongo esporuló intensamente. La esporulación de esta serie de aislamientos ocurrió en el lapso de 7 a 14 días. Dentro del mismo cultivo, en ocasiones, había partes de la colonia altamente esporuladas y otras que permanecían sin esporular.

naturales que habían dejado de esporular, volvían a producir conidias intensamente al transferir fragmentos de su micelio a nuevo medio de papa-dextrosa-agar (20 gm. de dextrosa). Sin embargo, segundas transferencias de micelio de estos cultivos, presentaban muy poca o ninguna esporulación.

Una intensa esporulación se consiguió mantener en cultivos hasta 12 generaciones, mediante sucesivas transferencias de micelio con conidias a nuevo medio de papa-dextrosa-agar, entre 7 a 14 días de intervalo. Esto se constató haciendo inspecciones diarias de estos cultivos al microscopio, entre los primeros 7 y 14 días de incubación. Una vez observada alta esporulación, se hizo un suave raspado sobre la colonia, desprendiendo por este método esporas y micelio con los que se inoculó al nuevo medio en varios puntos. Con esto se logró mayor y más rápido desarrollo y a los 7 días se obtuvo una colonia relativamente grande.

Las inoculaciones se hicieron con 2 aislamientos diferentes, cada uno con 5 repeticiones, durante 12 generaciones, y en todas ellas el hongo esporuló intensamente. La esporulación de esta serie de aislamientos ocurrió en el lapso de 7 a 14 días. Dentro del mismo cultivo, en ocasiones, hasta partes de la colonia altamente esporuladas y otras que permanecían sin esporular.

Inoculaciones efectuadas en el campo con conidias hasta la novena generación reprodujeron los síntomas de la enfermedad.

Inoculaciones artificiales.

Con excepción de las inoculaciones hechas con conidias obtenidas en el cultivo de 106 días de incubación, las demás reprodujeron los síntomas característicos de la enfermedad (Fig. 1). El período transcurrido desde la aplicación de las conidias hasta la aparición de los síntomas primarios de la enfermedad fué variable, tanto en las inoculaciones hechas en diferentes fechas, como en las del mismo día y en las de la misma hoja. Los períodos observados fueron de 18, 20, 24, 30, 42 y 50 días. El patógeno fué reaislado de muchas de las inoculaciones hechas.

Varios cultivos puros de C. musae obtenidos directamente de conidias naturales y subcultivos de primera transferencia, ambos de diferentes edades, fueron enviados al personal de la Shell Oil Co., Agricultural Research Laboratories. Estos cultivos fueron recibidos en condiciones altamente esporulados (sporulating freely) y la identidad del organismo fué confirmada. Hicieron algunas inoculaciones preliminares en plantas de banano en el invernadero e iban a comenzar ensayos in vitro para probar

Inoculaciones efectuadas en el campo con conidias hasta la novena generación reproducieron los síntomas de la enfermedad.

Inoculaciones artificiales.

Con excepción de las inoculaciones hechas con conidias obtenidas en el cultivo de 106 días de incubación, las demás reprodujeron los síntomas característicos de la enfermedad (Fig. 1). El período transcurrido desde la aplicación de las conidias hasta la aparición de los síntomas primarios de la enfermedad fué variable, tanto en las inoculaciones hechas en diferentes fechas, como en las del mismo día y en las de la misma hoja. Los períodos observados fueron de 18, 20, 24, 30, 42 y 50 días. El patógeno fué reaislado de muchas de las inoculaciones hechas.

Varios cultivos puros de C. musae obtenidos directamente de conidias naturales y subcultivos de primera transferencia, ambos de diferentes edades, fueron enviados al personal de la Shell Oil Co., Agricultural Research Laboratories. Estos cultivos fueron recibidos en condiciones algamente esporulados (sporulating freely) y la identidad del organismo fué confirmada. Hicieron algunas inoculaciones preliminares en plantas de banano en el invernadero e iban a comenzar ensayos in vitro para probar

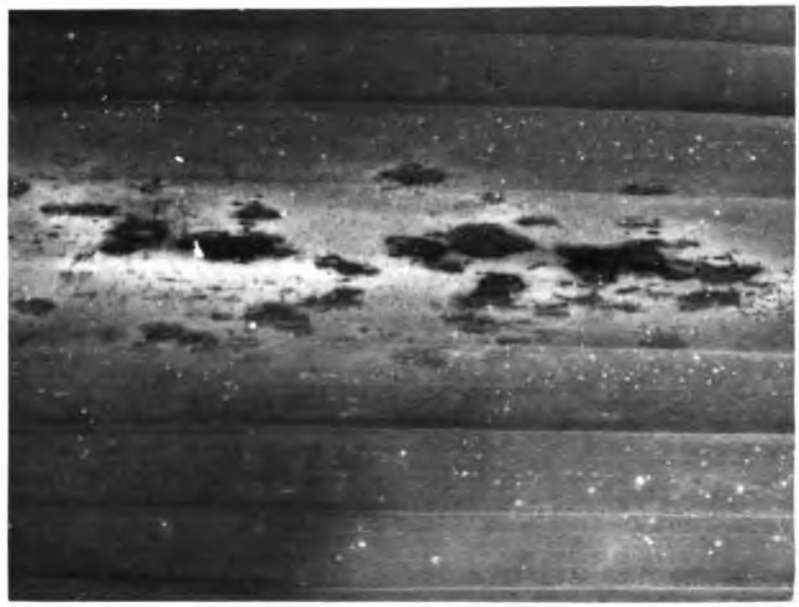


Fig. 1. Sintomas de la "Sigatoka" causados por conidias artificiales de Cercospora musae producidas en papa-dextrosa-agar.

Fig. 1. Síntomas de la "Sigatoka" causados por conidias artificiales de Cercospora musae producidas en papa-dextrosa-agar.

algunos de sus mejores fungicidas (9).

Utilización de vitaminas.

Ensayos exploratorios se realizaron con las 4 vitaminas más comunmente utilizadas por los hongos: tiamina ($B_1$), piridoxina ($B_6$), biotina (vitamina H) e inositol, para determinar si el C. musae del banano era deficiente en algunas de éstas. Biotina cristalina fué obtenido en ampollas de 1 ml. con 25 gamma de esta vitamina. Las demás vitaminas fueron productos de la compañía "Eastman". Las 2 primeras se agregaron en la proporción de 100 microgramos por litro y las otras 2 en la proporción de 5 microgramos y 5 mg. por litro de medio, respectivamente. Se hicieron 7 tratamientos que incluyeron las 4 vitaminas por separado, tiamina y biotina en combinación, las 4 vitaminas juntas, y un testigo que consistió del medio basal libre de vitaminas. Se inocularon 24 frascos Erlenmeyer de cada tratamiento. Después de 12, 18, 24, 30, y 36 días de incubación se cosecharon 4 cultivos por separado de cada tratamiento y se obtuvo el peso seco del micelio. Cada punto de las curvas de crecimiento (Fig. 2) representa el peso seco promedio de estos 4 cultivos cosechados al mismo tiempo.

En todos los casos el desarrollo inicial fué lento. Sólo a los 4 días de incubación el hongo comenzó a crecer

algunos de sus mejores fungicidas (9).

Utilización de vitaminas.

Ensayos exploratorios se realizaron con las 4 vitaminas más comunmente utilizadas por los hongos: tiamina ($B^1$), piridoxina ($B^6$), biotina (vitamina H) e inositol, para determinar si el C. musae del banano era deficiente en algunas de éstas. Biotina cristalina fué obtenido en ampollas de 1 ml. con 25 gamma de esta vitamina. Las demás vitaminas fueron productos de la compañía "Eastman". Las 2 primeras se agregaron en la proporción de 100 microgramos por litro y las otras 2 en la proporción de 5 mi-crogramos y 5 mg. por litro de medio, respectivamente. Se dieron 7 tratamientos que incluyeron las 4 vitaminas por separado, tiamina y biotina en combinación, las 4 vitaminas juntas, y un testigo que consistió del medio basal libre de vitaminas. Se inocularon 24 frascos Erlenmeyer de cada tratamiento. Después de 12, 18, 24, 30, y 36 días de incubación se cosecharon 4 cultivos por separado de cada tratamiento y se obtuvo el peso seco del micelio. Cada punto de las curvas de crecimiento (Fig. 2) representa el peso seco promedio de estos 4 cultivos cosechados al mismo tiempo.

En todos los casos el desarrollo inicial fué lento. Solo a los 4 días de incubación el hongo comenzó a crecer

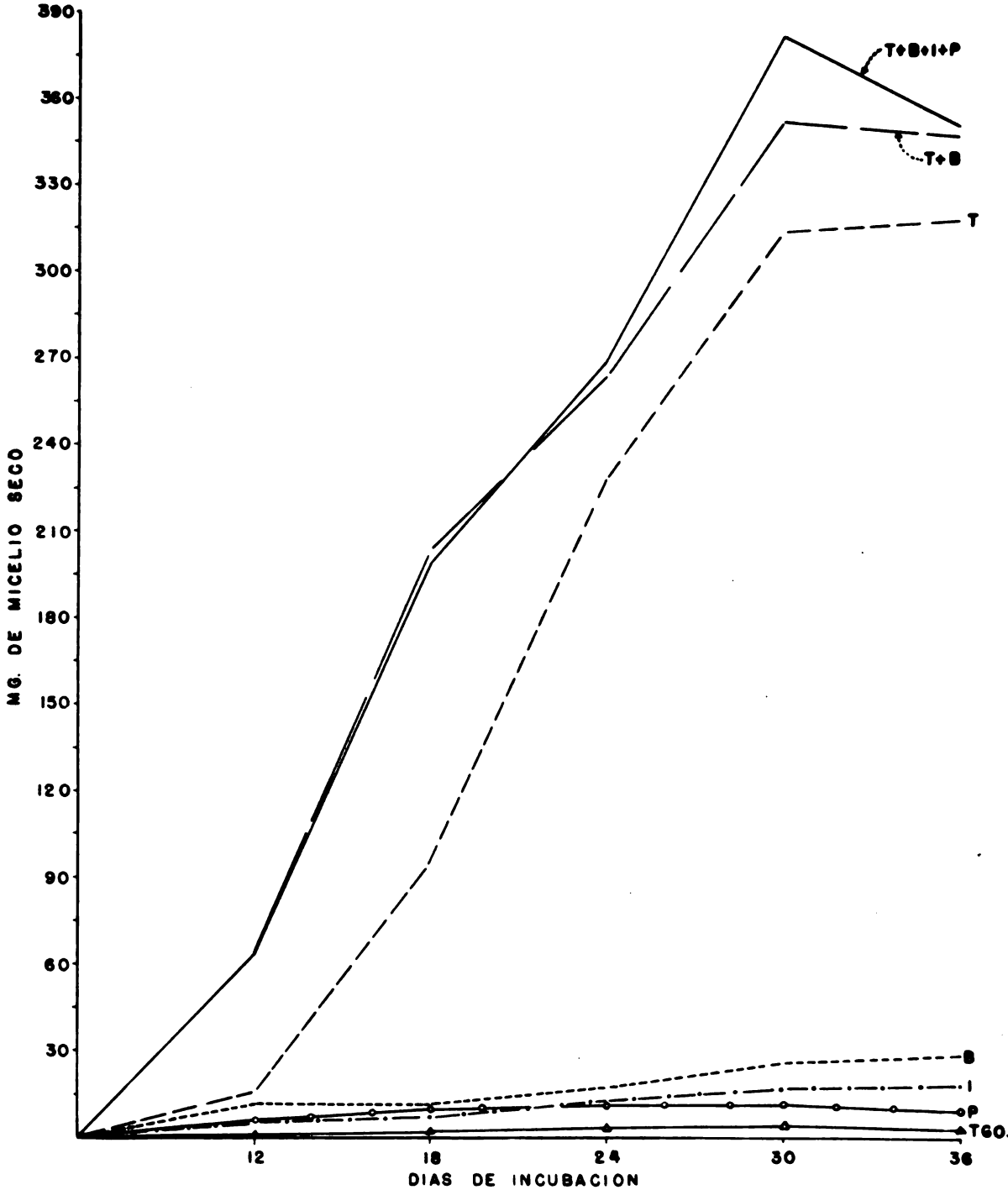



FIG. 2. CRECIMIENTO DE CERCOSPORA MUSAE EN MEDIO LIQUIDO GLUCOSA-CASEINA HIDROLIZADA Y VITAMINAS. T = TIAMINA, B = BIOTINA, I = INOSITOL, P = PIRIDOXINA Y TGO. = TESTIGO

y continuó aumentando, especialmente en los tratamientos con tiamina, tiamina y biotina en combinación y las 4 vitaminas juntas. El hongo creció levemente en el testigo (3.9 mg. de micelio seco). Sin embargo, este desarrollo puede atribuirse a posibles impurezas del medio de cultivo o a alguna vitamina contenida en el inóculo, más bien que a bajo poder del hongo para sintetizar alguna vitamina. El crecimiento en presencia de piridoxina, inositol y biotina solas, fué escaso. El crecimiento en el medio con tiamina sola fué bueno. Mayor y más rápido crecimiento ocurrió en presencia de tiamina y biotina en combinación. En presencia de las 4 vitaminas juntas, sólo hubo una pequeña diferencia de peso a los 30 días de incubación, con respecto al medio con tiamina y biotina en combinación. En los demás períodos la rata y cantidad de crecimiento se mantuvieron parejas. Esto indicó que la presencia de piridoxina e inositol en el medio tuvo muy poco efecto sobre el desarrollo. Los resultados descritos indicaron que el hongo es deficiente en las 4 vitaminas ensayadas, siendo mayores las necesidades de tiamina y biotina y, en especial, de tiamina.

