

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE CONIDIOS DE *Cercospora coffeicola*

Óscar Adrián Guzmán-Piedrahíta* ; Carlos Alberto Rivillas-Osorio**

RESUMEN

GUZMÁN P., O. A.; RIVILLAS O., C. A. Producción *in vitro* de conidios de *Cercospora coffeicola*. Cenicafé 56(1): 67-77. 2005.

Con el objeto de conocer su biología, se aisló *Cercospora coffeicola* de hojas de la variedad de café Caturra con síntomas de la enfermedad y se purificó e incrementó en PDA. Para evaluar su esporulación, se sembró *in vitro* en laboratorio y en fitotrón, en los medios avena agar – CAA, con dos proporciones del extracto de hojas de café (100 y 400g.L⁻¹ de agua) y en jugo V₈. Se sembraron 0,1; 0,5; y 1,0mL de suspensión micelial y 1,0cm² de micelio como inóculo. Se empleó un diseño experimental completamente aleatorio con 12 tratamientos y 8 repeticiones. Se evaluó la esporulación a los 15 y a los 25 días después de la siembra (DDS). En el fitotrón los tratamientos en el medio CAA (400g.L⁻¹ de agua) con 1mL de suspensión micelial y 1,0cm² de micelio fueron estadísticamente iguales, presentando la mayor producción de conidios a los 15DDS, mientras que a los 25DDS la producción de conidios fue similar entre tratamientos. En jugo V₈, a los 15DDS se produjeron conidios en el tratamiento con 1,0cm² de micelio y a los 25DDS el promedio de conidios en los 4 tipos de inóculo fue estadísticamente igual. El mejor resultado se obtuvo con el medio CAA (400g.L⁻¹) en fitotrón.

Palabras claves: Mancha de hierro, medios de cultivo, CAA, PDA, jugo V₈, esporulación, laboratorio, fitotrón

ABSTRACT

In order to know its biology *Cercospora coffeicola* was isolated from Caturra coffee variety leaves that exhibited symptoms of the disease, it was also purified and increased in PDA. To evaluate its sporulation, it was sown *in vitro* in laboratory and in phytotron, in the media oaths agar–CAA, with two proportions of coffee leaves extract (100 and 400g.L⁻¹ of water) and in juice V₈. It was sown 0.1; 0.5; and 1.0mL conidial of suspension and 1.0 cm² of mycelium as inoculum. A totally randomized experimental design was used with 12 treatments and 8 repetitions. The sporulation was evaluated 15 and 25 days after the sowing (SD: shadow days). In the phytotron the treatments in the media CAA (400g.L⁻¹ of water) with 1mL of conidial suspension and 1.0cm² of mycelium were statistically equal, displaying the largest conidia production after 15SD, while after 25SD the conidia production was similar among treatments. In juice V₈, after 15SD conidia took place in the treatment with 1.0 cm² of mycelium and after 25SD the conidia average in the 4 inoculum types was statistically equal. The best result was obtained with the CAA medium (400g. L⁻¹) in phytotron.

Keywords: Iron spot disease, sowing media, CAA, PDA, juice V8, sporulation, laboratory, phytotron.

* Ingeniero Agrónomo. Investigador Asociado. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

** Asistente de Investigación. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

La mancha de hierro del cafeto causada por el hongo *Cercospora coffeicola* es una enfermedad de importancia económica en Colombia, debido a que afecta las plantas de café en todos sus estados de desarrollo, y especialmente aquellas que se han desarrollado en suelos con bajo contenido de nutrimentos, a plena exposición solar y sin aplicación de fungicidas. En condiciones de almácigo, el hongo ataca las hojas y produce lesiones circulares de color pardo claro o marrón rojizo, de diferente tamaño, las cuales reducen el área foliar funcional, y por ende, la producción de fotosintatos que son necesarios para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas. Así mismo, las hojas enfermas caen prematuramente y esta defoliación puede alcanzar valores hasta del 90% en plantas de seis meses de edad, disminuyendo su vigor y causando hasta la muerte cuando es muy alta la severidad de la enfermedad.

Cuando el ataque del hongo ocurre durante la formación de los frutos, generalmente se presenta caída de éstos, sin embargo, aún no se han cuantificado estas pérdidas. Finalmente, en frutos formados la mancha de hierro deteriora la calidad del producto debido a que se obtiene un alto porcentaje de café "pasilla", lo cual dificulta el beneficio y conlleva a una deficiente conversión de café cereza a café pergamino seco, con pérdidas que pueden llegar al 30% del valor total de la cosecha (1, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 17).

Tejidos foliares necrosados por *C. coffeicola* en condiciones de alta humedad en el campo o en el laboratorio (en cámara húmeda), tienen buena esporulación a 24°C en 24h. Sobre las lesiones se observa un desarrollo felposo de color grisáceo, el cual en su conjunto está constituido por los conidióforos y los conidios del hongo. Los conidióforos se caracterizan por ser septados,

son oscuros, rectos, flexuosos, fasciculados, sinuosos y dentados. La base es arracimada y bastante tuberculada. Los conidios son individuales, hialinos, pluriseptados, lisos, de forma alargada y tamaño variable; estos se desprenden y son llevados por el viento a grandes distancias (4, 6, 7, 8, 9).

En medios de cultivo artificiales, las especies del género *Cercospora* generalmente presentan escaso desarrollo y baja esporulación (2, 4, 7, 15). Por esta razón, se han desarrollado trabajos tendientes a inducir la producción de conidios de distintas especies de este género en medios de cultivo artificiales, con el fin de facilitar las investigaciones sobre nutrición, biología, patología y mejoramiento genético.

En un experimento realizado por Echandi (8), en el cual se sembró *C. coffeicola* en el medio de cultivo agar - hojas de zanahoria, en un ambiente a 24°C, después de 8 días, se obtuvieron conidios con tamaños que fluctuaron entre 65 y 235µm de largo, con 4 y 5µm de ancho. En otro experimento empleando el mismo medio de cultivo en condiciones: de oscuridad, 12h de luz y 12h de oscuridad, y con luz durante 24h, se encontró que después de 5 días hubo suficiente esporulación del hongo, y no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos, no obstante, no se cuantificaron los conidios producidos por el hongo.

Castaño (7), en cajas de Petri con el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) no acidificado, encontró que *C. coffeicola* creció bien en temperaturas entre 20 y 26°C, encontrándose una temperatura óptima alrededor de 24°C. Cadena (5), en condiciones de laboratorio encontró esporulación del hongo en el medio de cultivo extracto de hojas de café a los 15 días; en este estudio no se hizo recuento de conidios.

Buitrago y Fernández (4), encontraron que *C. coffeicola* presentaba una mayor esporulación cuando las colonias se mantenían bajo las condiciones de 15h de luz y 9h de oscuridad, a temperatura ambiente en el laboratorio de Cenicafé, en comparación con las condiciones del fitotrón, 9h de luz y 15h de oscuridad; con lo cual se comprobó la influencia de la luz sobre la esporulación del hongo. Así mismo, al utilizar los medios de cultivo de cocción de hojas de café agar (entre 100 y 400g) y extracto de café agar, la esporulación se incrementó con el aumento en la proporción de hojas y granos de café empleados en su preparación.

Teniendo en cuenta los anteriores trabajos donde la producción de conidios de *C. coffeicola* fue más rápida y estable en condiciones de laboratorio y, con el propósito de conocer nuevos aspectos relacionados con la biología del hongo, se efectuó el presente estudio el cual tuvo como objetivo determinar bajo dos condiciones experimentales (fitotrón y laboratorio) la producción *in vitro* de conidios de *C. coffeicola* en los medios de cultivo extracto de hojas de café avena agar (CAA) y jugo V₈.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Centro Nacional de Investigaciones de Café- Cenicafé, ubicado a una altitud de 1.400m, con una temperatura promedio de 21,5°C, humedad relativa promedio de 79,5% y precipitación anual de 2.662mm.

En la Subestación Experimental Maracay, ubicada en el departamento del Quindío (18), se recolectaron muestras de hojas de café de la variedad Caturra en estado de almácigo, infectadas por *C. coffeicola*, y posteriormente, se aisló, purificó e incrementó el hongo en

el laboratorio de Fitopatología de Planalto, Cenicafé.

Para aislar el hongo, se seleccionaron hojas con síntomas característicos de la mancha de hierro, luego se lavaron con agua corriente y se desinfectaron sumergiéndolas en agua destilada estéril (ADE) durante 5 minutos y, posteriormente, se lavaron durante un minuto con ADE. Después, las hojas se colocaron en cámara húmeda (100% de humedad relativa y 24°C) durante 20 horas y en completa oscuridad (18). Cuando se observó la esporulación de *C. coffeicola* en las hojas, en la cámara de flujo laminar y con la ayuda de un estereoscopio, se localizaron los conidios sobre las lesiones y se transfirieron a 20 cajas de Petri, las cuales contenían 20mL de medio de cultivo PDA estéril y acidificado (39g.L⁻¹ de agua, ácido láctico del 90% y pH 4,0). Las cajas se incubaron en el interior de un mesón del laboratorio durante 15 días y en oscuridad para estimular la formación de micelio, después se tomaron muestras de aquellas que presentaron crecimientos puros y se transfirieron a los medios de cultivo extracto de hojas de café, avena agar (CAA) y jugo V₈, por ser selectivos para el crecimiento de este hongo.