En los tratamientos sin tiamina, pero con biotina, piridoxina o inositol, el poco desarrollo que hizo el hongo fué totalmente sumergido y formado por pequeñas masas de micelio. La adición de tiamina al medio indujo

masas de micelio. La adición de tiamina al medio indujo
hongo fué totalmente sumergido y formado por pequeñas
piridoxina o inositol, el poco desarrollo que hizo el
hongo fué totalmente sumergido y formado por pequeñas
masas de micelio. La adición de tiamina al medio indujo

siendo mayores las necesidades de tiamina y biotina y, en
que el hongo es deficiente en las 4 vitaminas ensayadas,
siendo mayores las necesidades de tiamina y biotina y, en

pre el desarrollo. Los resultados descritos indicaron
ridoxina e inositol en el medio tuvo muy poco efecto so-
pre el desarrollo. Los resultados descritos indicaron

mantuvieron pareias. Esto indicó que la presencia de pi-
mantuvieron pareias. Esto indicó que la presencia de pi-

En los demás períodos la raíz y cantidad de crecimiento se
con respecto al medio con tiamina y biotina en combinación.
En los demás períodos la raíz y cantidad de crecimiento se

pequeña diferencia de peso a los 30 días de incubación,
con respecto al medio con tiamina y biotina en combinación.
pequeña diferencia de peso a los 30 días de incubación,

En presencia de las 4 vitaminas juntas, sólo hubo una
ocurrió en presencia de tiamina y biotina en combinación.
En presencia de las 4 vitaminas juntas, sólo hubo una

tiamina sola fué bueno. Mayor y más rápido crecimiento
tiamina sola fué bueno. Mayor y más rápido crecimiento

tina sola, fué escaso. El crecimiento en el medio con
tina sola, fué escaso. El crecimiento en el medio con

El crecimiento en presencia de piridoxina, inositol y bio-
El crecimiento en presencia de piridoxina, inositol y bio-

a baio poder del hongo para sintetizar algunas vitaminas.
a bajo poder del hongo para sintetizar algunas vitaminas.

o a algunas vitaminas contenida en el inóculo, más bien que
puede atribuirse a posibles impurezas del medio de cultivo
o a algunas vitaminas contenida en el inóculo, más bien que

(3.9 mg. de micelio seco). Sin embargo, este desarrollo
puede atribuirse a posibles impurezas del medio de cultivo
(3.9 mg. de micelio seco). Sin embargo, este desarrollo

tamina juntas. El hongo creció levemente en el testigo
con tiamina, tiamina y biotina en combinación y las 4 vi-
tamina juntas. El hongo creció levemente en el testigo

y continuó aumentando, especialmente en los tratamientos
y continuó aumentando, especialmente en los tratamientos

un abundante desarrollo de micelio aéreo que constituyó la casi totalidad de las colonias. Estas colonias fueron de diferentes tamaños, de forma irregular, de topografía ondulante, y en la mayoría de los casos, con un espesor que alcanzó la profundidad del medio de cultivo (Fig. 3). El color del medio permaneció casi inalterable hasta el final del experimento en los tratamientos sin tiamina. En los tratamientos con tiamina el color del medio cambió gradualmente con el crecimiento hasta llegar a ser obscuro.

Con el propósito de conocer la relación entre el desarrollo adquirido por el hongo y los cambios de pH producidos en el medio de cultivo, a cada período de incubación en que el micelio fué cosechado se tomó el pH de los 4 respectivos cultivos de cada tratamiento. En los medios sin tiamina, los cambios de pH fueron muy leves. La mayor variación, de un pH 6.5 a 6.1, ocurrió en el medio con biotina. Los cambios de pH producidos en los medios que contuvieron tiamina, fueron mayores que los que ocurrieron en los otros tratamientos (Fig. 4). Comparando las figuras 2 y 4 se puede ver claramente la estrecha correlación que hubo entre el cambio de pH y la rata y cantidad de crecimiento.

Los mismos tratamientos anteriores en medio líquido también se hicieron en medio sólido. A los 36 días de incubación se obtuvo el promedio del peso seco del micelio,

un abundante desarrollo de micelio aéreo que constituyó la casi totalidad de las colonias. Estas colonias fueron de diferentes tamaños, de forma irregular, de topografía ondulante, y en la mayoría de los casos, con un espesor que alcanzó la profundidad del medio de cultivo (Fig. 3). El color del medio permaneció casi inalterable hasta el final del experimento en los tratamientos sin tiamina. En los tratamientos con tiamina el color del medio cambió gradualmente con el crecimiento hasta llegar a ser obscuro.

Con el propósito de conocer la relación entre el desarrollo adquirido por el hongo y los cambios de pH producidos en el medio de cultivo, a cada período de incubación en que el micelio fué cosechado se tomó el pH de los 4 respectivos cultivos de cada tratamiento. En los medios sin tiamina, los cambios de pH fueron muy leves. La mayor variación, de un pH 6.2 a 6.1, ocurrió en el medio con biotina. Los cambios de pH producidos en los medios que contuvieron tiamina, fueron mayores que los que ocurrieron en los otros tratamientos (Fig. 4). Comparando las figuras 3 y 4 se puede ver claramente la estrecha correlación que hubo entre el cambio de pH y la rata y cantidad de crecimiento.

Los mismos tratamientos anteriores en medio líquido también se hicieron en medio sólido. A los 36 días de incubación se obtuvo el promedio del peso seco del micelio,

Fig. 3. Crecimiento de Cercospora musae en medio líquido glucosa-caseína hidrolizada y vitaminas. A) Piridoxina, B) Biotina, C) Tiamina, D) Inositol, E) Tiamina y Biotina en combinación, F) Las 4 vitaminas juntas, y G) Medio basal sin vitaminas.

Fig. 3. Crecimiento de Cercospora musae en medio líquido glucosa-caseína hidrolizada y vitaminas. A) Piridoxina, B) Biotina, C) Tiamina, D) Inositol, E) Tiamina y biotina en combinación, F) Las 4 vitaminas juntas, y G) Medio basal sin vitaminas.

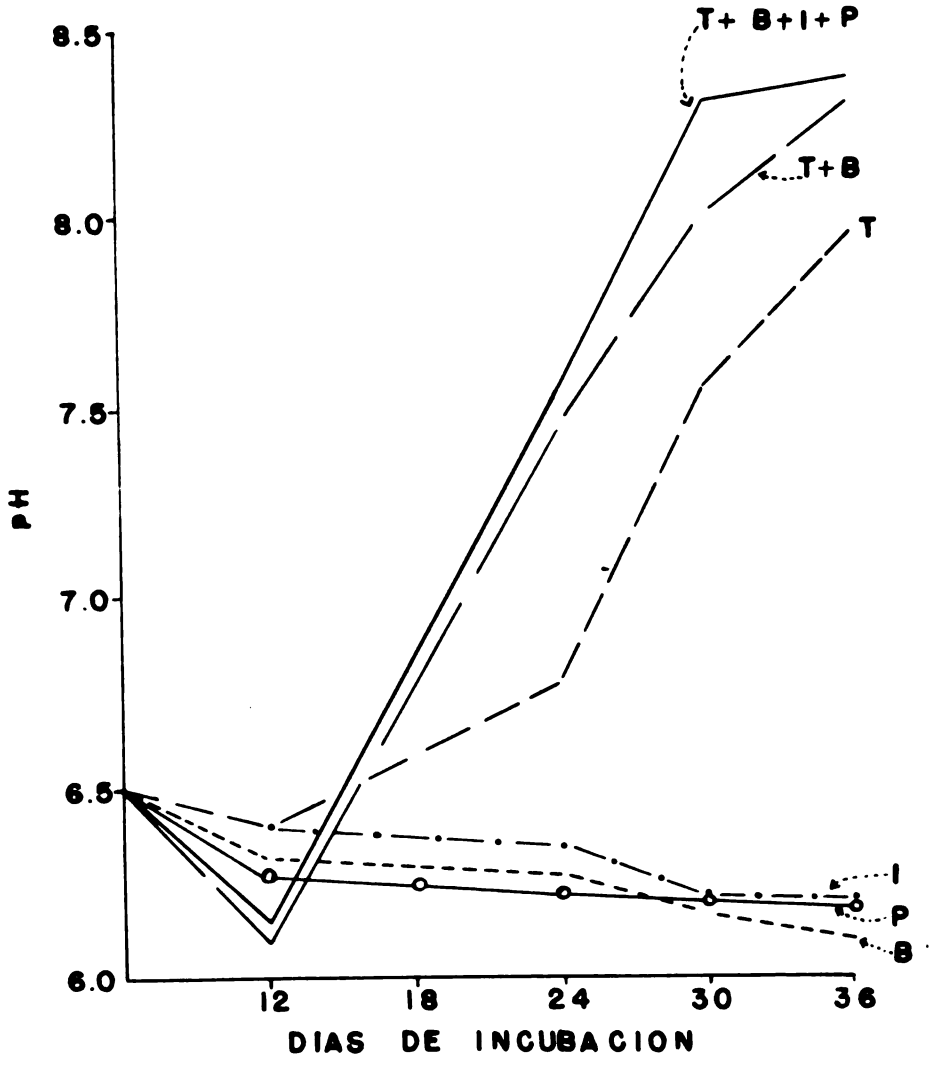



FIG. 4. CAMBIOS DE pH EN MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO GLUCOSA-CASEINA HIDROLIZADA Y VITAMINAS, DURANTE LA INCUBACION DE CERCOSPORA MUSAE. T = TIAMINA, B=BIOTINA, I=NOSITOL, P=PIRIDOXINA.

de acuerdo con el método descrito en materiales y métodos, de 5 cultivos de cada tratamiento. La rata y cantidad de crecimiento fueron inferiores a los de medio líquido. Sin embargo, los resultados obtenidos (Tabla 1) confirman los resultados obtenidos en medio líquido en cuanto a la forma de utilización de las diferentes vitaminas y combinaciones ensayadas y soportan las mismas observaciones hechas anteriormente en cuanto a las necesidades del organismo de dichas vitaminas.

En ninguno de estos tratamientos esporuló el hongo.

Efectos de la aireación.

El método de cultivos en agitación ha sido muy empleado para aumentar la cantidad de aire en el medio de cultivo. Este método no sólo aumenta la cantidad de aire en el líquido, sino que también asegura un suministro de nutrientes y de oxígeno más uniforme para todo el organismo y permite una mejor remoción de los productos gaseosos desprendidos, que los cultivos en reposo (44).

Para determinar si la mejor aireación del medio de cultivo tenía algún efecto favorable sobre la rata y cantidad de crecimiento de C. musae, se hizo un experimento en medios con tiamina sola, tiamina y biotina en combinación, y un testigo sin vitaminas. Dos frascos Erlenmeyer de cada tratamiento fueron agitados continuamente durante

de acuerdo con el método descrito en materiales y métodos, de 5 cultivos de cada tratamiento. La raíz y cantidad de crecimiento fueron inferiores a los de medio líquido. Sin embargo, los resultados obtenidos (Tabla I) confirman los resultados obtenidos en medio líquido en cuanto a la forma de utilización de las diferentes vitaminas y combinaciones ensayadas y aportan las mismas observaciones hechas anteriormente en cuanto a las necesidades del organismo de dichas vitaminas.

En ninguno de estos tratamientos esporuló el hongo.

Efecto de la aireación.

El método de cultivos en agitación ha sido muy empleado para aumentar la cantidad de aire en el medio de cultivo. Este método no sólo aumenta la cantidad de aire en el líquido, sino que también asegura un suministro de nutrientes y de oxígeno más uniforme para todo el organismo y permite una mejor remoción de los productos gaseosos desprendidos, que los cultivos en reposo (44).

Para determinar si la mejor aireación del medio de cultivo tenía algún efecto favorable sobre la raíz y cantidad de crecimiento de C. <u>musae</u>, se hizo un experimento en medios con tiamina sola, tiamina y biotina en combinación, y un testigo sin vitaminas. Dos frascos Erlenmeyer de cada tratamiento fueron agitados continuamente durante

Tabla 1. Efectos de tiamina, biotina, piridoxina e inositol solas y en combinación sobre el desarrollo de Cercospora musae en medio basal glucosa-caseína hidrolizada-agar.

| Tratamientos | mg. de micelio seco | Características del crecimiento |
|---|---|---|
| 4 vitaminas juntas | 90.17 | aéreo y sumergido |
| Tiamina más biotina | 77.70 | " " " |
| Tiamina | 70.05 | " " " |
| Biotina | 4.15 | sumergido |
| Inositol | 3.25 | " |
| Piridoxina | 3.07 | " |
| Testigo | 1.50 | " |

Tabla 1. Efectos de tiamina, biotina, piridoxina e inositol solas y en combinación sobre el desarrollo de Cercospora musae en medio basal glucosa-caseína hidrolizada-agar.

| Tratamientos | mg. de micelio seco | Características del crecimiento |
|---|---|---|
| + vitaminas juntas | 90.17 | aéreo y sumergido |
| Tiamina más biotina | 77.70 | " " " |
| Tiamina | 70.05 | " " " |
| Biotina | 4.15 | sumergido |
| Inositol | 3.25 | " |
| Piridoxina | 3.07 | " |
| Testigo | 1.50 | " |

10 horas diarias en una máquina de movimientos oscilatorios y dos se mantuvieron en constante reposo. A los 30 días de incubación se obtuvo el peso seco promedio de los cultivos.

Los resultados obtenidos (Tabla 2) indican claramente que la mayor aireación en los cultivos en movimiento produjo una disminución en el desarrollo total del organismo. La fase inicial de crecimiento también fué afectada. A los 8 días de incubación el hongo no había hecho ningún desarrollo en los cultivos que fueron agitados. En los cultivos en reposo el hongo comenzó a crecer a los 4 días de incubación. La morfología, textura, color de la colonia y cambio de color en el medio fueron diferentes en cultivos agitados y en reposo. En los cultivos agitados se formaron colonias globulosas, de color verdusco y de aspecto gelatinoso. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con otros hongos. Sordaria fimicola creció menos y la formación de peritecios se retardó y disminuyó cuando los cultivos fueron agitados (27). Burkholder y Sinnott (2) describieron los cambios sufridos por varios hongos cuando fueron mantenidos en movimiento.

Efectos de diferentes concentraciones de tiamina.

Se realizó un experimento para investigar el efecto de diferentes concentraciones de tiamina sobre el

10 horas diarias en una máquina de movimientos oscila-
torios y dos se mantuvieron en constante reposo. A los
30 días de incubación se obtuvo el peso seco promedio de
los cultivos.

Los resultados obtenidos (Tabla 2) indican clara-
mente que la mayor aireación en los cultivos en movi-
miento produjo una disminución en el desarrollo total del
organismo. La fase inicial de crecimiento también fué
afectada. A los 8 días de incubación el hongo no había
hecho ningún desarrollo en los cultivos que fueron agi-
tados. En los cultivos en reposo el hongo comenzó a cre-
cer a los 4 días de incubación. La morfología, textura,
color de la colonia y cambio de color en el medio fueron
diferentes en cultivos agitados y en reposo. En los cul-
tivos agitados se formaron colonias globulosas, de color
verdoso y de aspecto gelatinoso. Estos resultados con-
cuerdan con los obtenidos con otros hongos. Scopulariopsis
flavicola creció menos y la formación de peritecios se re-
tardó y disminuyó cuando los cultivos fueron agitados (27).
Burkholder y Sinnott (2) describieron los cambios sufridos
por varios hongos cuando fueron mantenidos en movimiento.

Efectos de diferentes concentraciones de tiamina.

Se realizó un experimento para investigar el efecto
de diferentes concentraciones de tiamina sobre el

Table 2. Influencia de la aireación sobre el desarrollo de Cercospora musae en medio basal glucosa-caseína hidrolizada.

| Tratamientos* | mg. de micelio seco en reposo | mg. de micelio seco en movimiento | Diferencias, mg. |
|---|---|---|---|
| Tiamina más biotina | 281.24 | 202.50 | 78.74 |
| Tiamina | 243.97 | 166.40 | 77.57 |
| Diferencias, mg. | 37.27 | 36.10 | |

*En ningún caso hubo crecimiento en el testigo.

Table 2. Influencia de la atracción sobre el desarrollo de Cercospora musae en medio basal glucosa-caseína hidrolizada.

| Tratamientos* | mg. de micelio seco en reposo | mg. de micelio seco en movimiento | Diferencias, mg. |
|---|---|---|---|
| Tiamina más biotina | 281.2+ | 202.5C | 78.7+ |
| Tiamina | 2+3.97 | 166.+C | 77.57 |
| Diferencias, mg. | 37.27 | 36.10 | |

*En ningún caso hubo crecimiento en el testigo.

desarrollo y esporulación de C. musae. Se usó medio sólido. Se hicieron 7 tratamientos empleando 200, 150, 100, 50, 25, 12.5 microgramos de tiamina por litro de medio y un testigo sin tiamina. Cada tratamiento tuvo 7 repeticiones. A los 32 días de incubación se obtuvo el peso seco promedio.

Los resultados del experimento (Tabla 3) muestran el comportamiento del hongo en las diferentes concentraciones de tiamina empleadas. El mejor desarrollo se obtuvo con 12.5 microgramos de tiamina por litro. A concentraciones hasta de 200 microgramos de tiamina por litro el crecimiento disminuyó, pero estas diferencias de desarrollo no fueron significativas ni visualmente apreciables. Se observó también que el crecimiento decreció apreciablemente a una concentración de 1 microgramo de tiamina por litro. Estos resultados indicaron que la concentración óptima de tiamina para el desarrollo del hongo pareció estar entre 1 y 12.5 microgramos por litro de medio, bajo las condiciones de este experimento.

Observaciones microscópicas periódicas sobre el experimento anterior no revelaron esporulación en ninguno de los tratamientos. Se creyó que el inóculo usado o la ausencia de biotina en el medio hubiera sido la posible causa de la falta de esporulación. Se realizó otro experimento para probar si esto era correcto. Este nuevo

desarrollo y esporulación de C. <u>musae</u>. Se usó medio sólido. Se hicieron 7 tratamientos empleando 200, 150, 100, 50, 25, 12.5 microgramos de tiamina por litro de medio y un testigo sin tiamina. Cada tratamiento tuvo 7 repeticiones. A los 32 días de incubación se obtuvo el peso seco promedio.

Los resultados del experimento (Tabla 3) muestran el comportamiento del hongo en las diferentes concentraciones de tiamina empleadas. El mejor desarrollo se obtuvo con 12.5 microgramos de tiamina por litro. A concentraciones bajas de 200 microgramos de tiamina por litro el crecimiento disminuyó, pero estas diferencias de desarrollo no fueron significativas ni visualmente apreciables. Se observó también que el crecimiento decreció apreciablemente a una concentración de 1 microgramo de tiamina por litro. Estos resultados indican que la concentración óptima de tiamina para el desarrollo del hongo parecía estar entre 1 y 12.5 microgramos por litro de medio, bajo las condiciones de este experimento.

Observaciones microscópicas periódicas sobre el experimento anterior no revelaron esporulación en ninguno de los tratamientos. Se creyó que el inóculo usado o la ausencia de biotina en el medio hubiera sido la posible causa de la falta de esporulación. Se realizó otro experimento para probar si esto era correcto. Este nuevo

Tabla 3. Efectos de diferentes concentraciones de tiamina sobre el desarrollo de Cercospora musae en medio glucosa-caseína-agar.

| Concentraciones de tiamina (microgramos/litro) | mg. de micelio seco |
|---|---|
| Sin tiamina | 2.1 |
| 12.5 | 98.60 |
| 25.0 | 96.60 |
| 50.0 | 94.20 |
| 100.0 | 93.50 |
| 150.0 | 91.40 |
| 200.0 | 91.80 |

Tabla 3. Efectos de diferentes concentraciones de tiamina sobre el desarrollo de Cercosporta musae en medio glucosa-caseina-agar.

| Concentraciones de tiamina (microgramos/litro) | Mg. de micelio seco |
|---|---|
| sin tiamina | 2.1 |
| 12.5 | 96.60 |
| 25.0 | 96.60 |
| 50.0 | 94.20 |
| 100.0 | 93.50 |
| 150.0 | 91.40 |
| 200.0 | 91.80 |

experimento incluyó los mismos tratamientos anteriores y otra nueva serie de tratamientos en los cuales se mantuvo constante la concentración de tiamina (12.5 microgramos/litro), y se varió la concentración de biotina a: 100, 50, 25, 15, 5, y 1 microgramos por litro de medio. Estos tratamientos se dividieron en 2 series: en la primera serie se utilizó como inóculo fragmentos de micelio no esporulados del mismo cultivo empleado anteriormente, y en la segunda serie se usó como inóculo fragmentos de micelio esporulados de un nuevo aislamiento. En ninguno de los tratamientos se observó esporulación durante 30 días de observación. Sin embargo, fragmentos de micelio inoculados en la segunda serie esporularon abundantemente cuando se pasaron a papa-dextrosa-agar. Estos resultados sugieren que los elementos nutritivos del medio papa-dextrosa-agar se encuentran más balanceados que los elementos nutritivos del medio basal empleado, para la esporulación de C. musae.

Aparentemente no hubo diferencia en cuanto a rata y cantidad de crecimiento en los tratamientos con diferentes concentraciones de biotina, y pareció evidente que ni la ausencia de biotina en el medio ni el inóculo había sido la causa de la falta de esporulación.

experimento incluyó los mismos tratamientos anteriores y otra nueva serie de tratamientos en los cuales se mantuvo constante la concentración de tiamina (12.5 microgramos\litro), y se varió la concentración de biotina a: 100, 50, 25, 12, 5, y 1 microgramos por litro de medio. Estos tratamientos se dividieron en 2 series: en la primera serie se utilizó como inóculo fragmentos de micelio esporulados del mismo cultivo empleado anteriormente, y en la segunda serie se usó como inóculo fragmentos de micelio esporulados de un nuevo aislamiento. En ninguno de los tratamientos se observó esporulación durante 30 días de observación. Sin embargo, fragmentos de micelio inoculados en la segunda serie esporularon abundantemente cuando se pasaron a papa-dextrosa-agar. Estos resultados sugieren que los elementos nutritivos del medio papa-dextrosa-agar se encuentran más balanceados que los elementos nutritivos del medio basal empleado, para la esporulación de C. musae.

Aparentemente no hubo diferencia en cuanto a tasa y cantidad de crecimiento en los tratamientos con diferentes concentraciones de biotina, y pareció evidente que ni la ausencia de biotina en el medio ni el inóculo había sido la causa de la falta de esporulación.

Efectos del pH sobre el crecimiento.

El pH del medio de cultivo es un factor determinante en el crecimiento de los hongos. Con el propósito de conocer el efecto de la reacción del medio sobre el C. musae, se cultivó este hongo en el mismo medio basal líquido ajustado a pH de 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5. Se inocularon 25 frascos Erlenmeyer de cada tratamiento. Después de varios períodos de incubación se obtuvo el peso seco del micelio y se tomó el pH de cada filtrado. Cada punto de las curvas de crecimiento (Fig. 5) representa el peso promedio de 4 cultivos cosechados al mismo tiempo.

Los pH iniciales 4.5 y 5.5 fueron los más favorables para la rata y cantidad de crecimiento. En estos pH el hongo alcanzó su crecimiento máximo a los 24 días de incubación. En los demás tratamientos, el crecimiento máximo lo alcanzó a los 30 días de incubación.

En todos los tratamientos las variaciones de pH fueron bastante amplias. En general hubo dos tendencias. Los medios con los pH iniciales 4.5, 5.5 y 6.5 subieron el pH en todos los períodos de incubación. Los medios con pH iniciales 7.5 y 8.5, bajaron el pH en los períodos de 18 y 24 días de incubación y subieron en los dos últimos períodos. Al fin del experimento, todos los medios tenían un pH entre 8.0 y 8.4 (Tabla 4).

Efectos del pH sobre el crecimiento.

El pH del medio de cultivo es un factor determinante en el crecimiento de los hongos. Con el propósito de conocer el efecto de la reacción del medio sobre el Q. musae, se cultivó este hongo en el mismo medio basal ajustado a pH de 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5. Se inocularon 25 frascos Erlenmeyer de cada tratamiento. Después de varios períodos de incubación se obtuvo el peso seco del micelio y se tomó el pH de cada filtrado. Cada punto de las curvas de crecimiento (Fig. 5) representa el peso promedio de 4 cultivos cosechados al mismo tiempo.

Los pH iniciales 4.5 y 5.5 fueron los más favorables para la rata y cantidad de crecimiento. En estos pH el hongo alcanzó su crecimiento máximo a los 24 días de incubación. En los demás tratamientos, el crecimiento máximo lo alcanzó a los 30 días de incubación.

En todos los tratamientos las variaciones de pH fueron bastante amplias. En general hubo dos tendencias. Los medios con los pH iniciales 4.5, 5.5 y 6.5 subieron el pH en todos los períodos de incubación. Los medios con pH iniciales 7.5 y 8.5, bajaron el pH en los períodos de 18 y 24 días de incubación y subieron en los dos últimos períodos. Al fin del experimento, todos los medios tenían un pH entre 8.0 y 8.4 (Tabla 4).

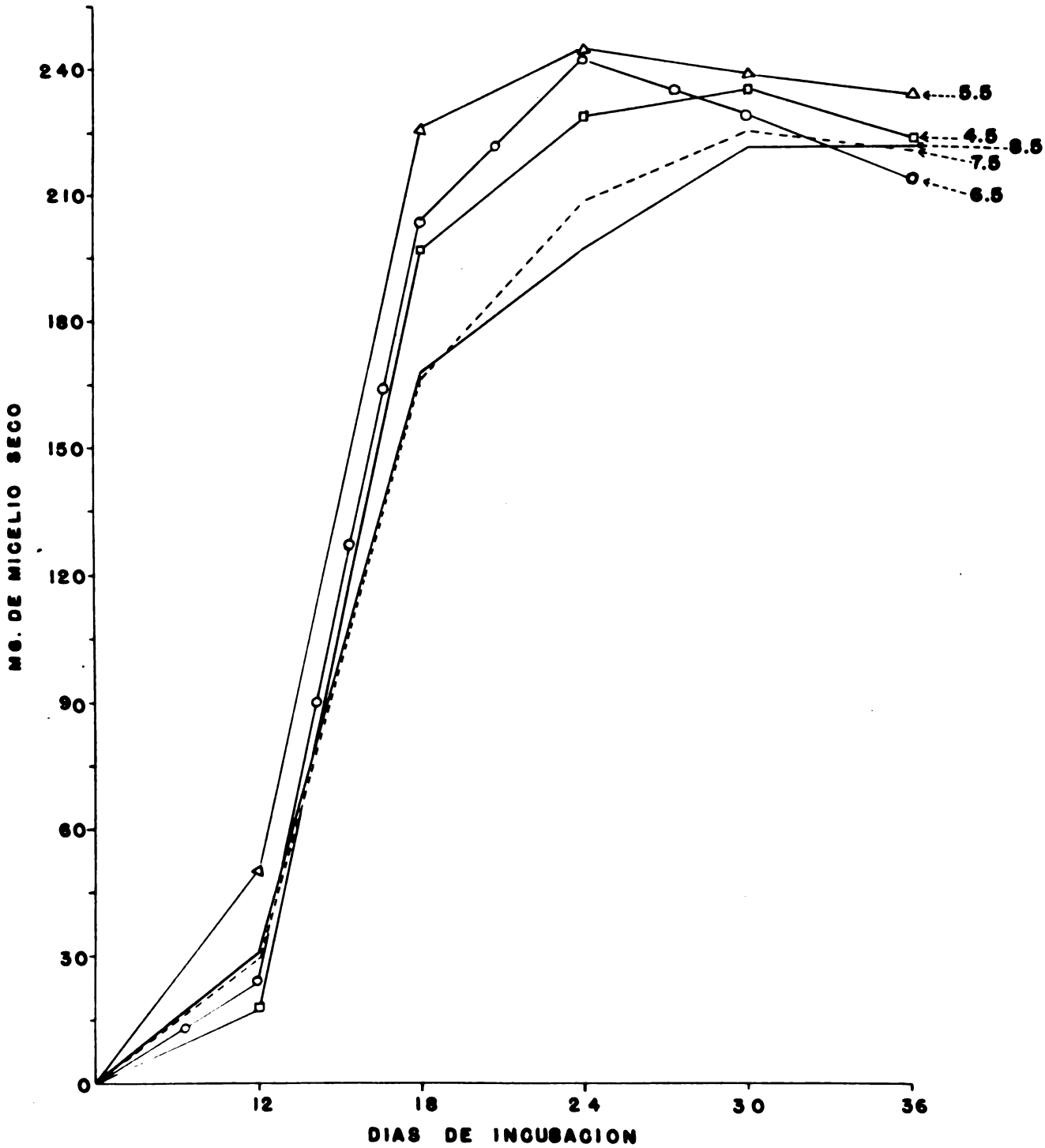



FIG. 5. EFECTOS DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DE CERCOSPORA MUSAE EN MEDIO LIQUIDO GLUCOSA-CASEINA HIDROLIZADA Y TIAMINA Y BIOTINA.

Tabla 4. Cambios de pH en medio de cultivo líquido glucosa-caseína hidrolizada-tiamina-biotina, con diferentes pH iniciales, durante la incubación de Cercospora musae.

| pH iniciales | Cambios de pH* Días de incubación | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 18 | 24 | 30 | 36 |
| 4.5 | 5.98 | 6.71 | 8.09 | 8.20 |
| 5.5 | 6.34 | 6.78 | 8.00 | 8.38 |
| 6.5 | 6.52 | 7.25 | 7.90 | 8.32 |
| 7.5 | 6.88 | 6.92 | 8.47 | 8.40 |
| 8.5 | 7.17 | 7.12 | 7.29 | 8.00 |

*Cada dato representa el pH promedio de 4 cultivos.

Tabla 4. Cambios de pH en medio de cultivo líquido glucosa-caseína hidrolizada-tiamina-biotina, con diferentes pH iniciales, durante la incubación de Cercospora musae.

| pH iniciales | Cambios de pH* Días de incubación | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 18 | 24 | 30 | 36 |
| 4.5 | 5.98 | 6.71 | 8.09 | 8.20 |
| 5.5 | 6.34 | 6.78 | 8.00 | 8.38 |
| 6.5 | 6.52 | 7.25 | 7.90 | 8.32 |
| 7.5 | 6.88 | 6.92 | 8.47 | 8.40 |
| 8.5 | 7.17 | 7.12 | 7.29 | 8.00 |

*Cada dato representa el pH promedio de 4 cultivos.

Efectos de diferentes fuentes de carbono.

Se realizó un experimento para investigar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el desarrollo de C. musae. Se ensayaron 8 materiales, los cuales fueron agregados separadamente al medio basal líquido libre de carbono. Estos materiales fueron usados en la cantidad de 25 gm. por litro de medio. El experimento incluyó un testigo que consistió del medio basal libre de fuente de carbono. Los cultivos se mantuvieron en incubación durante 30 días. Al final de este período, se obtuvo el peso seco promedio de 10 cultivos de cada tratamiento.