Posteriormente, se prepararon dos medios de cultivo de CAA por separado, con 100 y 400g de hojas jóvenes de café por litro de agua, las cuales se obtuvieron de un lote de café variedad Caturra donde no se habían aplicado fungicidas. Las hojas se lavaron con agua corriente, se picaron y se licuaron en 800mL de ADE a 2.800r.p.m., durante 3 minutos; el extracto se filtró a través de una gasa doble. En cada uno de los medios de cultivo se adicionó una mezcla de 40g de harina de avena Quaker® disueltos en 400mL de ADE, la cual previamente se cocinó durante 10 minutos y se filtró a través de una gasa doble. Después de mezcladas cada una

de las soluciones, se adicionó agua destilada hasta completar 1L, se ajustó el pH a 7,0 con KOH 1N y se adicionó agar-agar al 1,5%; esta mezcla se esterilizó en un autoclave a 121°C y 15 PSI, durante 20 minutos. Luego se sirvieron 20mL del medio de cultivo por caja de Petri. El medio de cultivo agar V₈ modificado se preparó utilizando 100mL de jugo V₈.L⁻¹ de agua, 0,2g de CaCO₃ agar-agar al 1,5% y pH 6,0.

Las colonias obtenidas en el medio de cultivo PDA se depositaron en un beaker que contenía 100mL de agua destilada estéril y se agitó la mezcla durante 3 minutos para obtener una buena dispersión de los fragmentos miceliales en el agua. Posteriormente, con una micropipeta se tomaron varias alícuotas de suspensión micelial y se dispersaron en las cajas de Petri que contenían el medio de cultivo CAA. Finalmente, se movieron suavemente las cajas para dispersar la suspensión micelial por toda la superficie del medio de cultivo (11). Del resto de colonias obtenidas de las cajas de Petri (15 cajas), se tomó 1cm² de agar con micelio, el cual se sembró en el centro de cada una de las cajas de Petri, junto con los diferentes medios de cultivo. Las cajas se incubaron en una mesa de laboratorio, a 6m de distancia de la luz, durante aproximadamente 15 horas de luz y 9 horas de oscuridad. En el fitotrón, las cajas se incubaron a 24°C, 65% de HR, con 12 lámparas de luz fluorescente continua de 20 watts cada una a 20cm de distancia de las cajas de Petri, un ventilador para la circulación del aire y aire acondicionado con termostato en 9 y selector en medio frío, durante 25 días para la producción de conidios. Tanto en las condiciones de laboratorio como las del fitotrón, se dispuso de un termohigrógrafo.

Para contar los conidios se preparó una suspensión de conidios a partir del raspado de la superficie de una colonia disuelto en

10mL de agua destilada estéril; luego se depositó en un Beaker de 50mL de capacidad y se filtró a través de una gasa doble. A la suspensión obtenida se le adicionó el agente dispersante Tween 80 (0,01%) y se contaron los conidios colocando 10μL de la suspensión en una cámara de recuento Neubauer (Loptik).

En cada condición se desarrollaron los mismos tratamientos y se evaluó el efecto de éstos bajo un diseño experimental completamente aleatorio con 12 tratamientos y 8 repeticiones por tratamiento (Tabla 1). Los tratamientos resultaron de combinar dos proporciones de medio de cultivo (100 y 400g de hojas de café variedad Caturra por litro de agua) y una de V₈, con 4 tipos de inóculo (0,1; 0,5; y 1,0mL de suspensión micelial y 1,0cm² de micelio) (Tabla 1). La variable evaluada fue el número de conidios producidos por mL de agua. Las evaluaciones se realizaron a los 15 días (4 repeticiones) y a los 25 días (4 repeticiones) después de la siembra (DDS).

Se realizó un análisis de varianza bajo el modelo del diseño experimental propuesto, para la variable número de conidios producidos por mL de agua. Para cada tratamiento y en ambas condiciones se realizaron pruebas de comparación de promedios, empleando la prueba de rangos múltiples de Tukey a un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones de fitotrón. El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos para la variable número de conidios a los 15 días después de la siembra. La mayor producción ocurrió en los tratamientos 7 y 8, los cuales presentaron valores estadísticamente iguales con un promedio de 37.000 y 53.333

conidios.mL⁻¹, respectivamente. Así mismo, estos tratamientos fueron estadísticamente diferentes a los demás, los cuales presentaron valores entre 2.333 y 22.833 (Tabla 2). Estos resultados demuestran cómo el mayor volumen de suspensión micelial del tratamiento 7 y 1cm² de micelio, sembrados en las cajas de Petri con el medio de cultivo

CAA en la mayor concentración (400g de hojas de café por litro de agua), favorecieron la colonización y el crecimiento micelial del hongo, con una mayor producción de conidios de *C. coffeicola* (Figura 1). El número de conidios por litro del tratamiento 8, fue superior en 9.793 conidios.mL⁻¹ al obtenido por Buitrago y Fernández (4), quienes con

Tabla 1. Descripción de los tratamientos en el fitotrón y en el laboratorio.

Tratamiento	Medio de cultivo y tipo de inóculo
1	100* x 0,1**
2	100 x 0,5**
3	100 x 1,0**
4	100 x 1,0***
5	400 * x 0,1
6	400 x 0,5
7	400 x 1,0
8	400 x 1,0
9	Agar V ₈ x 0,1
10	Agar V ₈ x 0,5
11	Agar V ₈ x 1,0
12	Agar V ₈ x 1,0

* Concentraciones del medio de cultivo: gramos de café por litro de agua

** mL de suspensión micelial por caja de Petri.

*** cm² de micelio por caja de Petri

Tabla 2. Esporulación de *C. coffeicola*, 15 días después de incubación (en el fitotrón).

Tratamiento	Número de conidios.mL ⁻¹	CV
1	3.166 d*	50,08
2	2.833 d	36,34
3	2.333 d	75,55
4	17.333 dc	57,44
5	22.833 bc	28,55
6	19.000 dc	40,52
7	37.000 ab	58,33
8	52.333 a	58,25
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	13.800 dc	50,55

*Promedios con letra diferente presentan diferencia estadística según la prueba de Tukey al 5%.

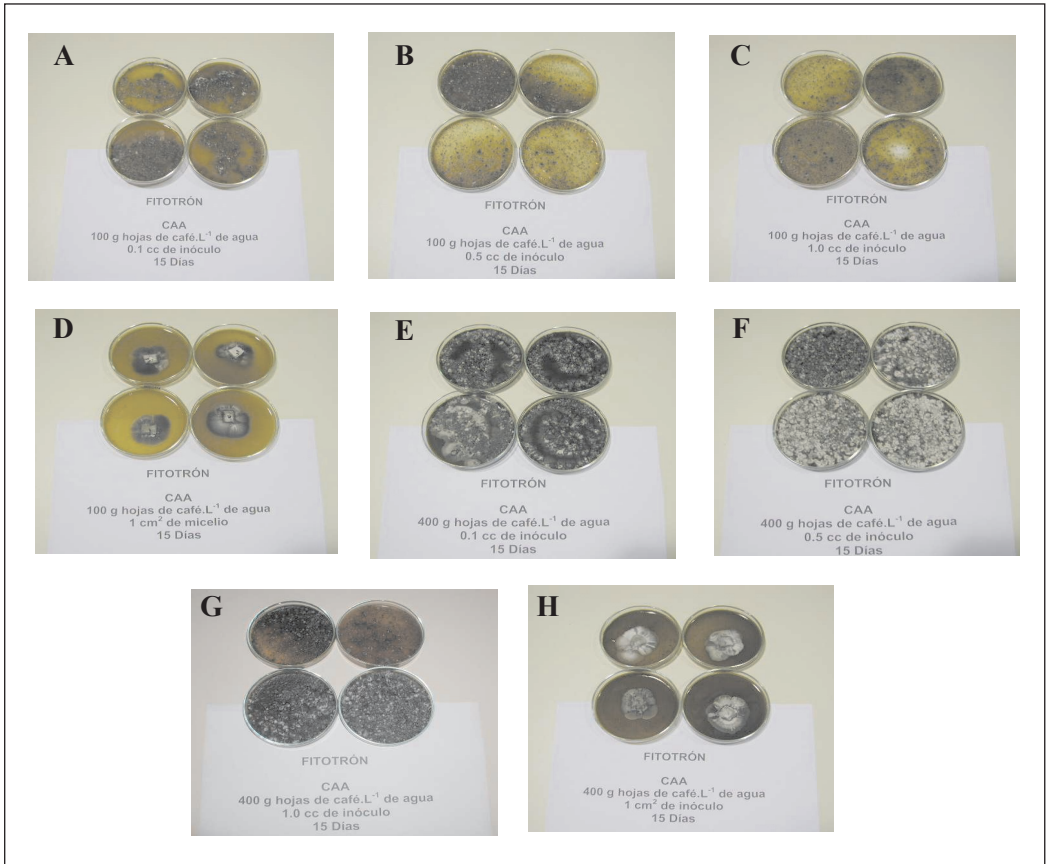


Figura 1. Esporulación de *C. coffeicola* en el medio de cultivo CAA, 15 días después de incubación en condiciones de fitotrón. Obsérvese en los literales A (TTO 1), B (TTO 2) y C (TTO 3), un limitado crecimiento micelial con escasa producción de conidios. En los literales D (TTO 4), E (TTO 5), F (TTO 6), G (TTO 7) y H (TTO 8), se aprecia un abundante crecimiento micelial con alta producción de conidios.

el medio de cocción de hojas de café agar sin avena, obtuvieron un número promedio de 43.540 conidios.mL⁻¹ de agua, después de 12 días en condiciones de laboratorio. Estas diferencias en el número de conidios por mL en ambos trabajos, posiblemente se originan del hecho que en las condiciones del fitotrón pueden controlarse la temperatura, la humedad relativa y la luz; mientras que en condiciones de laboratorio no se pueden controlar estas variables.

Los tratamientos 4, 5 y 6 fueron estadísticamente iguales, con un promedio de producción de 17.333, 22.833 y 19.000 conidios por mL, respectivamente. Estos tratamientos a su vez, fueron estadísticamente diferentes a los tratamientos 1, 2 y 3, los cuales presentaron los menores valores de conidios y además, fueron estadísticamente iguales entre ellos con una producción promedio de 3.166, 2.833 y 2.333 conidios.mL⁻¹, respectivamente (Tabla 2).