Los resultados obtenidos (Fig. 6) indican que la sucrosa fué la mejor fuente de carbono para el desarrollo del hongo. Maltosa, galactosa, glucosa, fructosa y lactosa fueron satisfactorias fuentes de carbono; mannitol, regular; y sorbitol, mala. En ausencia de carbono hubo muy poco crecimiento (15 mg. de micelio seco).

Efectos de diferentes fuentes de nitrógeno.

Para este experimento se usó sucrosa en el medio basal como fuente de carbono. Se ensayaron 7 compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de nitrógeno para el hongo, tanto en medio líquido como en sólido. El medio líquido fué empleado para obtener datos sobre el desarrollo

Efectos de diferentes fuentes de carbono.

Se realizó un experimento para investigar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el desarrollo de C. musae. Se ensayaron 8 materiales, los cuales fueron agregados separadamente al medio basal líquido libre de carbono. Estos materiales fueron usados en la cantidad de 25 gm. por litro de medio. El experimento incluyó un testigo que consistió del medio basal libre de fuente de carbono. Los cultivos se mantuvieron en incubación durante 30 días. Al final de este período, se obtuvo el peso seco promedio de 10 cultivos de cada tratamiento.

Los resultados obtenidos (Fig. 6) indican que la sucrosa fué la mejor fuente de carbono para el desarrollo del hongo. Maltosa, galactosa, glucosa, fructosa y lactosa fueron satisfactorias fuentes de carbono; manitol, regular; y sorbitol, mala. En ausencia de carbono hubo muy poco crecimiento (15 mg. de micelio seco).

Efectos de diferentes fuentes de nitrógeno.

Para este experimento se usó sucrosa en el medio líquido fué empleado para obtener datos sobre el desarrollo hongo, tanto en medio líquido como en sólido. El medio orgánicos e inorgánicos como fuente de nitrógeno para el basal como fuente de carbono. Se ensayaron 7 compuestos

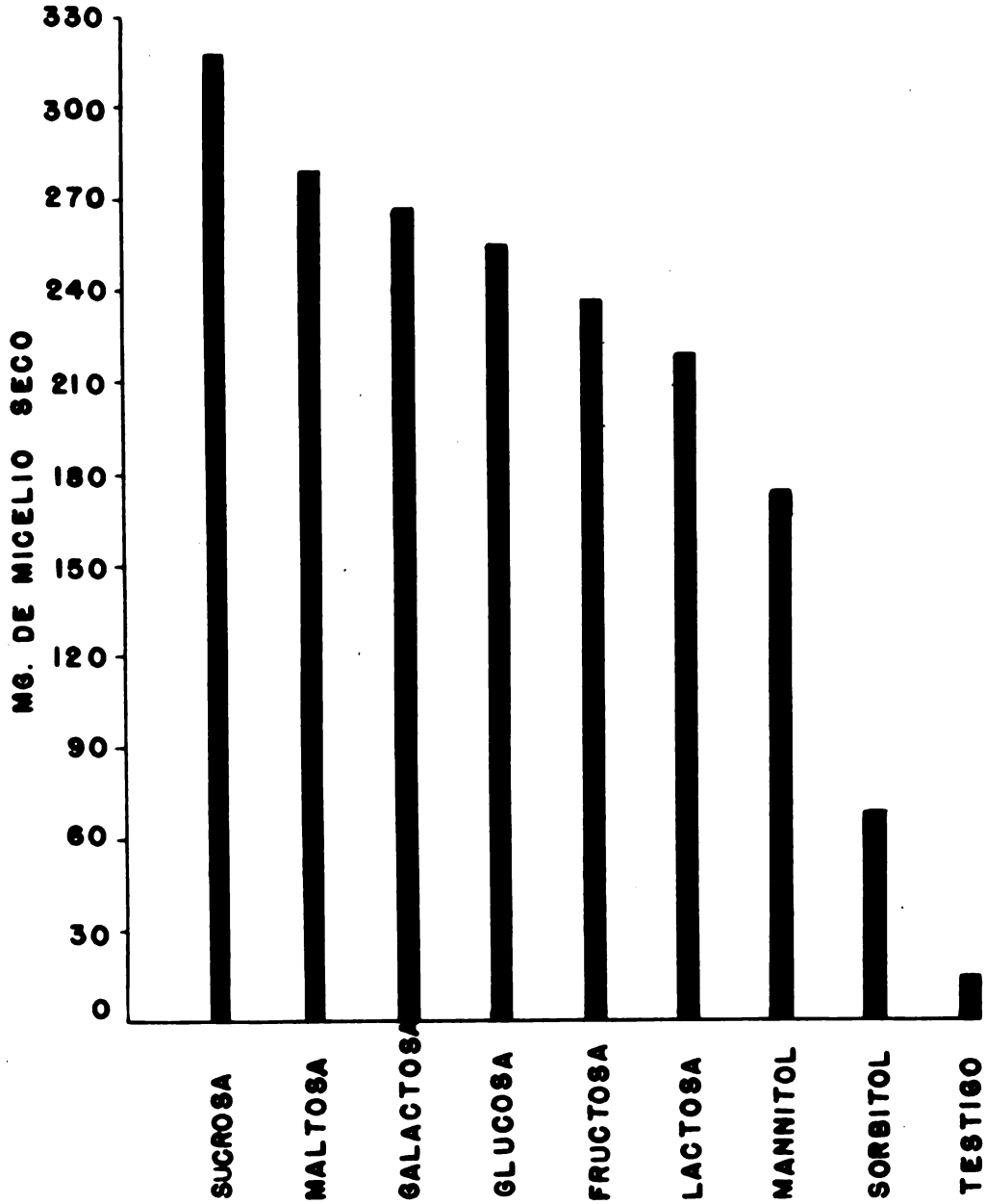



FIG. 6. EFECTOS DE DIFERENTES CARBOHYDRATOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE CERCOSPORA MUSAE EN MEDIO LIQUIDO CASEINA Y TIAMINA Y BIOTINA.

vegetativo. El medio sólido fué empleado especialmente para observar la esporulación. Los compuestos fueron usados a razón de 2 gm. por litro de medio. Se hizo un testigo que consistió del medio basal libre de fuente de nitrógeno. Se inocularon de 8 a 10 frascos Erlenmeyer con los medios líquidos y se mantuvieron en incubación durante 30 días. Al cabo de este tiempo se obtuvo el peso seco promedio. Los medios sólidos fueron divididos en 2 series: la primera serie fué inoculada con fragmentos de micelio no esporulado y la segunda serie con fragmentos de micelio esporulados.

El hongo fué capaz de hacer uso de todos los diferentes compuestos empleados como fuente de nitrógeno. El mejor crecimiento fué obtenido con caseína-hidrolizada (Fig. 7). En ausencia de fuente de nitrógeno no hubo absolutamente ningún desarrollo.

En la primera serie de inoculaciones en medios sólidos, sólo hubo escasa producción de conidias en el medio que contuvo nitrato de potasio como fuente de nitrógeno. En la segunda serie de inoculaciones, hubo abundante esporulación, con conidias normales, en el medio con nitrato de potasio; buena esporulación, con la mayoría de las conidias producidas anormales en forma y tamaño, en los medios con caseína-hidrolizada, y asparagina; muy poca esporulación, con conidias anormales en forma y tamaño, en

vegetativo. El medio sólido fué empleado especialmente para observar la esporulación. Los compuestos fueron usados a razón de 2 gm. por litro de medio. Se hizo un testigo que constaba del medio basal libre de fuente de nitrógeno. Se inocularon de 8 a 10 frascos Erlenmeyer con los medios líquidos y se mantuvieron en incubación durante 30 días. Al cabo de este tiempo se obtuvo el peso seco promedio. Los medios sólidos fueron divididos en 2 series: la primera serie fué inoculada con fragmentos de micelio no esporulado y la segunda serie con fragmentos de micelio esporulados.

El hongo fué capaz de hacer uso de todos los diferentes compuestos empleados como fuente de nitrógeno. El mejor crecimiento fué obtenido con caseína-hidrolizada (Fig. 7). En ausencia de fuente de nitrógeno no hubo absolutamente ningún desarrollo.

En la primera serie de inoculaciones en medios sólidos, sólo hubo escasa producción de conidias en el medio que contuvo nitrato de potasio como fuente de nitrógeno. En la segunda serie de inoculaciones, hubo abundante esporulación, con conidias normales, en el medio con nitrato de potasio; buena esporulación, con la mayoría de las conidias producidas anormales en forma y tamaño, en los medios con caseína-hidrolizada, y esporulación muy poca en

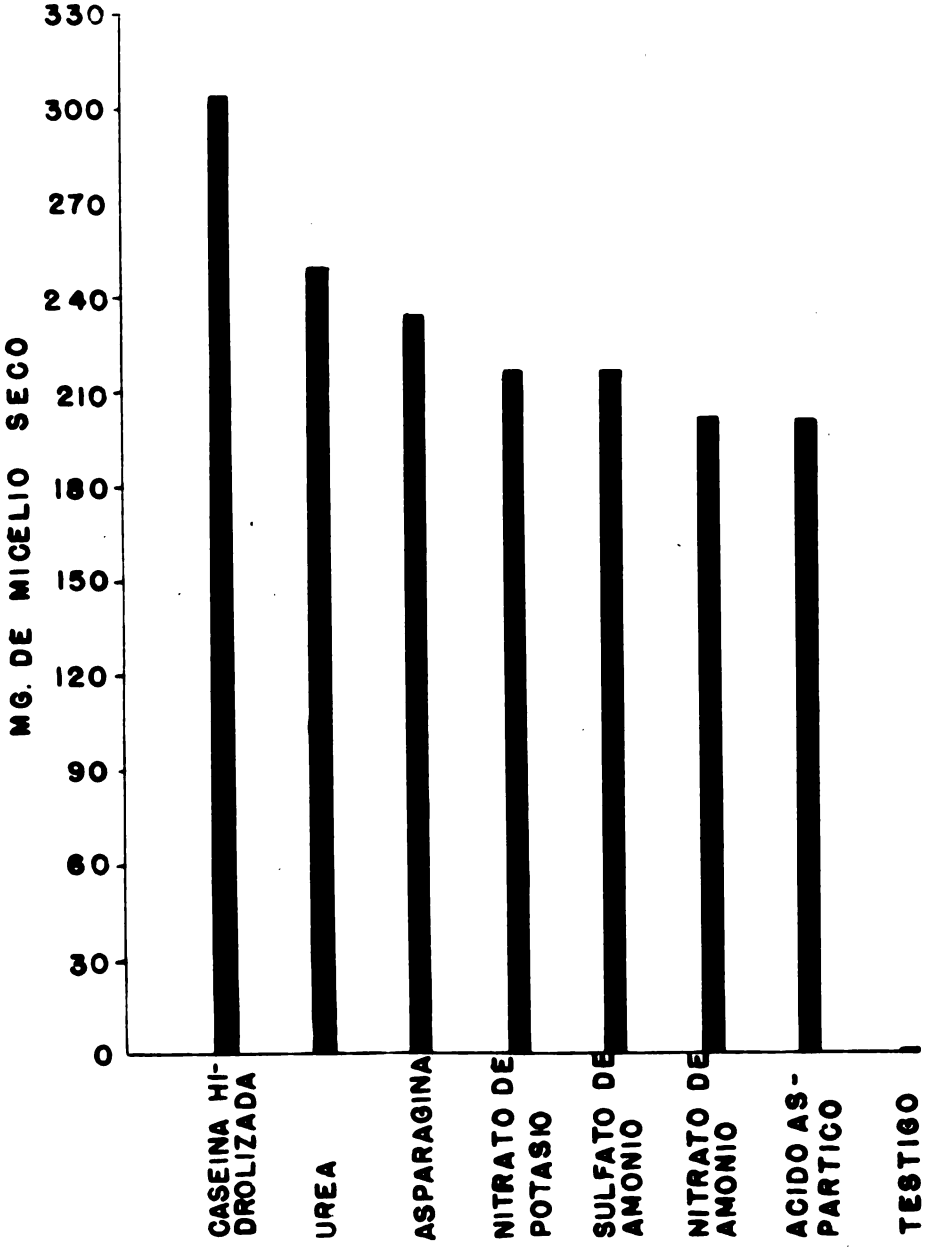



FIG. 7. EFECTOS DE DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO SOBRE EL CRECIMIENTO DE CERCOSPORA MUSAE EN MEDIO LIQUIDO SUCROSA Y TIAMINA Y BIOTINA.

los medios con urea, nitrato de amonio y sulfato de amonio; no hubo esporulación ni en el testigo ni el medio con ácido aspártico (Tabla 5). Estos resultados indicaron que los requerimientos de nitrógeno fueron más específicos para la esporulación que para el desarrollo micelial.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Es un hecho bien conocido que la clase y concentración de nutrientes en el medio de cultivo son factores importantes tanto para el desarrollo vegetativo como para la esporulación de los hongos y que no siempre estos 2 fenómenos occuren bajo idénticas condiciones. Mix (33) encontró, por ejemplo, que el rango de concentración de nutrientes que permitió el crecimiento del Phyllosticta solitaria en cultivo fué más amplio que el rango para la esporulación. Cuando aumentó la concentración de nutrientes hasta cuando hubo solamente crecimiento micelial, se produjeron algunos picnidios. Con mayores aumentos en la concentración de estos nutrientes la formación de picnidios fué más numerosa, hasta llegar a cierto límite, después del cual decreció. Henry y Andersen (13) cultivaron Piricularia orizae en varios medios naturales y no encontraron relación directa entre desarrollo micelial y producción de conidias. En los medios en donde hubo más

los medios con urea, nitrato de amonio y sulfato de amonio; no hubo esporulación ni en el testigo ni el medio con ácido aspártico (Tabla 5). Estos resultados indican que los requerimientos de nitrógeno fueron más específicos para la esporulación que para el desarrollo micelial.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Es un hecho bien conocido que la clase y concentración de nutrientes en el medio de cultivo son factores importantes tanto para el desarrollo vegetativo como para la esporulación de los hongos y que no siempre estos 2 fenómenos ocurren bajo idénticas condiciones. Mix (33) encontró, por ejemplo, que el rango de concentración de nutrientes que permitió el crecimiento del Physalospora solitaria en cultivo fué más amplio que el rango para la esporulación. Cuando aumentó la concentración de nutrientes hasta cuando hubo solamente crecimiento micelial, se produjeron algunos picnidios. Con mayores aumentos en la concentración de estos nutrientes la formación de picnidios fué más numerosa, hasta llegar a cierto límite, después del cual decreció. Henry y Anderson (13) cultivaron Fitcularia oriza en varios medios naturales y no encontraron relación directa entre desarrollo micelial y producción de conidias. En los medios en donde hubo más

Tabla 5. Efectos de diferentes fue[n]
de Cercospora musae en me

| Fuentes de nitrógeno | mg. de micelio seco* | d de las s |
|---|---|---|
| | | s anormales*** |
| Caseína hidrolizada | 303.43 | " |
| Urea | 248.80 | " |
| Asparagina | 234.52 | " |
| Nitrato de potasio | 215.70 | |
| Sulfato de amonio | 214.74 | " |
| Nitrato de amonio | 201.04 | " |
| Acido aspártico | 199.47 | |
| Testigo | 0 | |

* Cultivos en medio líquido
** Cultivos en medio sólido
*** Conidias anormales en forma y

Tabla 5. Valores de diferencias mínimas significativas para [illegible] de Duncan usado en [illegible]

| Tratamientos | Nº. de plantas* | Observación** |
|---|---|---|
| | | Usado como testigo |
| Testigo | 0 | 0 |
| Acido ascórbico | 19.47 | 0 |
| Nitrato de amonio | 204.06 | 0 |
| Sulfato de amonio | 211.74 | 0 |
| Nitrato de potasio | 215.70 | + |
| Aspirina | 237.52 | 0 |
| Urea | 248.00 | 0 |
| Hormona Liquida | 263.43 | 0 |

* Cultivos en medio líquido
** Cultivos en medio sólido
*** Controles sembrados en tierra y tratados

abundante crecimiento no hubo producción de conidias, pero sí hubo esporulación en los medios que produjeron menos desarrollo micelial. Hawker (10, 11) observó que el crecimiento de Melanospora destruens aumentó con el aumento de concentración de glucosa y fructosa en el medio más allá del 10%, pero bajó un poco a 20%. Sin embargo, la formación de peritecios fué más numerosa a 0.5%, y el número de ellos decreció con un mayor aumento de estos azúcares. Mathur, et al. (31) también observaron buena esporulación de Colletotrichum lindemuthianum a baja concentración de sucrosa en el medio.