Las cajas de Petri con la menor concentración del extracto de hojas de café en el medio de cultivo jugo V8 (100g de hojas de café por litro de agua), tuvieron la menor producción de conidios en los tratamientos 1, 2 y 3. En los demás tratamientos, con la mayor concentración de CAA y sin tener en cuenta el tipo de inóculo, se encontraron los mayores valores de conidios por litro de agua. En los tratamientos 9 al 12 con el medio de cultivo jugo V₈, sólo hubo producción de conidios en el tratamiento 12 con un promedio de 13.800 conidios.mL⁻¹ de agua. Sin embargo, en el tratamiento 12 también se observó una alta producción de conidióforos sin presencia de conidios, resultado que indica que el medio de cultivo jugo V₈ no favorece la producción de conidios de *C. coffeicola*.

En las Figuras 1 y 2, se aprecian los tratamientos que mostraron el mayor crecimiento micelial y producción de conidios de *C. coffeicola*, los cuales se obtuvieron

en el medio de cultivo CAA con la mayor concentración del extracto de hojas de café. Este resultado fue contrario en los tratamientos con el medio de cultivo CAA con la menor concentración del extracto de hojas de café y jugo V₈.

En las Figuras 2C y 2D se observa el crecimiento del hongo en caja de Petri en el medio de cultivo CCA. Se encontraron conidios de *C. coffeicola* que presentaban entre 20 y 40 septos, con una longitud de 200 a 350µm.

Los conidióforos se desarrollaron a partir de un grupo de células de forma irregular o redondeada, de color café oscuro, siendo más claros hacia el ápice y formando un estroma (Figura 3A). También se observaron agrupaciones de conidióforos aislados, formando fascículos (Figura 3B); resultados similares a los obtenidos por Echandi (8).

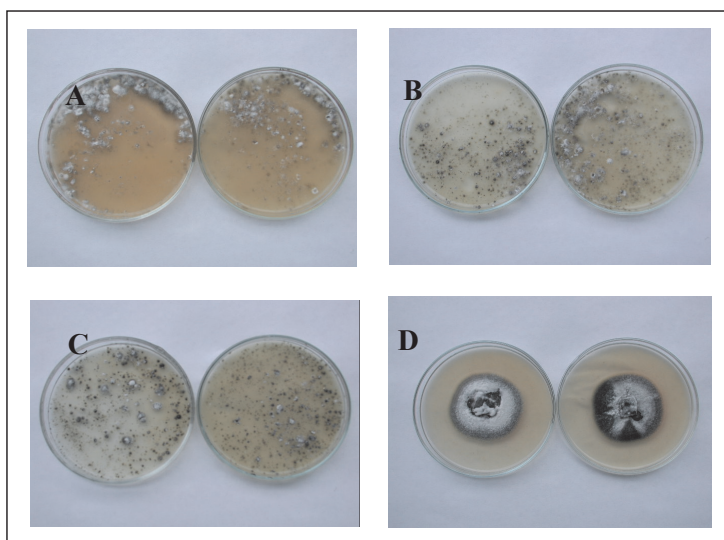


Figura 2. Esporulación de *C. coffeicola* en el medio de cultivo jugo V₈, 15 días después de incubación en condiciones de fitotrón. Obsérvese en los literales A (TTO 9), B (TTO 10) y C (TTO 11), un limitado crecimiento micelial con una escasa producción de conidios. En el literal D (TTO 12) se aprecia un abundante crecimiento micelial

En la Tabla 3 se observa que a los 25 días, los tratamientos 5, 6, 7 y 8 presentaron los valores promedios más altos en el número

de conidios (25.667, 19.333, 20.333 y 20.667 conidios.mL⁻¹ de agua, respectivamente), pero sin presentar diferencias estadísticas entre estos

Tabla 3. Esporulación de *C. coffeicola* 25 días después de incubación en el fitotrón.

Tratamiento	Número de conidios por mL ⁻¹	C V
1	3.500 c*	55,16
2	7.500 bc	30,35
3	14.666 abc	45,90
4	5.500 c	110,88
5	25.666 a	30,42
6	19.333 ab	32,21
7	20.333 a	75,47
8	20.666 a	84,80
9	12.000 abc	42,13
10	8.600 bc	29,51
11	5.000 c	80,27
12	8.000 bc	22,85

*Promedios con letras diferentes presentan diferencia estadística según la prueba de Tukey al 5%.

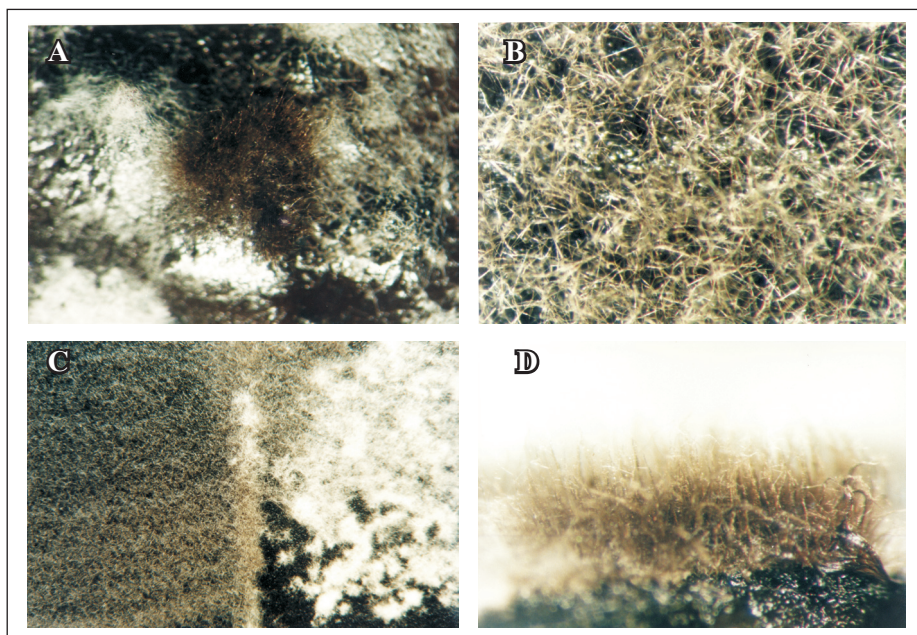


Figura 3. A). Esporodocios (Conidióforos + conidios del hongo) formando un estroma. B). Conidióforos simples (estructuras de color café) formando fascículos. C). En la misma caja de Petri, con el medio de cultivo CAA, se presenta una producción de conidióforos de color café oscuro (izquierda) y crecimiento vegetativo (micelio) de color blanco (derecha). D). Vista lateral de un esporodocio con conidióforos de color café y conidios hialinos.

tratamientos. Estos valores correspondieron a los tratamientos donde el hongo se sembró en la mayor concentración del medio de cultivo CAA (400g de hojas por litro de agua). De ésta manera se demuestra el efecto de la mayor concentración de hojas de café en la producción de conidios de *C. coffeicola* (Tabla 3). Los tratamientos 3 y 9 con 14.666 y 12.000 conidios.mL⁻¹ respectivamente, presentaron diferencias

estadísticas con los tratamientos 1, 2, 4, 10, 11 y 12, los cuales presentaron valores entre 3.500 y 8.600 conidios. mL⁻¹, siendo estadísticamente iguales (Tabla 3). En la Figura 4 se aprecia el crecimiento micelial de todos los tratamientos en el medio de cultivo CAA.

En todos los tratamientos donde el hongo se desarrolló en el medio de cultivo con la

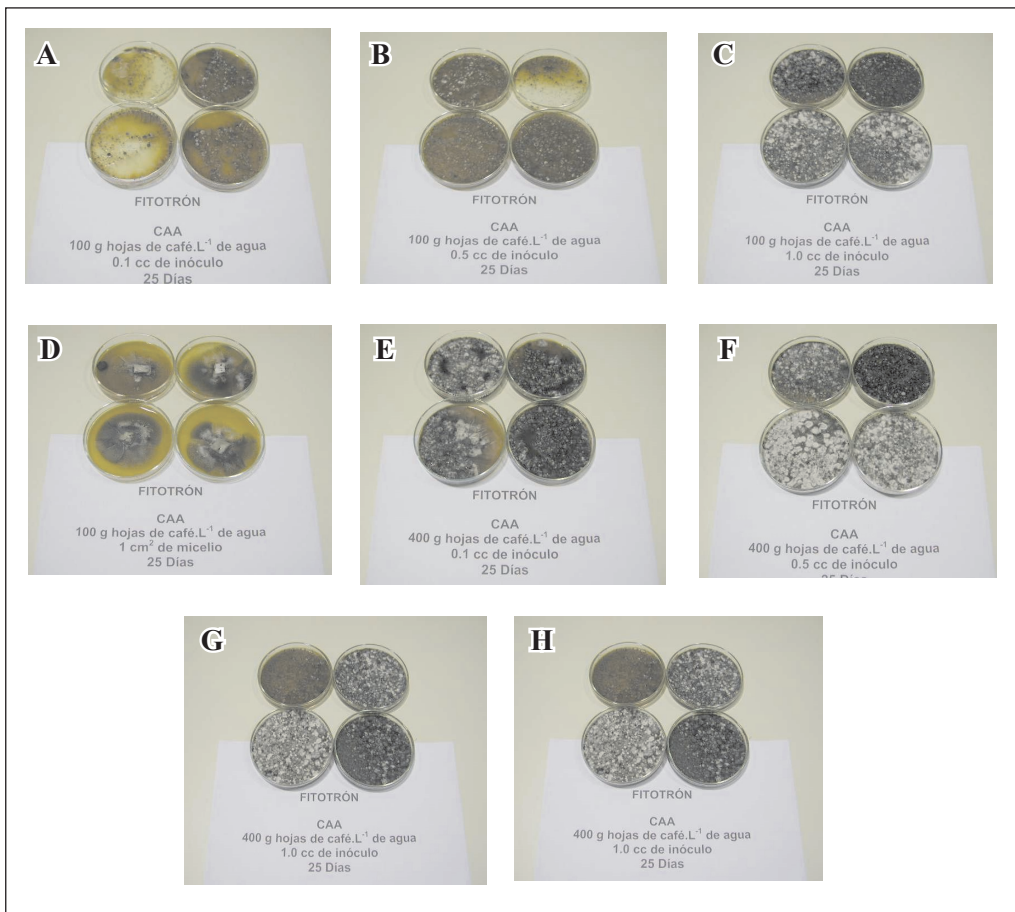
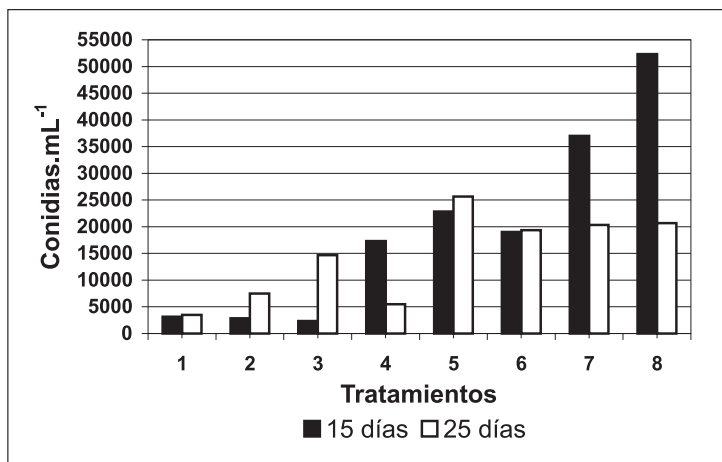