De acuerdo con los resultados obtenidos con C. musae en los medios naturales empleados en el presente estudio, los hechos a base de extracto de hojas de banano, con o sin la adición de dextrosa a dichos medios, no fueron satisfactorios ni para la producción de conidias ni para el crecimiento vegetativo del organismo, en ninguna de las concentraciones utilizadas. Sin embargo, la concentración del medio y la parte de la hoja utilizada en su preparación tuvieron alguna influencia sobre la esporulación. Cuando se usaron 30 gm. de hoja no hubo formación de conidias, pero aun cuando escasa, sí la hubo cuando se usaron 20 y 5 gm. y, en especial, en el medio preparado con las partes insolubles. La cantidad de sulfato de amonio que se retuvo en las proteínas precipitadas, posiblemente tuvo

se retuvo en las proteínas precipitadas, posiblemente tuvo partes insolubles. La cantidad de sulfato de amonio que 20 y 5 gm. y, en especial, en el medio preparado con las días, pero aun cuando escasa, si la hubo cuando se usaron Cuando se usaron 30 gm. de hoja no hubo formación de conidiación tuvieron algunas influencia sobre la esporulación. parasitación del medio y la parte de la hoja utilizada en su producción vegetativo del organismo, en ninguna de las concentraciones utilizadas. Sin embargo, la concentracrecimiento vegetativo del organismo, en ninguna de las tizadoras ni para la producción de conidias ni para el sin la adición de dextrosa a dichos medios, no fueron salos hechos a base de extracto de hojas de banano, con o en los medios naturales empleados en el presente estudio, De acuerdo con los resultados obtenidos con C. musae centración de sucrosa en el medio.

esporulación de Colletotrichum lindemuthianum a base con- azúcares. Mathur, et al. (31) también observaron buena número de ellos decreció con un mayor aumento de estos formación de peritecios fué más numerosa a 0.5%, y el allá del 10%, pero bajó un poco a 20%. Sin embargo, la de concentración de glucosa y fructosa en el medio más cimiento de Melanospora destruens aumentó con el aumento desarrollo micelial. Hawker (10, 11) observó que el cresi hubo esporulación en los medios que produjeron menos abundante crecimiento no hubo producción de conidias, pero

algún efecto tóxico sobre el organismo al cultivarlo en el medio compuesto con esas partes de la hoja.

El medio papa-dextrosa-agar probó ser apropiado para el crecimiento y esporulación del hongo. La concentración de dextrosa en dicho medio fué, sin embargo, un factor limitante en ambos casos. Sin dextrosa el hongo fué capaz de hacer algún crecimiento y de producir conidias sólo una vez, pero prontamente el medio quedó empobrecido y la autólisis ocurrió rapidamente. Con la adición de 1 gm. de dextrosa, el desarrollo fué superior y hubo mayor esporulación. Mayores aumentos en la concentración de dextrosa hasta de 20 gm. estimularon el desarrollo y fué óptima para la esporulación del hongo. Hasta este límite la producción de conidias estuvo directamente relacionada con el desarrollo aéreo del organismo. En el medio que contuvo 30 gm. de dextrosa el crecimiento vegetativo fué superior, pero la esporulación fué baja.

Los métodos empleados por otros investigadores para la producción de conidias en cultivos puros de C. musae no resultaron satisfactorios en este estudio. Según Leach (20) las conidias producidas en el medio empleado por Meredith y Butler (32) son anormales en forma y no son facilmente desprendibles de sus esporodoquios. Los experimentos de infección y germinación los realizó Leach con conidias recolectadas directamente de hojas infectadas

algún efecto tóxico sobre el organismo al cultivarlo en el medio compuesto con esas partes de la hoja.

El medio papa-dextrosa-agar probó ser apropiado para el crecimiento y esporulación del hongo. La concentración de dextrosa en dicho medio fué, sin embargo, un factor limitante en ambos casos. Sin dextrosa el hongo fué capaz de hacer algún crecimiento y de producir conidias sólo una vez, pero prontamente el medio quedó empobrecido y la esporulación. Mayores aumentos en la concentración de dextrosa, el desarrollo fué superior y hubo mayor esporulación del hongo. Con la adición de 1 gm. sustituyó rápidamente. hasta 20 gm. estimularon el desarrollo y fué óptima para la esporulación del hongo. Hasta este límite la producción de conidias estuvo directamente relacionada con el desarrollo aéreo del organismo. En el medio que contuvo 30 gm. de dextrosa el crecimiento vegetativo fué superior, pero la esporulación fué baja.

Los métodos empleados por otros investigadores para la producción de conidias en cultivos puros de C. musae no resultaron satisfactorios en este estudio. Según Leach (20) las conidias producidas en el medio empleado por Meredith y Butler (32) son anormales en forma y poco fácilmente desprendibles de sus esporodoquios. Los experimentos de infección y germinación los realizó Leach con conidias recolectadas directamente de hojas infectadas

en el campo. En el presente estudio se confirmó la producción de conidias normales en dicho medio, sin embargo, el crecimiento vegetativo y la cantidad de conidias fueron limitados. Dantes (3) anota que en el medio que él utilizó la producción de conidias no es abundante ni rápida y para inoculaciones artificiales tuvo que recolectar conidias de hojas infectadas.

Contrario a la opinión de otros investigadores, se obtuvo alta esporulación de C. musae en cultivo puro en papa-dextrosa-agar (20 gm. de dextrosa). Este medio no sólo favoreció una abundante producción de conidias sino que también permitió una fácil preparación de la suspensión de conidias libres de sus conidióforos. Con una suspensión hecha con un solo cultivo altamente esporulado se hicieron 55 inoculaciones en el campo. El sistema de transferencia descrito permite mantener siempre disponibles cultivos esporulados para los ensayos de inoculación, con lo que se evita la tediosa tarea de la recolección de conidias directamente de hojas infectadas. Nagel (35) usó para las transferencias unicamente conidias, pero seguramente las especies de Cercospora con las cuales él trabajó crecen más rapidamente en cultivo artificial que el C. musae. La ventaja de la transferencia de micelio y conidias, en este caso, es tener en pocos días una colonia relativamente grande para la obtención de buena cantidad

en el campo. En el presente estudio se confirmó la producción de conidias normales en dicho medio, sin embargo, el crecimiento vegetativo y la cantidad de conidias fueron limitados. Dantas (3) anota que en el medio que él utilizó la producción de conidias no es abundante ni rápida y para inoculaciones artificiales tuvo que recolectar conidias de hojas infectadas.

Contrario a la opinión de otros investigadores, se obtuvo alta esporulación de C. musae en cultivo puro en papa-dextrosa-agar (20 gm. de dextrosa). Este medio no solo favoreció una abundante producción de conidias sino que también permitió una fácil preparación de la suspensión de conidias libres de sus conidióforos. Con una suspensión hecha con un solo cultivo altamente esporulado se inocularon 55 inoculaciones en el campo. El sistema de transferencia descrito permite mantener siempre disponibles cultivos esporulados para los ensayos de inoculación, con lo que se evita la tediosa tarea de la recolección de conidias directamente de hojas infectadas. Nagel (35) usó para las transferencias únicamente conidias, pero seguramente las especies de Cercospora con las cuales él trabajó crecen más rápidamente en cultivo artificial que el C. musae. La ventaja de la transferencia de micelio y conidias, en este caso, es tener en pocos días una colonia relativamente grande para la obtención de buena cantidad

de conidias.

No hubo evidencia de que los cultivos de C. musae bajaron su capacidad de esporular, en las transferencias sucesivas efectuadas. Es posible que esto ocurra en mayor número de transferencias como ha sucedido con otros hongos (13, 28).

El comportamiento del hongo en cuanto a su esporulación en cultivo puro es similar a lo que se ha observado bajo condiciones naturales. Tipler (46) dice que después de una intensa producción de esporas, parecería que los esporodoquios necesitaran un período de descanso antes de producir esporas nuevamente. Por otra parte, Leach (21) observó que las manchas son capaces de producir esporas por un largo período, pero no continuamente en grandes cantidades, y que el hongo aparentemente requiere un corto tiempo entre cada fuerte producción de esporas para reactivar sus reservas alimenticias.

Los resultados positivos obtenidos en inoculaciones artificiales demonstraron que las conidias producidas en cultivos puros se mantenían viables y que su patogenicidad se había conservado aún después de sucesivas transferencias. Los períodos de 18, 20, 24, 30, 42 y 50 días observados desde la inoculación hasta la aparición de los síntomas primarios de la enfermedad concuerdan con los observados por otros investigadores en otros lugares, traba-

de conidias.

No hubo evidencia de que los cultivos de C. musae patron su capacidad de esporular, en las transferencias sucesivas efectuadas. Es posible que esto ocurra en mayor número de transferencias como ha sucedido con otros hongos (13, 28).

El comportamiento del hongo en cuanto a su esporulación en cultivo puro es similar a lo que se ha observado bajo condiciones naturales. Tipler (46) dice que después de una intensa producción de esporas, parecería que los esporodoquios necesitaran un período de descanso antes de producir esporas nuevamente. Por otra parte, Leach (21) observó que las manchas son capaces de producir esporas por un largo período, pero no continuamente en grandes cantidades, y que el hongo aparentemente requiere un corto tiempo entre cada fuerte producción de esporas para restaurar sus reservas alimenticias.

Los resultados positivos obtenidos en inoculaciones artificiales demostraron que las conidias producidas en cultivos puros se mantenían viables y que su patogenicidad se había conservado aún después de sucesivas transferencias. Los períodos de 18, 20, 24, 30, 42 y 50 días observados desde la inoculación hasta la aparición de los síntomas primarios de la enfermedad concuerdan con los observados por otros investigadores en otros lugares, trabs-

jando con conidias naturales. Simmonds (41) dice que el período mínimo desde la germinación hasta el primer estado de la enfermedad parece ser cerca de un mes, pero que puede extenderse a más de 2 meses. El mismo investigador (40) obtuvo lesiones típicas a los 4 meses de inoculación. Wardlaw (48) confirma lo anterior cuando dice que las inoculaciones requieren cerca de 4 meses antes de que desarrollen las lesiones. Stahel (42) y Martyn (30) notaron los síntomas primarios a los 15-17 y 42-60 días respectivamente, después de la aplicación de las conidias. Ward (47) los notó a los 24 días después de la infección.

La no producción de infección por las conidias en el cultivo de 106 días, se puede atribuir o a la baja concentración de la suspensión empleada o a la pérdida de patogenicidad de las conidias. Esto último no se pudo comprobar porque no se volvió a observar cultivos que esporularan a esa edad.

De acuerdo con las necesidades vitamínicas y con la habilidad que poseen para sintetizar o no ciertas vitaminas, los hongos se han dividido en 3 categorías generales: a) Los que pueden desarrollarse normalmente en un medio sin la adición de vitaminas. Estos hongos son capaces de sintetizar la vitamina o vitaminas que les son esenciales para su normal crecimiento; b) Los que pueden hacer cierto desarrollo sin la adición de vitaminas en el

hacer cierto desarrollo sin la adición de vitaminas en el esenciales para su normal crecimiento; b) Los que pueden pasar de sintetizar la vitamina o vitaminas que les son medio sin la adición de vitaminas. Estos hongos son cas- les: a) Los que pueden desarrollarse normalmente en un minas, los hongos se han dividido en 3 categorías gener- bilidad que poseen para sintetizar o no ciertas vita-

De acuerdo con las necesidades vitamínicas y con la portarán a esa edad.

comprobar porque no se volvió a observar cultivos que es- patogenicidad de las conidias. Esto último no se pudo centración de la suspensión empleada o a la pérdida de cultivo de 106 días, se puede atribuir o a la baja con-

La no producción de infección por las conidias en el (47) los notó a los 24 días después de la infección. tivamente, después de la aplicación de las conidias. Ward los síntomas primarios a los 12-17 y 42-60 días respec- arrollen las lesiones. Stahel (42) y Martyn (30) notaron inoculaciones requieren cerca de 4 meses antes de que des- Wardlaw (48) confirma lo anterior cuando dice que las (40) obtuvo lesiones típicas a los 4 meses de inoculación. puede extenderse a más de 2 meses. El mismo investigador de la enfermedad parece ser cerca de un mes, pero que período mínimo desde la germinación hasta el primer estado tando con conidias naturales. Simmonds (41) dice que el

medio de cultivo. Estos hongos pueden sintetizar en parte la vitamina o vitaminas que necesitan, pero no en suficientes cantidades para su normal desarrollo; y c) Los que no desarrollan en ausencia de vitaminas en el medio de cultivo. Estos hongos no tienen ningún poder sintético. Un análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio lleva a la conclusión que C. musae queda catalogado dentro de la última de las clasificaciones. Este hongo no creció en el medio basal sin vitaminas adicionadas, por tanto no fué capaz de sintetizar ninguna de las vitaminas que necesita a partir de los demás constituyentes del medio, bajo las condiciones en que el experimento fué realizado. El organismo se mostró deficiente en tiamina, biotina, piridoxina e inositol. La utilización y necesidades de estas vitaminas fueron diferentes cuando usadas solas y en combinación. Biotina, piridoxina e inositol, usadas separadamente tuvieron muy poco efecto sobre el desarrollo del hongo. Piridoxina e inositol permanecieron inactivas hasta los 24 días de incubación cuando fueron usados en combinación con biotina y tiamina. Sólo a los 30 días de incubación tuvieron un efecto un poco superior al producido por biotina y tiamina juntos (Fig. 2).

Tiamina mostró ser la vitamina más esencial para el desarrollo micelial. En presencia de esta vitamina, el hongo hizo un exuberante crecimiento aéreo, especialmente

hongo hizo un exuberante crecimiento aéreo, especialmente
desarrollo micelial. En presencia de esta vitamina, el
Tiamina mostró ser la vitamina más esencial para el

al producido por biotina y tiamina juntas (Fig. 2).
30 días de incubación tuvieron un efecto un poco superior
nadas en combinación con biotina y tiamina. Sólo a los
inactivas hasta los 24 días de incubación cuando fueron
desarrollo del hongo. Piridoxina e inositol permanecieron
nadas separadamente tuvieron muy poco efecto sobre el
solas y en combinación. Biotina, piridoxina e inositol,
dadas de estas vitaminas fueron diferentes cuando usadas
biotina, piridoxina e inositol. La utilización y necesi-
testado. El organismo se mostró deficiente en tiamina,
del medio, bajo las condiciones en que el experimento fué
vitaminas que necesite a partir de los demás constituyentes
das, por tanto no fué capaz de sintetizar ninguna de las
hongo no creció en el medio basal sin vitaminas adiciona-
grado dentro de la última de las clasificaciones. Este
estudio lleva a la conclusión que C. musae queda catalo-
Un análisis de los resultados obtenidos en el presente
cultivo. Estos hongos no tienen ningún poder sintético.
no desarrollan en ausencia de vitaminas en el medio de
cientes cantidades para su normal desarrollo; y c) Los que
la vitamina o vitaminas que necesitan, pero no en sufi-
medio de cultivo. Estos hongos pueden sintetizar en parte

en combinación con biotina. La utilización de estas 2 vitaminas estuvo condicionada por la presencia o ausencia de fuentes de nitrógeno y de carbono. El nitrógeno, especialmente, parece tener una influencia decisiva en la utilización de estas dos vitaminas (Fig. 7). La aireación (Tabla 2) y el pH inicial del medio de cultivo (Fig. 5) también tuvieron alguna influencia en la utilización de la tiamina cuando se usó sola y en combinación con biotina.

Debido a que la molécula de tiamina está formada por "Thiazole" y "Pyrimidine", el estudio de su utilización por los hongos es de capital importancia. De acuerdo con Schopfer (39) los hongos que requieren tiamina se dividen en 4 categorías:

1) Organismos que requieren sólo "thiazole"
2) Organismos que requieren sólo "pyrimidine"
3) Organismos que requieren tanto "thiazole" como "pyrimidine" separadamente
4) Organismos que requieren la molécula completa de tiamina.

Los hongos que caen dentro de las 2 primeras categorías son capaces de sintetizar el componente que no necesitan. Como ejemplos generales se pueden citar los siguientes: Tilletia caries necesitó sólo "thiazole" (52). Hawker (12) encontró que Melanospora destruens Shear pudo utilizar "pyrimidine" sola o una mezcla de "pyrimidine" y

en combinación con biotina. La utilización de estas 2 vitaminas estuvo condicionada por la presencia o ausencia de fuentes de nitrógeno y de carbono. El nitrógeno, especialmente, parece tener una influencia decisiva en la utilización de estas dos vitaminas (Fig. 7). La aireación (Tabla 2) y el pH inicial del medio de cultivo (Fig. 5) también ejercen algunas influencia en la utilización de la tiamina cuando se usó sola y en combinación con biotina.

Debido a que la molécula de vitamina está formada por "thiazole" y "pyrimidine", el estudio de su utilización por los hongos es de cierto importancia. De acuerdo con Schopfer (35) los hongos en requieren tiamina se dividen en 4 categorías:

1) Organismos que requieren sólo "thiazole"
2) Organismos que requieren sólo "pyrimidine"
3) Organismos que requieren tanto "thiazole" como "pyrimidine" separadamente
4) Organismos que requieren la molécula completa de tiamina.

Los hongos que caen dentro de las 3 primeras categorías son escasos de significar ol comunmente que no necesitan. Como ejemplos generales se pueden citar los siguientes: Tilletia caries necesitó sólo "thiazole" (35). Hawker (15) encontró que Peronospora destructor Shear pudo utilizar "pyrimidine" sola o una mezcla de "pyrimidine" y

"thiazole" en presencia de biotina; en ausencia de biotina esos componentes fueron inactivos. Phycomyces nitens (38) necesitó ambos componentes. "Thiazole" o "pyrimidine" solos fueron inactivos. Phytophthora fagopyri, Sclerotium delphinii, S. Rolfsii, Sphaerulina trifolii, Pythium polycladon y P. Butleri, necesitaron la molécula completa de tiamina (38). Leonian y Lilly (23) estudiaron el efecto de los 2 componentes de la molécula de tiamina en varios organismos y encontraron que "thiazole" fué inactivo cuando se usó solo; 9 organismos necesitaron solo "pyrimidine", 11 organismos respondieron bien a una mezcla de los 2 componentes; y 3 respondieron sólo a la molécula completa de tiamina. El C. musae no ha sido estudiado en relación con la utilización de los componentes de la molécula de tiamina independientemente.

En estos estudios se usó la molécula completa de tiamina. Fué evidente que C. musae no pudo sintetizar la molécula de dicha vitamina. Sin embargo, esto no implica que el hongo no tenga alguna habilidad para sintetizar alguno de sus componentes. Es posible que en presencia de uno de los 2 pueda sintetizar el otro y ser capaz de unirlos en la molécula completa. En consecuencia, la evidencia experimental resultante de estos estudios indica solamente que el hongo es deficiente en tiamina. Más estudios se necesitan para saber cuales son los requerimientos en

necesitan para saber cuales son los requerimientos en que el hongo es deficiente en tiamina. Más estudios se hacen en la molécula completa. En consecuencia, la evidencia experimental resultante de estos estudios indica solamente uno de los 2 puede sintetizar el otro y ser capaz de unir algunos de sus componentes. Es posible que en presencia de ca que el hongo no tenga alguna habilidad para sintetizar moléculas de dicha vitamina. Sin embargo, esto no implit- mina. Fué evidente que C. musae no pudo sintetizar la

En estos estudios se usó la molécula completa de tia- molécula de tiamina independientemente.

en relación con la utilización de los componentes de la completa de tiamina. El C. musae no ha sido estudiado de los 2 componentes; y 3 respondieron sólo a la molécula "pyrimidine", Il organismos respondieron bien a una mezcla tivo cuando se usó solo; 9 organismos necesitaron solo varios organismos y encontraron que "thiazole" fué inac- efecto de los 2 componentes de la molécula de tiamina en de tiamina (38). Leonian y Lilly (23) estudiaron el polycladon y P. butleri, necesitaron la molécula completa delphinii, S. Rolfsii, Sphaerulina trifolii, Fythium solos fueron inactivos. Phytophthora faseopyri, Sclerotium

"thiazole" en presencia de biotina; en ausencia de biotina esos componentes fueron inactivos. Phycomyces nitens (38) necesitó ambos componentes. "Thiazole" o "pyrimidine"

cuanto a los componentes de la molécula de tiamina.

Varias observaciones se pueden hacer al comparar el comportamiento del hongo en los medios naturales y sintéticos empleados en el presente estudio. Las características culturales del organismo fueron muy semejantes en los medios papa-dextrosa-agar y medio sintético sólido suplementado con tiamina sola o con tiamina y biotina en combinación. Esto induce a creer que un factor presente en ambos medios fué el responsable de esta semejanza de crecimiento. Este factor posiblemente fué tiamina. Se ha reportado que la papa de Cartago, Costa Rica, contiene de 75 a 95 microgramos de tiamina por 100 gm. de papa (34). Por otra parte, las características culturales del organismo en los medios con extracto de hoja de banano, se asemejaron más a las características en los medios sintéticos sólidos suplementados sólo con biotina. Aun cuando la tiamina se encuentra en casi todos los órganos de las plantas (39), sin embargo, estos resultados sugieren las siguientes posibilidades: que en las hojas de banano no se encuentre tiamina, o que se encuentre en cantidad insuficiente para permitir un buen desarrollo del hongo, o que la presencia de substancias inhibitorias interfirieron con la utilización de la tiamina. Debido a que C. musae respondió bien a la tiamina contenida en la papa, sería de interés hacer un estudio con otros productos de origen natural de reco-

cuanto a los componentes de la molécula de tiamina.

Varias observaciones se pueden hacer al comparar el comportamiento del hongo en los medios naturales y sintéticos empleados en el presente estudio. Las características culturales del organismo fueron muy semejantes en los medios peps-dextrosa-agar y medio sintético sólido suplementado con tiamina sola o con tiamina y biotina en combinación. Esto induce a creer que un factor presente en ambos medios fué el responsable de esta semejanza de crecimiento. Este factor posiblemente fué tiamina. Se ha reportado que la papa de Cartago, Costa Rica, contiene de 75 a 95 microgramos de tiamina por 100 gm. de papa (34). Por otra parte, las características culturales del organismo en los medios con extracto de hoja de banano, se asemejaron más a las características en los medios sintéticos sólidos suplementados sólo con biotina. Aun cuando la tiamina se encuentra en casi todos los órganos de las plantas (39), sin embargo, estos resultados sugieren las siguientes posibilidades: que en las hojas de banano no se encuentre tiamina, o que se encuentre en cantidad insuficiente para permitir un buen desarrollo del hongo, o que la presencia de substancias inhibitorias interfirieron con la utilización de la tiamina. Debido a que C. musae respondió bien a la tiamina contenida en la papa, sería de interés hacer un estudio con otros productos de origen natural de tecc-

nocido contenido de tiamina para determinar si el organismo es capaz de responder en igual forma.

El carbono y el nitrógeno fueron factores limitantes para el desarrollo de C. musae. Este organismo no mostró mucha especificidad en cuanto a las diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno ensayadas para el desarrollo micelial.

De las 7 fuentes de nitrógeno ensayadas, las 3 mejores para el crecimiento fueron compuestos orgánicos. Nitrato de potasio ocupó el cuarto lugar para el desarrollo pero fué el que favoreció una mejor esporulación. Estos resultados concuerdan con la observación común que la esporulación es favorecida por ciertas fuentes de nitrógeno, las cuales no son necesariamente las mismas que favorecen el desarrollo micelial.

El caso de galactosa es particularmente interesante. Steinberg (45) dice que la galactosa es una fuente inferior de carbono. Así por ejemplo, Sordaria fimicola (29) y 6 líneas de Venturia inaequalis (22) crecieron muy poco en presencia de galactosa usada como fuente de carbono. Para Aspergillus niger y Penicillium glaucum la galactosa retardó la germinación de las esporas y el crecimiento micelial y causó crecimiento anormal (17). Sin embargo, C. musae desarrolló bien cuando la galactosa fué incorporada en el medio de cultivo.

nocido contenido de timina para determinar si el orga-
nismo es capaz de responder en igual forma.

El carbono y el nitrógeno fueron factores limitantes para el desarrollo de C. musae. Este organismo no mostró mucha especificidad en cuanto a las diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno ensayadas para el desarrollo micelial.

De las 7 fuentes de nitrógeno ensayadas, las 3 mejores para el crecimiento fueron compuestos orgánicos. Nitrato de potasio ocupó el cuarto lugar para el desarrollo pero fué el que favoreció una mejor esporulación. Estos resultados concuerdan con la observación común que la esporulación es favorecida por ciertas fuentes de nitrógeno, las cuales no son necesariamente las mismas que favorecen el desarrollo micelial.

El caso de galactosa es particularmente interesante. Steinberg (45) dice que la galactosa es una fuente inferior de carbono. Así por ejemplo, Sordaria fimicola (29) y 6 líneas de Venturia inaequalis (22) crecieron muy poco en presencia de galactosa usada como fuente de carbono. Para Aspergillus niger y Penicillium glaucum la galactosa retardó la germinación de las esporas y el crecimiento micelial y causó crecimiento anormal (17). Sin embargo, C. musae desarrolló bien cuando la galactosa fué incorporada en el medio de cultivo.

En general, las condiciones que permitieron el crecimiento fueron mucho más amplias que las que permitieron la esporulación de C. musae. Esta última se notó bajo muy limitadas condiciones y no se llegó a obtener un conocimiento exacto de los factores que la gobiernan. Hubo alguna evidencia que la clase de fuente de carbono y de nitrógeno, así como también la clase de inóculo, tuvieron algo que ver con el fenómeno de la esporulación. La caseína hidrolizada como fuente de nitrógeno no permitió esporulación en ningún caso, cuando se usó como inóculo fragmentos de micelio no esporulados. En cambio, aun cuando con conidias anormales en forma y tamaño, si permitió esporulación cuando se usó como inóculo fragmentos de micelio esporulados y se empleó sucrosa como fuente de carbono (Tabla 5). Es probable que con un mejor balance entre la caseína hidrolizada y la sucrosa se obtenga una normal esporulación. El nitrato de potasio no sólo fué la mejor fuente de nitrógeno para la esporulación cuando se usó micelio y conidias como inóculo, sino que también en su presencia el micelio no esporulado produjo algunas conidias, mientras que este mismo micelio permaneció estéril en las otras fuentes de nitrógeno. Este caso demostró que el micelio no esporulado exige condiciones de nutrición mucho más específicas que el micelio esporulado, para la esporulación.

En general, las condiciones que permitieron el crecimiento fueron mucho más amplias que las que permitieron la esporulación de C. musae. Esta última se nota bajo muy limitadas condiciones y no se llegó a obtener un conocimiento exacto de los factores que la gobiernan. Hubo alguna evidencia que la clase de fuente de carbono y de nitrógeno, así como también la clase de inóculo, tuvieron algo que ver con el fenómeno de la esporulación. La cepa usada hidrolizada como fuente de nitrógeno no permitió esporulación en ningún caso, cuando se usó como inóculo fragmentos de micelio no esporulados. En cambio, aun cuando con comidas anormales en forma y tamaño, sí permitió esporulación cuando se usó como inóculo fragmentos de micelio esporulados y se empleó sucrosa como fuente de carbono (Tabla 5). Es probable que con un mejor balance entre la cepa hidrolizada y la sucrosa se obtenga una normal esporulación. El nitrato de potasio no sólo fué la mejor fuente de nitrógeno para la esporulación cuando se usó micelio y comidas como inóculo, sino que también en su presencia el micelio no esporulado produjo algunas comidas, mientras que este mismo micelio permaneció estéril en las otras fuentes de nitrógeno. Este caso demostró que el micelio no esporulado exige condiciones de nutrición mucho más específicas que el micelio esporulado, para la esporulación.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren la necesidad de realizar más estudios sobre los factores de nutrición que influyen en la esporulación del organismo. Generalmente se ha visto que para una normal esporulación todos los constituyentes del medio tienen que estar debidamente balanceados y que cada factor puede modificar la influencia del otro. Leonian y Lilly (24) estudiaron la relación dextrosa-ácido aspártico y tiamina, sobre la esporulación de Phycomyces Blakesleeanus. Encontraron que grandes cantidades de dextrosa y muy pequeñas cantidades de ácido aspártico o viceversa, tendieron a reducir el número de zygosporas. El balance nitrógeno-carbono jugó un papel importante para la reproducción sexual de Neurospora. Se encontró que 2% de glucosa y 0.1% de nitrato de potasio fueron las concentraciones óptimas de varias combinaciones ensayadas (50). Sordaria fimicola necesitó un adecuado balance entre la cantidad de biotina y los demás nutrientes del medio para la formación de peritecios, ascas y ascosporas (1).