Figura 4. Esporulación de *C. coffeicola* en el medio de cultivo CAA 25 días después de incubación en condiciones de fitotrófon. Obsérvese en los literales A (TTO 1), B (TTO 2), C (TTO 3) y D (TTO 4) un limitado crecimiento micelial con escasa producción de conidios. En los literales E (TTO 5), F (TTO 6), G (TTO 7) y H (TTO 8) se aprecia abundante crecimiento micelial con alta producción de conidios.

Figura 5.
Producción de conidios de *C. coffeicola* en condiciones controladas (fitotrón), a los 15 y 25 días después de la siembra. Se aprecia que en algunos tratamientos hubo una mayor producción de conidios a los 15 días después de sembradas las cajas de Petri.



mayor concentración del extracto de hojas de café (400g.L⁻¹ de agua), tanto en la primera como en la segunda evaluación, se obtuvieron los mayores valores de producción de conidios mL⁻¹ de agua (entre 19.000 y 53.333 conidios); mientras que en los tratamientos con la menor concentración del extracto de hojas de café (100g. L⁻¹ de agua) y jugo V₈ se presentaron valores entre 2.833 y 17.333 conidios (Figura 5). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Buitrago (3), quien encontró que la esporulación se incrementaba con el aumento en la proporción de hojas de café empleadas en la preparación del medio de cultivo (decocción de 400g de hojas de café agar por litro de agua), después de 9 y 15h de exposición a la luz y a la oscuridad, y a 24°C. En este experimento, bajo condiciones de fitotrón, se presentó una mayor producción de conidios a los 15 días después de la siembra (Figura 5).

Bajo las condiciones de fitotrón, a 24°C, 65% de HR y a 20cm de distancia entre las cajas de Petri y la luz, se comprobó la influencia de la luz continua sobre la esporulación de *C. coffeicola* en el medio de

cultivo de extracto de hojas de café agar. Es así como a mayor tiempo de exposición del hongo a la luz mayor esporulación, resultado obtenido por otros investigadores que han trabajado con hongos del género *Cercospora* (3, 11, 12, 16).

Condiciones de laboratorio. En las condiciones de laboratorio no hubo producción de conidios en ninguno de los tratamientos en los dos tiempos de evaluación (15 y 25 días). En todos los tratamientos ocurrió crecimiento micelial del hongo. La temperatura promedio durante todo el experimento fue de 20°C durante la noche y 23°C durante el día y la humedad relativa promedio fue del 79%.

Diferente resultado encontraron Cadena (5) y Buitrago y Fernández (4), donde la producción de conidios fue más rápida y estable en el ambiente de laboratorio, para el medio de cultivo extracto de hojas de café agar. Estas diferencias pueden ser atribuidas a las temperaturas que se registraron durante el trabajo de Buitrago y Fernández (4), las cuales oscilaron entre 22,5 y 27°C,

pudiendo favorecer la producción de conidios del hongo.