Un estudio más detallado de la relación nitrógeno-carbono, en donde entren nitrato de potasio como fuente de nitrógeno y sucrosa como fuente de carbono, en buen balance con los demás componentes del medio, podría influir decisivamente en la esporulación de C. musae del banano.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren la necesidad de realizar más estudios sobre los factores de nutrición que influyen en la esporulación del organismo. Generalmente se ha visto que para una normal esporulación todos los constituyentes del medio tienen que estar debidamente balanceados y que cada factor puede modificar la influencia del otro. Leonian y Lilly (24) estudiaron la relación dextrosa-ácido aspártico y tiamina, sobre la esporulación de Phycomyces Blakesleeanus. Encontraron que grandes cantidades de dextrosa y muy pequeñas cantidades de ácido aspártico o viceversa, tendieron a reducir el número de zygosporas. El balance nitrógeno-carbono jugó un papel importante para la reproducción sexual de Neurospora. Se encontró que 2% de glucosa y 0.1% de nitrato de potasio fueron las concentraciones óptimas de varias combinaciones ensayadas (50). Sordaria fimicola necesitó un adecuado balance entre la cantidad de biotina y los demás nutrientes del medio para la formación de peritecios, ascas y ascosporas (1).

Un estudio más detallado de la relación nitrógeno-carbono, en donde entren nitrato de potasio como fuente de nitrógeno y sucrosa como fuente de carbono, en buen balance con los demás componentes del medio, podría influir decisivamente en la esporulación de C. musae del banano.

## RESUMEN

1. De varias técnicas empleadas para aislar el C. musae en cultivo puro, la más satisfactoria fué la siguiente: hojas de banano infectadas se mantuvieron en cámara húmeda durante 15 a 20 horas. Al cabo de este tiempo, con ayuda del microscopio de disección se localizaron las conidias sobre las manchas necróticas y se transfirieron directamente al medio de cultivo removiéndolas con una aguja, previamente desinfestada y humedecida con el medio para facilitar la adherencia.

2. El medio papa-dextrosa-agar permitió una abundante esporulación de C. musae. Veinte gm. de dextrosa por litro de medio fué la concentración óptima para la esporulación. A concentraciones menores de 20 gm. disminuyeron la esporulación y el crecimiento vegetativo. A concentraciones mayores de 20 gm. disminuyó la esporulación y aumentó el crecimiento vegetativo.

Cultivos originados de conidias naturales que habían dejado de esporular, volvían a esporular intensamente al transferir fragmentos de su micelio a nuevo mdeio de papa-dextrosa-agar. Sin embargo, segundas transferencias de micelio de estos cultivos presentaban muy poca o ninguna esporulación.

Resumen

1. De varias técnicas empleadas para aislar el C. musae en cultivo puro, la más satisfactoria fué la siguiente: hojas de banano infectadas se mantuvieron en cámara húmeda durante 15 a 20 horas. En caso de este tiempo, con ayuda del microscopio de disección se localizaron las conidias sobre las manchas necróticas y se transfirieron directamente al medio de cultivo removiéndolas con una aguja, previamente desinfestada y humedecida con el medio para facilitar la adherencia.

2. El medio papa-dextrosa-agar permitió una abundante esporulación de C. musae. Veinte gm. de dextrosa por litro de medio fué la concentración óptima para la esporulación. A concentraciones menores de 20 gm. cianuro- yeron la esporulación y el crecimiento vegetativo. A concentraciones mayores de 20 gm. disminuyó la esporulación y aumentó el crecimiento vegetativo.

Cultivos originados de conidias naturales que habían dejado de esporular, volvían a esporular intensamente al transferir fragmentos de su micelio a nuevo medio de papa-dextrosa-agar. Sin embargo, segundas transferencias de micelio de estos cultivos presentaron muy poca o ninguna esporulación.

Una intensa esporulación se consiguió mantener en cultivos hasta 12 generaciones, mediante sucesivas transferencias de micelio con conidias a nuevo medio de papa-dextrosa-agar, entre 7 a 14 días de intervalo.

3. Ciertos requerimientos de nutrición de C. musae fueron estudiados en medio sintético glucosa-caseína hidrolizada. El organismo no creció en el medio basal sin vitaminas adicionadas. Tiamina y biotina, especialmente tiamina, mostraron ser las vitaminas más esenciales para el crecimiento del hongo. La utilización de estas dos vitaminas estuvo condicionada por la presencia o ausencia de fuentes de nitrógeno y de carbono. La aireación y el pH inicial del medio de cultivo también tuvieron alguna influencia en la utilización de la tiamina cuando se usó sola y en combinación con biotina.

De 6 concentraciones de tiamina ensayadas, 12.5 microgramos por litro de medio fué la mejor para el desarrollo del hongo.

Los pH iniciales 4.5 y 5.5 fueron los más favorables para la rata y cantidad de crecimiento del organismo. A pH iniciales de 6.5, 7.5 y 8.5 el desarrollo fué un poco inferior.

El C. musae no mostró mucha especificidad en cuanto a las diferentes fuentes de nitrógeno y de carbono ensayadas. Sucrosa fué la mejor fuente de carbono; maltosa,

Una intensa esporulación se consiguió mantener en cultivos hasta 12 generaciones, mediante sucesivas transferencias de micelio con conidias a nuevo medio de papadextrosa-agar, entre 7 a 14 días de intervalo.

3. Ciertos requerimientos de nutrición de C. musae fueron estudiados en medio sintético glucosa-caseína hidrolizada. El organismo no creció en el medio basal sin vitaminas adicionadas. Tiamina y biotina, especialmente tiamina, mostraron ser las vitaminas más esenciales para el crecimiento del hongo. La utilización de estas dos vitaminas estuvo condicionada por la presencia o ausencia de fuentes de nitrógeno y de carbono. La aireación y el pH inicial del medio de cultivo también tuvieron algunas influencia en la utilización de la tiamina cuando se usó sola y en combinación con biotina.

De 6 concentraciones de tiamina ensayadas, 12.5 microgramos por litro de medio fue la mejor para el desarrollo del hongo.

Los pH iniciales 4.5 y 5.5 fueron los más favorables para la rata y cantidad de crecimiento del organismo. A pH iniciales de 6.5, 7.5 y 8.5 el desarrollo fue un poco inferior.

El C. musae no mostró mucha especificidad en cuanto a las diferentes fuentes de nitrógeno y de carbono ensayadas. Sucrosa fue la mejor fuente de carbono; maltosa,

galactosa, glucosa, fructosa y lactosa fueron satisfactorias fuentes de carbono; mannitol, regular; y sorbitol, mala. El hongo fué capaz de usar todos los compuestos empleados como fuentes de nitrógeno. El orden de utilización fué el siguiente: caseína hidrolizada, urea, asparagina, nitrato de potasio, sulfato de amonio, nitrato de amonio y ácido aspártico. En ausencia de fuente de nitrógeno, el hongo no hizo absolutamente ningún crecimiento. Nitrato de potasio fué la mejor fuente de nitrógeno para la esporulación.

Se necesita realizar más estudios sobre los factores de nutrición que influyen en la reproducción de C. musae.

galactosa, glucosa, fructosa y lactosa fueron satisfactorias fuentes de carbono; manitol, regular; y sorbitol, mala. El hongo fué capaz de usar todos los compuestos empleados como fuentes de nitrógeno. El orden de utilización fué el siguiente: caseína hidrolizada, urea, asparagina, nitrato de potasio, sulfato de amonio, nitrato de amonio y ácido aspártico. En ausencia de fuente de nitrógeno, el hongo no hizo absolutamente ningún crecimiento. Nitrato de potasio fué la mejor fuente de nitrógeno para la esporulación.

Se necesita realizar más estudios sobre los factores de nutrición que influyen en la reproducción de C. musae.

## SUMMARY

1. Of the various methods used to isolate C. musae in pure culture the method found to give best results has been as follows: The leaf material collected in the field is washed and placed in a moist chamber for 15 to 20 hours. At the end of this period, emerging conidia may be seen by the use of the dissecting microscope. These conidia are then transferred by means of a dissecting needle to the media to be inoculated.

2. The media potato-dextrose-agar permitted an abundant sporulation of C. musae. Twenty gm. of dextrose per liter of media was the optimum concentration for sporulation. At concentrations lower than 20 gm., sporulation and vegetative growth decreased. At concentrations higher than 20 gm., sporulation decreased but vegetative growth increased. Conidial isolations that had stopped sporulating, again sporulated intensely when fragments of mycelium were transferred to a fresh potato-dextrose-agar media. However, second transfers of mycelium from these cultures showed very little or no sporulation at all. It was possible to maintain an intense sporulation in cultures up to 12 generations, by means of successive transfers of mycelium with conidia to a fresh media of potato-dextrose-

## SUMMARY

1. Of the various methods used to isolate C. musae in pure culture the method found to give best results has been as follows: The leaf material collected in the field is washed and placed in a moist chamber for 15 to 20 hours. At the end of this period, emerging conidia may be seen by the use of the dissecting microscope. These conidia are then transferred by means of a dissecting needle to the media to be inoculated.

2. The media potato-dextrose-agar permitted an abundant sporulation of C. musae. Twenty gm. of dextrose per liter of media was the optimum concentration for sporulation. At concentrations lower than 20 gm., sporulation and vegetative growth decreased. At concentrations higher than 20 gm., sporulation decreased but vegetative growth increased. Conidial isolations that had stopped sporulating, again sporulated intensely when fragments of mycelium were transferred to a fresh potato-dextrose-agar media. However, second transfers of mycelium from these cultures showed very little or no sporulation at all. It was possible to maintain an intense sporulation in cultures up to 12 generations, by means of successive transfers of mycelium with conidia to a fresh media of potato-dextrose-

agar, at intervals of 7 to 14 days.

3. Certain nutritional requirements of C. musae in glucose-caseine-hydrolisate, a synthetic media, were studied. The organism did not grow in the basal media without added vitamins. Thiamine and biotin, especially thiamine, were found to be the most essential vitamins for the growth of the organism. The utilization of these 2 vitamins was conditioned by the presence or absence of sources of nitrogen and carbon. Aeration and the initial pH of the culture media also affected the utilization of thiamine when used alone and in combination with biotin.

Of 6 different concentrations of thiamine tried, 12.5 micrograms per liter of media was the best for the development of the fungus.

Initial pH 4.5 and 5.5 were the most favorable for the rate and amount of growth of the organism. At initial pH 6.5, 7.5, and 8.5, fungus development was somewhat inferior.

C. musae showed little specificity with regard to the different sources of nitrogen and carbon tried. Sucrose was the best source of carbon; maltose, galactose, glucose, fructose, and lactose were satisfactory sources of carbon; mannitol was a poor source, and sorbitol a very poor source of carbon. The fungus was able to use all the compounds tried as sources of nitrogen. The order of

ager, at intervals of 7 to 14 days.

3. Certain nutritional requirements of C. Musae in glucose-casein-hydrolysate, a synthetic media, were studied. The organism did not grow in the basal media without added vitamins. Thiamine and biotin, especially thiamine, were found to be the most essential vitamins for the growth of the organism. The utilization of these 2 vitamins was conditioned by the presence or absence of sources of nitrogen and carbon. Aeration and the initial pH of the culture media also affected the utilization of thiamine when used alone and in combination with biotin.

Of 6 different concentrations of thiamine tried, 12.5 micrograms per liter of media was the best for the development of the fungus.

Initial pH 4.5 and 5.5 were the most favorable for the rate and amount of growth of the organism. At initial pH 6.5, 7.5, and 8.5, fungus development was somewhat inferior.

C. Musae showed little specificity with regard to the different sources of nitrogen and carbon tried. Sucrose was the best source of carbon; maltose, galactose, glucose, fructose, and lactose were satisfactory sources of carbon; mannitol was a poor source, and sorbitol a very poor source of carbon. The fungus was able to use all the compounds tried as sources of nitrogen. The order of

utilization was as follows: caseine-hydrolisate, urea, asparagine, potassium nitrate, ammonium sulfate, ammonium nitrate and aspartic acid. In the absence of a nitrogen source the fungus did not grow at all. Potassium nitrate was the best source of nitrogen for sporulation.

More studies are needed on the factors of nutrition that influence reproduction in C. musae.

utilization was as follows: casein > asparagine, urea, ammonium nitrate > potassium nitrate, sodium nitrate, nitrite and amino acids. In the absence of a nitrogen source the fungus did not grow at all. Potassium nitrate was the best source of nitrogen for sporulation.

More studies are needed on the factors of nutrition that influence reproduction in C. lunata.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barnett, H. L. and Lilly, V. G. The effects of biotin upon the formation and development of perithecia, asci and ascospores by Sordaria fimicola Ces. and De Not. American Journal of Botany 34(4):196-204. 1947.

2. Burkholder, P. R. and Sinnott, E. W. Morphogenesis of fungus colonies in submerged shaken cultures. American Journal of Botany 32(7):424-431. 1945.

3. Dantas, Bento. A. ocorrencia da "Cercosporiose" da bananeira no Brazil. Brasil, Instituto Agronomico Do Norte Boletim Tecnico No. 14. 1948. 45 p.

4. Diachum, Stephen and Valleau, W. D. Conidial production in culture by Cercospora nicotianae. Phytopathology 31(1):97-98. 1941.

5. Dickinson, Sydney. The technique of isolation in microbiology. Phytopathology 23(4):357-367. 1933.

6. Duggar, B. M. Three important fungus diseases of sugar beet. New York (Cornell) Agricultural Experiment Station Bulletin No. 163:339-363. 1899.

7. _____ and Baily, L. J. Two destructive celery blights. A. Early blight. New York (Cornell) Agricultural Experiment Station Bulletin No. 132:201-220. 1897.

8. Ezequiel, W. N. Modified procedure with the Keitt single-spore method. Phytopathology 20(7): 583-586. 1930.

9. Hansberry, Roy, Modesto, California. Culture of Cercospora musae isolated at the Inter-American Institute of Agricultural Sciences. Personal communication 1952.

BIBLIOGRAFIA

1. Barnett, H. L. and Lilly, V. G. The effects of biotin upon the formation and development of perithecia, asci and ascospores by Sordaria fimicola Ces. and De Not. American Journal of Botany 34(4):196-204. 1947.

2. Burkholder, P. R. and Sinnott, E. W. Morphogenesis of fungus colonies in submerged shaken cultures. American Journal of Botany 32(7):452-431. 1945.

3. Dantas, Benito. A. ocorrencia da "Cercosporiose" da bananeira no Brazil. Brasil, Instituto Agronomico Do Norte. Boletim Tecnico No. 14. 1948. 45 p.

4. Dickum, Stephen and Vallean, W. D. Conidial production in culture by Cercospora nicotianae. Phytopathology 31(1):97-98. 1941.

5. Dickinson, Sydney. The technique of isolation in microbiology. Phytopathology 23(4):357-367. 1933.

6. Duggar, B. M. Three important fungus diseases of sugar beet. New York (Cornell) Agricultural Experiment Station Bulletin No. 163:339-363. 1899.

7. _____ and Daily, L. J. Two destructive celery blights. A. Early blight. New York (Cornell) Agricultural Experiment Station Bulletin No. 132:201-220. 1897.

8. Exquiel, W. M. Modified procedure with the Leitt single-spore method. Phytopathology 20(7): 563-566. 1930.

9. Hansberry, Roy, Rodesto, California. Culture of Cercospora musae isolated at the Inter-American Institute of Agricultural Sciences. Personal communication 1952.

10. Hawker, L. E. Further experiments on growth and fruiting of Melanospora destruens Shear. in the presence of various carbohydrates, with special reference to the effects of glucose and sucrose. Annals of Botany (n.s.) 11:245-260. 1947.

11. _____ The influence of various sources of carbon on the formation of perithecia by Melanospora destruens Shear. in the presence of accessory growth factors. Annals of Botany (n.s.) 3: 455-468. 1939.

12. _____ The nature of the accessory growth factors influencing growth and fruiting of Melanospora destruens Shear. and of some other fungi. Annals of Botany (n.s.) 3:657-671. 1939.

13. Henry, B. W. and Andersen, A. L. Sporulation by Piricularia orizae. Phytopathology 38(4): 265-278. 1948.

14. Hildebrand, E. M. Techniques for the isolation of single microorganisms. Botanical Review 4(12): 627-664. 1938.

15. _____ Techniques for the isolation of single microorganisms. II. Botanical Review 16(4):181-207. 1950.

16. Hopkins, E. F. Studies on the Cercospora leaf spot of bur clover. Phytopathology 11(8):311-318. 1921.

17. Horr, W. W. Utilization of galactose by Aspergillus niger and Penicillium glaucum. Plant Physiology 11:81-99. 1936.

18. Jenkins, W. A. The cherry leaf-spot fungus, Mycosphaerella cerasella Aderh., its morphology and life history. Phytopathology 20(4):329-337. 1930.

19. Keitt, G. W. Single technique for isolating single-spore strains of certain types of fungi. Phytopathology 5(5):266-269. 1915.

10. Hawker, L. E. Further experiments on growth and fruiting of Melanospora destruens Shear. in the presence of various carbohydrates, with special reference to the effects of glucose and sucrose. Annals of Botany (n.s.) 11:245-260. 1947.

11. _____ The influence of various sources of carbon on the formation of perithecia by Melanospora destruens Shear. in the presence of accessory growth factors. Annals of Botany (n.s.) 3: 455-468. 1939.

12. _____ The nature of the accessory growth factors influencing growth and fruiting of Melanospora destruens Shear. and of some other fungi. Annals of Botany (n.s.) 3:657-671. 1939.

13. Henry, B. W. and Andersen, A. L. Sporulation by filicularis crizae. Phytopathology 38(4): 265-278. 1948.

14. Hildebrand, E. M. Techniques for the isolation of single microorganisms. Botanical Review 4(12): 627-664. 1938.

15. _____ Techniques for the isolation of single microorganisms. II. Botanical Review 16(4):181-207. 1950.

16. Hopkins, E. F. Studies on the Cercospora leaf spot of bur clover. Phytopathology 11(8):311-316. 1921.

17. Horr, W. W. Utilization of galactose by Aspergillus niger and Penicillium glaucum. Plant Physiology 11:81-99. 1936.

18. Jenkins, W. A. The cherry leaf-spot fungus, Coccosphaerella cerasella Aderh., its morphology and life history. Phytopathology 20(4):329-337. 1930.

19. Kelly, G. W. Single technique for isolating single spore strains of certain types of fungi. Phytopathology 5(5):266-269. 1915.

20. Leach, R. Banana leaf spot (Mycosphaerella musicola) on the Gros Michel variety in Jamaica; investigations on the oetiology of the disease and the principles of control by spraying. Kingston, Jamaica, The Government Printer, 1946. 118 p.

21. _____ Banana leaf spot investigations. I. The basis of control. Jamaica Department of Science and Agriculture Bulletin No. 26. 1941. 8 p.

22. Leben, Curt and Keitt, G. H. Venturia inaequalis (Cke.) Wint. V. The influence of carbon and nitrogen sources and vitamins on growth in vitro. American Journal of Botany 35(6):337-343. 1948.

23. Leonian, H. L. and Lilly, V. G. Studies on the nutrition of fungi. I. Thiamine, its constituents, and the source of nitrogen. Phytopathology 28(8):531-548. 1938.

24. _____ and Lilly, V. G. Studies on the nutrition of fungi. V. Factors affecting zygospore formation in Phycomyces blakesleeanus. American Journal of Botany 27(8):670-675. 1940.

25. Lewis, R. W. A method of inducing spore production by Cercospora apii Fres. in pure culture. Phytopathology 30(7):623. 1940.

26. Lilly, V. G. and Barnett, H. L. Physiology of the fungi. New York, McGraw-Hill Book Co. 1951. 463 p.

27. _____ and Barnett, H. L. The influence of pH and certain growth factors on mycelial growth and perithecial formation by Sordaria fimicola. American Journal of Botany 34(3):131-138. 1947.

28. Magie, R. O. Variability of monosporic cultures of Coccomyces hiemalis. Phytopathology 25(2): 131-159. 1935.

29. Margolin, A. E. Effect of various carbohydrates on the growth of some fungi. Unpublished thesis. Morgantown, West Virginia University, 1942. (Original no disponible para consultar; citado

20. Leach, R. Banana leaf spot (Mycosphaerella musicola) on the Gros Michel variety in Jamaica; investigations on the oetiology of the disease and the principles of control by spraying. Kingston, Jamaica, The Government Printer, 1946. 118 p.

21. _____ Banana leaf spot investigations. I. The basis of control. Jamaica Department of Science and Agriculture Bulletin No. 26. 1941. 8 p.

22. Leben, Curt and Keitt, G. H. Venturia inaequalis (Cke.) Wint. V. The influence of carbon and nitrogen sources and vitamins on growth in vitro. American Journal of Botany 35(6):337-343. 1948.

23. Leonian, H. L. and Lilly, V. G. Studies on the nutrition of fungi. I. Thiamine, its constituents, and the source of nitrogen. Phytopathology 28(8):731-746. 1938.

24. _____ and Lilly, V. G. Studies on the nutrition of fungi. V. Factors affecting zygospore formation in Phycomyces blakesleeanus. American Journal of Botany 27(8):670-675. 1940.

25. Lewis, R. W. A method of inducing spore production by Cercospora apii Fres. in pure culture. Phytopathology 30(7):623. 1940.

26. Lilly, V. G. and Barnett, H. L. Physiology of the fungi. New York, McGraw-Hill Book Co. 1951. 463 p.

27. _____ and Barnett, H. L. The influence of pH and certain growth factors on mycelial growth and perithecial formation by Sordaria fimicola. American Journal of Botany 34(3):131-138. 1947.

28. Magie, R. C. Variability of monosporic cultures of Coccomyces hiemalis. Phytopathology 25(2): 131-139. 1935.

29. Margolin, A. E. Effect of various carbohydrates on the growth of some fungi. Unpublished thesis. Morgantown, West Virginia University, 1942. (Original no disponible para consultar; citado

por Lilly, V. G. and Barnett, H. L. The influence of pH and certain growth factors on mycelial growth and perithecial formation by Sordaria fimicola. American Journal of Botany 34(3):131-138. 1947.)

30. Martyn, E. B. Diseases of plants in Jamaica. Jamaica Department of Science and Agriculture Bulletin No. 32 (n.s.) 1942. 34 p.

31. Mathur, R. S., Barnett, H. L. and Lilly, V. G. Sporulation of Colletotrichum lindemuthianum in culture. Phytopathology 40(1):104-114. 1950.

32. Meredith, C. H. and Butler, A. F. The production of Cercospora musae conidia in banana leaf agar. Jamaica Agr. Soc. Jour. 43(12):621. 1939.

33. Mix, A. J. Factors affecting the sporulation of Phyllosticta solitaria in artificial culture. Phytopathology 23(6):503-524. 1933.

34. Munsell, H. E. and others. Composition of food plants of Central America. VI. Costa Rica. Food Research 15(5):379-404. 1950.

35. Nagel, C. M. Conidial production in species of Cercospora in pure culture. Phytopathology 24(10):1101-1110. 1934.

36. _____ and Dietz, S. M. Sporulation of 5 species of Cercospora in pure culture. Phytopathology 22(1):20. 1931.

37. Riker, A. J. and Riker, R. S. Introduction to research on plant diseases; a guide to the principles and practices for studying various plant-disease problems. St. Louis, John S. Swift Co., 1936. 117 p.

38. Robbins, W. J. and Kavanagh, F. Vitamin $B_1$ or its intermediates and growth of certain fungi. American Journal of Botany 25(4):229-236. 1938.

por Lilly, V. G. and Barnett, H. L. The influence of pH and certain growth factors on mycelial growth and perithecial formation by Sordaria fimicola. American Journal of Botany 34(3):131-138. 1947.)

30. Martyn, R. L. Diseases of plants in Jamaica. Jamaica Department of Science and Agriculture Bulletin No. 32 (n.s.) 1942. 34 p.

31. Mathur, R. S., Barnett, H. L. and Lilly, V. G. Sporulation of Colletotrichum lindemuthianum in culture. Phytopathology 40(1):104-114. 1950.

32. Meredith, C. H. and Butler, A. P. The production of Cercospora musae conidia in banana leaf agar. Jamaica Agr. Soc. Jour. 43(12):621. 1939.

33. Nix, A. J. Factors affecting the sporulation of Phyllosticta solitaria in artificial culture. Phytopathology 23(6):503-524. 1933.

34. Nunnell, H. E. and others. Composition of food plants of Central America. VI. Costa Rica. Food Research 12(5):379-404. 1950.

35. Nagel, C. M. Conidial production in species of Cercospora in pure culture. Phytopathology 24(10):1101-1110. 1934.

36. _____ and Diets, S. J. Sporulation of 5 species of Cercospora in pure culture. Phytopathology 22(1):20. 1931.

37. Riker, A. J. and Riker, R. S. Introduction to research on plant diseases; a guide to the principles and practices for studying various plant-disease problems. St. Louis, John S. Swift Co., 1936. 117 p.

38. Robbins, W. J. and Ravenagh, F. Vitamin B1 or its intermediates and growth of certain fungi. American Journal of Botany 25(4):229-236. 1938.

39. Schopfer, W. H. Plants and vitamins. Waltham, Mass., Chronica Botanica Co., 1943. 293 p.

40. Simmonds, J. H. Banana leaf spot. Queensland Agricultural Journal 39(1):21-40. 1933.

41. _____ Influence of seasonal conditions on the development of Cercospora leaf spot of the banana, with special reference to the control programme. Queensland Agricultural Journal 52(6):633-647. 1939.

42. Stahel, G. Banana leaf spot (Cercospora musae). Tropical Agriculture (Trinidad) 14(3):59-60. 1937.

43. _____ Notes on Cercospora leaf spot of bananas (Cercospora musae). Tropical Agriculture (Trinidad) 14(9):257-264. 1937.

44. Starks, O. B. and Koffler, H. Aerating liquids by agitating on a mechanical shaker. Science 109(2837):495-496. 1949.

45. Steinberg, R. A. Growth of fungi in synthetic nutrient solutions. Botanical Review 5(6): 327-350. 1939.

46. Tipler, R. V. La mancha de la hoja en el bananero (Mycosphaerella musicola Leach); la enfermedad y su control. Revista Fitopatológica Mundial 1(2):43-52. 1949.

47. Ward, F. S. Cercospora leaf spot of bananas. Jamaica Department of Science and Agriculture Bulletin No. 15 (n.s.) 1938. 7 p.

48. Wardlaw, C. W. Banana disease. IX. The occurrence of Sigatoka disease (Cercospora musae Zimm.) on bananas in Trinidad. Tropical Agriculture (Trinidad) 11(7):173-175. 1934.

49. Welles, C. G. Cercospora leaf spot of eggplant. Phytopathology 12(2):61-65. 1922.

39. Schopfer, W. H. Plants and vitamins. Waltham, Mass., Chronica Botanica Co., 1943. 253 p.

40. Simmonds, J. H. Banana leaf spot. Queensland Agricultural Journal 39(1):21-40. 1933.

41. _____ Influence of seasonal conditions on the development of Cercospora leaf spot of the banana, with special reference to the control programme. Queensland Agricultural Journal 52(6):633-647. 1939.

42. Stahel, G. Banana leaf spot (Cercospora musae). Tropical Agriculture (Trinidad) 14(3):59-60. 1937.

43. _____ Notes on Cercospora leaf spot of bananas (Cercospora musae). Tropical Agriculture (Trinidad) 14(9):257-264. 1937.

44. Starks, O. B. and Koffler, H. Aerating liquids by agitating on a mechanical shaker. Science 106(2763):495-496. 1947.

45. Steinberg, R. A. Growth of fungi in synthetic nutrient solutions. Botanical Review 5(6): 327-350. 1939.

46. Tipler, R. V. La mancha de la hoja en el banano (Mycosphaerella musicola Leach); la enfermedad y su control. Revista Fitopatológica Mundial 1(2):43-52. 1943.

47. Ward, F. D. Cercospora leaf spot of bananas. Jamaica Department of Science and Agriculture Bulletin No. 15 (n.s.) 1936. 7 p.

48. Wardlaw, C. W. Banana disease. IX. The occurrence of Sigatoka disease (Cercospora musae Zimm.) on bananas in Trinidad. Tropical Agriculture (Trinidad) 11(7):173-175. 1934.

49. Welles, C. G. Cercospora leaf spot of eggplant. Phytopathology 12(2):61-65. 1922.

50. Westergaard, M. and Mitchell, H. K. Neurospora V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. American Journal of Botany 34(10):573-577. 1947.

51. Wolf, F. A. and Wolf, F. T. The fungi. New York, John Wiley and Sons, 1947. v. 1, 438 p.

52. Zscheile, P. F. Nutrient studies with the wheat bunt fungus, Tilletia caries. Phytopathology 41(12):1115-1124. 1951.

50. Westergaard, M. and Mitchell, H. K. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. American Journal of Botany 34(10):573-577. 1947.

51. Wolf, F. A. and Wolf, F. T. The fungi. New York, John Wiley and Sons, 1947. v. 1, 438 p.

52. Zscheile, F. P. Nutrient studies with the wheat bunt fungus, *Tilletia caries*. Phytopathology 41(10):1115-1124. 1951.

Thesis
.F363e

16901

Fernández B., Octavio
Estudios sobre la nutrición y desarrollo del Cercospora musae ...

| DATE | ISSUED TO |
| --- | --- |
| 16-V | María Dolores |
| 15 | Felipe Wong Rey |
| | Felipe Wong Rey (sala) |
| 5 ENE 1966 | |

Thesis
.F363e

16901