En las cajas de Petri que se tuvieron bajo las condiciones de laboratorio fue difícil la producción de conidios de *C. coffeicola* debido a las variaciones de las condiciones ambientales dentro de este sitio; aspecto que es fundamental para el crecimiento del micelio y la producción de conidios del hongo, tal como lo han demostrado Buitrago y Fernández (4) y Jacome y Schuh (12).

La producción *in-vitro* de conidios de *C. coffeicola* bajo las condiciones ambientales controladas (fitotrón) y en el medio de cultivo extracto de hojas de café avena agar CAA (400g L⁻¹ de agua), permitió producir de manera confiable una alta cantidad de conidios con los cuales se pueden realizar pruebas *in vitro* y de campo, relacionadas con la biología de este hongo.

LITERATURA CITADA

1. ÁNGEL C., C.A.; DUQUE O., H. Estimación de la función de pérdida causada por la mancha de hierro *Cercospora coffeicola* Berk y Cooke en frutos de café. Chinchiná, Cenicafé, 2003. 1 p. Esp. (Seminario Mayo 2, 2003).
2. BAQUERO DE P., M. C. Estudio fisiológico de *Cercospora coffeicola* (Berk et Cook). Bogotá, Universidad de los Andes. Facultad de Artes y Ciencias, 1980. 87 p. (Tesis: Magister en Microbiología)
3. BUITRAGO DE S., H. L. Estudio de esporulación "in vitro" de *Cercospora coffeicola* Berk y Cooke. Manizales, Universidad de Caldas. Facultad de Agronomía, 1981. 78 p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo)
4. BUITRAGO, H. L.; FERNÁNDEZ, O. F. Estudio de esporulación "in vitro" de *Cercospora coffeicola* Berk y Cooke. Cenicafé 33(1):3-14. 1982.
5. CADENAG., G. Medios de cultivo para la esporulación de *Cercospora coffeicola*. In: CENTRONACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. Informe anual de la Disciplina de la Fitopatología 1978 - 1979. Chinchiná, Cenicafé, 1979.
6. CARNEIRO, J.G. A "mancha do olho pardo" da folha do cafeeiro. Revista do Instituto de Café do Estado de Sao Paulo (Brasil) 10(104):1893-1895. 1935.
7. CASTAÑO, J.J. Mancha de hierro del café. Cenicafé 7(82):313-327. 1956.
8. ECHANDI, E. La chasparria de los cafetos causada por el hongo *Cercospora coffeicola* Berk and Cooke. Turrialba 9(2):54-67. 1959.
9. FERNÁNDEZ B., O.; CADENA G., G.; LÓPEZ D., S.; BUITRAGO DE S., H.L.; ARANGO B., L.G. La mancha de hierro del caféto *Cercospora coffeicola* Berk y Cooke, biología, epidemiología y control. In: COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 10. Salvador, Bahía, Octubre 11-14, 1982. París, ASIC, 1983. p. 541-551.
10. FERNÁNDEZ B., O.; LÓPEZ D., S. Fertilización de plántulas de café y su relación con la incidencia de la mancha de hierro *Cercospora coffeicola* Berk y Cook. Cenicafé 22(4):95-108. 1971.
11. GUZMÁN P., O.,A; CASTAÑO, J. Comportamiento de los híbridos de plátano Fhia-20 y de banano Fhia-23 a las Sigatokas negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach). Manizales, Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2001. 18 p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
12. JACOME, L. H.; SCHUH, W. Effects of leaf wetness duration and temperature on development of black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. difformis. Phytopathology 82: 515-520. 1992.
13. JULIATTI, F.C.; PEIXOTO, A.S.; SANTOS, A.M. DOS.; TEODORO, R.E.F. Cercosporiose: plantas debilitadas sao o principal alvo. Online Internet: <http://www.coffeefreak.com.br/ocafezal.asp?SE=2&ID=7> (Consultado el 15 de marzo de 2002).
14. LEGUIZAMÓN C., J.E. La mancha de hierro del caféto. Avances Técnicos Cenicafé No. 246:1-8. 1997.
15. LÓPEZ D., S.; FERNÁNDEZ B., O. Epidemiología de la mancha de hierro del caféto *Cercospora coffeicola* Berk y Cook. Cenicafé 20(1): 3-19. 1969.
16. MOURICHON, X.; PETER, D.; ZAPATER., M., F. Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella*

- fijiensis* Morelet sur de jeunes plantules de bananiers issues de culture *in vitro*. Fruits 42(4): 195-198. 1987.
17. POZZA, A.; PRIETO, H.; CAIXETA, S.; CARDOSO, A.; ZAMBOLLIM, L.; POZZA, E. Influence da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de café. Pesquisa Agropecuária. Brasileira 36(1): 53-60. 2001.
18. RENGIFO G., H.G. Efecto del suministro de nutrientes sobre la incidencia y severidad de la Mancha de Hierro, *Cercospora coffeicola* Berk y Cooke en plantas de almácigo de café *Coffea arabica* L. Palmira, Universidad Nacional. Facultad de Agronomía, 2000. 85 p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo).