

ETIOLOGÍA Y SÍNDROME DE LOS CANCROS *Cryphonectria*, *Lasiodiplodia* y *Fusicoccum* EN EUCALIPTO (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh)

J. Cruz-Avilés¹; D. Cibrián-Tovar²; H. Ramírez-Maldonado²; S. E. García-Díaz²

¹Egresado de la Maestría. División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230.

²Profesor- investigador, División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco Km 38.5, Chapingo, Estado de México. Tel. (01-595) 95 2 15 00 Ext. 54 55.

RESUMEN

En Chapingo, México en los años 1999 y 2000, se hicieron pruebas de patogenicidad de los hongos *Cryphonectria cubensis*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusicoccum* sp; con cepas de estos hongos se hicieron inoculaciones en plantas de *Eucalyptus camaldulensis* que tenían dos años de edad; las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero, bajo un rango de temperaturas de 25-29 °C y condiciones de alta humedad ambiental. La inoculación de las cepas de los hongos mencionados se hizo en la parte baja y alta del tronco y se utilizaron métodos de inserción y punción. *Lasiodiplodia theobromae* requirió de 7-12 días para manifestar la primera aparición de picnidios y de 12-15 días para la emisión inicial de conidios, el hongo causó la muerte de la planta en 2 meses, en ese mismo tiempo colonizó todo el tronco. *Cryphonectria cubensis* requirió de 57-63 días para causar la muerte del árbol, a los 33-56 días de la inoculación se presentó la formación de picnidios y a los 56-60 días después, la liberación de conidios. *Fusicoccum* sp. causó la muerte de la planta inoculada en 63 días y requirió de 50-54 días para la formación de picnidios y de 60-63 días para la primera emisión de conidios. En cada uno de estos hongos se realizaron mediciones de picnidios y conidios, éstas se compararon con las mencionadas en la literatura y se concluyó con la corroboración de las especies y el género mencionados.

PALABRAS CLAVE: cancro, síndrome, métodos de inoculación, *Eucalyptus camaldulensis*

ETIOLOGY AND SYNDROME OF *Cryphonectria*, *Lasiodiplodia* AND *Fusicoccum* CANKERS IN EUCALYPTUS (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh)

SUMMARY

In 1999 and 2000, in Chapingo, Mexico, tests of pathogenicity were conducted on the fungi *Cryphonectria cubensis*, *Lasiodiplodia theobromae*, and *Fusicoccum* sp. Two-year-old *Eucalyptus camaldulensis* plants were inoculated with strains of these fungi and kept in a greenhouse with a temperature range of 25-29 °C and natural relative humidity. Inoculation was done at two points: at the base and at the upper part of the trunk, using methods of insertion and puncture. *Lasiodiplodia theobromae* required 7 to 12 days for the appearance of the first pycnidia and 12-15 days for initial emission of conidia. The fungus caused the plants' death within two months, during which it colonized the entire trunk. *Cryphonectria cubensis* required 57-63 days to cause the death of the tree; pycnidia formed 33-56 days after inoculation, and conidia were released at 56-60 days. *Fusicoccum* sp. caused the death of the inoculated plants in 63 days and required 50-54 days for the formation of pycnidia and 60-63 days for the first emission of conidia. Pycnidia and conidia of each of the fungi were measured, and this data was compared with data found in the literature; the species and genera were corroborated.

KEY WORDS: canker, syndrome, inoculations, *Eucalyptus camaldulensis*.

INTRODUCCIÓN

Los eucaliptos, aun cuando son árboles exóticos, tienen una amplia distribución y utilización en México. En cualquier grupo de árboles, existen patógenos que los afectan, entre ellos destacan los hongos que causan canchros en tallos y ramas; este grupo de patógenos es de gran importancia económica, pero la información conocida

sobre su biología y patogenicidad es escasa, sobre todo en las condiciones ambientales en que se encuentran los eucaliptos en México. Por lo anterior se decidió conocer la patogenicidad de tres especies de hongos bajo condiciones de invernadero y laboratorio. En esta publicación se dan conocer aspectos de la etiología de los hongos *Cryphonectria cubensis*, *Lasiodiplodia theobromae* y

Fusicoccum sp. (= *Dothiorella*). Estos patógenos están asociados a canchros que se encuentran en árboles dentro de plantaciones comerciales tropicales y dentro de ambientes suburbanos y urbanos. *Cryphonectria cubensis* se encuentra en *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla* y se distribuye en ambientes tropicales con altas precipitaciones de lluvia y alta temperatura ambiental, la cepa que se utilizó en este trabajo se obtuvo de *Eucalyptus grandis* de Las Choapas, Veracruz. El hongo *Lasiodiplodia theobromae* tiene una amplia distribución, tanto en ambientes tropicales como en ambientes templados; en este trabajo se probó una cepa proveniente de *Eucalyptus grandis* de Acajoneta, Nayarit. El hongo *Fusicoccum* sp. es común en los ambientes del altiplano mexicano, la cepa que se utilizó en las pruebas de patogenicidad se obtuvo de árboles de *Eucalyptus camaldulensis* que se encuentran en la Reserva Natural Xochitla en Tepetzotlán, Estado de México.

REVISIÓN DE LITERATURA

Las infecciones por hongos que causan canchros en árboles vivos están influenciadas por el sitio, la edad, el vigor del árbol, las condiciones ambientales y las prácticas culturales asociadas a los árboles plantados. El estrés por sequía, la presencia de raíces enredadas o con "cola de cochino", la falta de fertilidad de los suelos, la presencia de vientos fuertes y los daños por herbicidas, predisponen al árbol a los canchros. En general, los canchros son más comunes en árboles jóvenes, árboles suprimidos bajos en vigor, o en árboles ubicados en sitios pobres (Stack y Lamey, 1995).

De los canchros estudiados en este trabajo, el causado por el hongo *Cryphonectria cubensis* es el único que se presenta en ambientes adecuados para el desarrollo del hospedante, la susceptibilidad de los árboles al patógeno no está relacionada con estrés. Este hongo, en medios de cultivo tiene un óptimo desarrollo entre 28-30 °C y su infección en campo es similarmente favorecido por temperaturas superiores a 23 °C combinado con alta humedad y precipitaciones (Gibson, 1981). La distribución del cancro *Cryphonectria* esta probablemente determinada por el clima tropical aparentemente necesario para el crecimiento y propagación del patógeno (Conradie *et al.* 1990 y Florence *et al.* 1986).

Los hongos de los géneros *Lasiodiplodia* y *Fusicoccum* están asociados a plantas que se desarrollan con uno o varios factores de estrés y por ello su daño se puede reducir mediante una correcta aplicación de prácticas de cultivo. (Lewis, 1978).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de inoculación fueron realizados, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo, en

Chapingo Estado de México. La especie de hospedante en la que se hicieron las pruebas de patogenicidad fue *Eucalyptus camaldulensis*, se utilizaron arbolitos de dos años de edad; también se utilizaron varetas o porciones de tallo menores a 10 cm de longitud, estas porciones se utilizaron en las pruebas en laboratorio.

La colecta del material enfermo se realizó en árboles infectados que se ubicaron en la Reserva Natural Xochitla, municipio de Tepetzotlán, Estado de México, en las plantaciones forestales de las Choapas Veracruz (PLANFOSUR) y en las plantaciones industriales mexicanas de Acajoneta Nayarit (COPAMEX); en estas áreas se encontraron árboles de eucalipto infectados por los canchros *Fusicoccum*, *Cryphonectria* y *Lasiodiplodia* respectivamente; se colectó material patológico con signos y síntomas de cada uno de los canchros. En laboratorio, de aquellas áreas de corteza afectadas por los canchros, se realizaron cortes de tejido vegetal enfermo, en este material hubo estructuras de reproducción de cada uno de los hongos y de ellas se hicieron cortes y preparaciones microscópicas temporales y semipermanentes para la observación en el microscopio. De este material se hicieron aislamientos de los hongos y para ello se siguió el procedimiento descrito a continuación.

El material vegetal enfermo se preparó en pedazos de pocos centímetros de longitud, el cual fue lavado con agua destilada estéril. Posteriormente, se sometieron a desinfección superficial con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 3 minutos. Luego se enjuagaron en tres porciones separadas de agua destilada esterilizada durante tres minutos en cada una de las porciones. Los pedazos de tejido enfermo fueron sembrados bajo condiciones de esterilidad en el medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Cada caja petri sembrada fue sellada con cinta parafilm para evitar la posible contaminación por otros hongos y ácaros. Las siembras se incubaron en una cámara de crecimiento (estufa) a una temperatura de 29-30 °C. Cuando se presentó el crecimiento micelial, se realizaron purificaciones de las colonias que presentaron crecimientos a cajas petri limpias con medio de cultivo PDA. Ya que se obtuvieron crecimientos miceliares en las nuevas cajas, éstas fueron transferidas a tubos de ensaye que contenían medio de cultivo PDA inclinado, con la finalidad de ser utilizados en estudios posteriores o para la reproducción masiva y colección del hongo.

De las colonias obtenidas del aislamiento y purificación, se preparó el material para la realización de las diferentes pruebas de inoculación; así como también se realizaron mediciones de las estructuras reproductivas (picnidios y conidios) de cada uno de los hongos. Además se elaboró una bitácora correspondiente al desarrollo y crecimiento de cada una de las colonias, donde se registró cada uno de los eventos que se presentaron durante el aislamiento y crecimiento de los hongos.

El procedimiento de inoculación realizado a las plantas de eucalipto se describe a continuación, bajo condiciones de esterilidad, se procedió a fraccionar el medio de cultivo, haciendo pequeños trozos circulares de 6 mm de diámetro. Se desinfectó la superficie de la corteza a inocular con alcohol al 70 %. Para la inoculación por el método de inserción, se realizaron heridas a las plantas con una navaja de bisturí, realizando tres cortes: uno longitudinal y otros dos que partieron de la parte superior del primer corte, formando un ángulo de 45 °, de manera que la herida tuviera forma de “↑”. Con una aguja de disección esterilizada se tomó un pedazo del inóculo de las cajas de petri, este inóculo se introdujo a la parte del xilema expuesto donde se realizó la herida, la epidermis de la corteza levantada fue usada para tapar parte del medio de cultivo, luego se colocó encima un pedazo de algodón esterilizado y humedecido con agua destilada y esterilizada y se presionó para asegurar su contacto en toda la herida realizada. Con un pedazo de cinta parafilm, se cubrió el medio de cultivo, la herida y el algodón, enrollando la cinta alrededor del talluelo.

Para la inoculación por el método de punción, únicamente se realizó la desinfección superficial del área de inoculación con alcohol al 70 % y se puso encima un pedazo del inóculo, que fue cubierto con un pedazo de algodón esterilizado y humedecido en agua destilada y esterilizada. Con un pedazo de cinta parafilm, se cubrió el medio de cultivo y el algodón, enrollando la cinta alrededor del talluelo. Con una aguja esterilizada se realizaron 6 punciones encima del área que contenía al pedazo de inóculo.

Para la inoculación de las varetas, se seleccionaron árboles, sin daños físicos y sin presencia de agentes patógenos, de los cuales se obtuvieron las varetas de 8.5 cm de longitud, las cuales se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 3 %. Una vez desinfectadas se procedió a la inoculación artificial de forma análoga a la metodología realizada para la inoculación de las plantas. Las varetas inoculadas fueron guardadas en cajas petri que en su base contuvieron un papel filtro esterilizado de 90 mm de diámetro y dos soportes con cabezas de algodón (cotonetes), encima de ellos fueron depositadas las varetas inoculadas. Las varetas inoculadas fueron incubadas dentro de una estufa especial a una temperatura de 29-30 °C.

La finalidad de utilizar varetas en cámara húmeda obedeció principalmente al estricto control de la temperatura de incubación, la cual es fundamental para el establecimiento y desarrollo de cada uno de los hongos inoculados con la mínima defensa del hospedante, además dicha metodología permite realizar una estimación de los días que requieren cada uno de los hongos para esporular en tejido vegetal; en estas varetas, el hongo inoculado tiene ventajas al reducir la respuesta del hospedante, y sus uso permite tener información sobre la biología del hongo. Las

observaciones y registros de información fueron hechos 6 días después de realizada la inoculación y posteriormente se hicieron cada tercer día.

Para las pruebas de patogenicidad en las varetas, se utilizó un experimento factorial 4x2 en completamente al azar, debido al tamaño de las varetas sólo se consideró una parte a ser inoculada. Los factores correspondieron al cancro y al método de inoculación. Debido al difícil manejo de un amplio número de cajas petri en la estufa, se decidió utilizar cinco repeticiones por cada tratamiento. El número de tratamientos resultantes fue de 8 con 5 repeticiones cada uno; obteniéndose un total de 40 unidades experimentales (varetas) inoculadas. Cada tercer día, durante la evaluación, se aprovechaba para agregarles 5 ml de agua purificada esterilizada a cada una de las cajas que contenían a las varetas. Los tratamientos Testigo que acompañaron a los tratamientos de punción como de inserción, también fueron lesionados de igual forma que los otros tratamientos, según fuese la asignación, la única diferencia fue que en ellos, solo se inoculó el medio de cultivo PDA, con la finalidad de no influir en la respuesta a la infección.

Las inoculaciones realizadas en las varetas de eucaliptos con los diferentes cancrios en estudio, fueron realizadas el día 29 de noviembre de 1999 y tres días después se procedió a retirar la cinta parafilm. Posteriormente, los primeros registros de información fueron realizados 6 días después de la inoculación, y después cada tres días, durante un período de 45 días.

Para las pruebas de patogenicidad en las plantas de eucalipto, se utilizó un experimento factorial 4 X 2 X 2 completamente al azar; el primer factor (4) cancro estuvo representado por los tres hongos: *Lasiodiplodia*, *Cryphonectria* y *Fusicoccum*, más un testigo; el segundo factor (2) estuvo representado por los métodos de inoculación: punción e inserción y el tercer factor (2) por la parte del árbol a inocular: alta y baja. Debido a la escasa disponibilidad de material experimental homogéneo, se decidió utilizar tres repeticiones por cada tratamiento. El número de tratamientos resultantes fue de 16 con tres repeticiones cada uno; obteniéndose un total de 48 unidades experimentales (plantas) inoculadas. Los tratamientos Testigo, fueron realizados de la misma forma que para las varetas, con la única diferencia de que se inocularon dos partes: alta y baja de manera individual. Los primeros registros de información fueron realizados 6 días después de la inoculación, y posteriormente cada tres días, durante un período de 55 días.

A las inoculaciones realizadas tanto en invernadero como en laboratorio, se les proporcionaron las condiciones adecuadas de temperatura y humedad para el desarrollo de los hongos. Por ello, las varetas inoculadas, fueron colocadas dentro de una estufa especial en la que se controló la temperatura en el rango de 29-30 °C de

incubación durante todo el período de evaluación. A las varetas, la humedad fue proporcionada constantemente por el papel filtro humedecido, aunque el porcentaje no pudo ser conocido; únicamente se precisó que bajo condiciones de esterilidad se adicionaba una dosis de 4-5 ml de agua cada tercer día a cada una de las cajas petri. Mientras que las inoculaciones realizadas a las plantas de eucalipto, se mantuvieron bajo condiciones térmicas en el invernadero dentro de un rango de temperaturas entre 25-29 °C y cada tercer día durante la toma de datos, se aprovechaba para regar a las plantas a capacidad de campo con agua normal, y durante todo el período de evaluación se utilizó un aparato humidificador para brindar humedad ambiental al experimento.

Para la toma de datos, se elaboró un formato para varetas y otro para plantas inoculadas, que contenía la fecha de evaluación, tratamiento inoculado, tamaño de la planta o vareta, inicio de la infección, tamaño de la lesión: ancho y largo expresados en cm², así como los signos, síntomas de la enfermedad que se fueron presentando a través del tiempo de evaluación, tales como cambios de coloración de la corteza, presencia y desarrollo de cuerpos fructíferos, muerte de hojas, etc.

Para la identificación de cada uno de los agentes patógenos, se obtuvo información de los procesos de aislamiento y purificación, reasamiento, elaboración de preparaciones y medición de estructuras, las cuales se llevaron a cabo a nivel microscópico y macroscópico, con esta información se revisó la literatura especializada y se compararon los elementos de información. Una vez que se presentaron los síntomas y signos de cada uno de los canchros inoculados, se procedió a realizar los reasamientos de los hongos a partir de las plantas que desarrollaron los signos o de tejidos que se encontraron infectados; estos fueron realizados de la misma manera que los aislamientos originales hasta lograr la purificación de la cepa. Durante los reasamientos, se registraron los hechos más representativos que ocurrieron durante el cultivo. La colonia obtenida en los reasamientos se comparó con la cepa original.

Del material experimental que presentó los cuerpos fructíferos de los diferentes canchros inoculados, se realizaron preparaciones semipermanentes para su identificación y medición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reasamientos obtenidos de cada uno de los agentes causales de enfermedad

De cada uno de los canchros inoculados artificialmente en plantas y varetas de eucalipto, se realizaron los respectivos reasamientos, logrando obtener a cada uno de los hongos patógenos utilizados como fuente de inóculo,

los cuales fueron cultivados en condiciones de temperatura constante de 29 a 30 °C. En los Cuadros 1, 2 y 3, se presentan las características morfológicas de cada uno de los canchros que fueron reasados. Estos reasamientos mostraron apariencias similares a las características de los aislamientos y purificaciones obtenidos inicialmente en las muestras de campo. Por lo anterior, se concluye que después de realizadas las pruebas de patogenicidad, los hongos fueron recuperados exitosamente.

CUADRO 1. Características morfológicas del reasamiento obtenido de tejidos infectados con el canchro *Cryphonectria cubensis* provenientes de varetas y plantas de eucalipto inoculadas artificialmente. Chapingo, México; 1999.

Características	Características de los reasamientos	
	Varetas	Plantas
Morfológicas		
Color inicial de la colonia	Blanco cremosas	Blanco cremosas
Tiempo en cubrir el crecimiento micelial del hongo, la superficie del diámetro de la caja petri	A los 6 días	A los 5 días
Aspecto de la colonia	Primero blanco cremosas de forma lanosa, a los 8 días hubo cambios de pigmentación de un color amarillento a uno naranja pálido y finalmente naranja amelonado.	Primero blanco cremosas, de forma algodonosa, a los 8 días hubo cambios de pigmentación de un color amarillento a uno naranja pálido y finalmente naranja amelonado.
Coloración del medio de cultivo	Primero blanco cremosos y de los 11 días en adelante se tornaron naranja rojizos.	Primero blanco cremosos y de los 12 días en adelante se tornaron naranja rojizos.
Presencia de picnidios	A los 8 días	A los 7 días
Esporulación de los picnidios	A los 21 días	A los 20 días

CUADRO 2. Características morfológicas del canchro *Lasiodiplodia theobromae* obtenido de los reasamientos realizados a partir de tejidos infectados de plantas y varetas de eucalipto inoculadas artificialmente, Chapingo, México; 1999.

Características	Características de los reasamientos	
	Varetas	Plantas
Morfológicas		
Color inicial de la colonia	Blanco lanosa	Blanco lanosa
Tiempo en cubrir el crecimiento micelial del hongo, la superficie del diámetro de la caja petri	De 3 a 4 días	De 3 a 4 días
Aspecto de la colonia	Primero blanco lanosas, a los 6 días la periferia fue grisácea y centro oscuro, después de 8 días se tornaron oscuras.	Primero blanco lanosas, después a los 7 días ya se habían pigmentado de color negro oscuro.
Coloración del medio de cultivo	Primero cremoso, después a los 15 días se tornaron negros.	Primero cremoso después a los 15 días se tornaron negros.
Presencia de picnidios	A los 32 días	A los 34 días
Esporulación de los picnidios	A los 61 días	A los 62 días

CUADRO 3. Características morfológicas del reasamiento obtenido de tejidos infectados con el cancro *Fusicoccum* provenientes de varetas y plantas de eucalipto inoculadas artificialmente. Chapingo, México; 1999.

Características Morfológicas	Características de los reasamientos	
	Varetas	Plantas
Color inicial de la colonia	Blanco algodonosa y filamentososa	Blanco algodonosa y filamentososa
Tiempo en cubrir el crecimiento micelial del hongo, la superficie del diámetro de la caja petri	A los 4 días	A los 5 días
Aspecto de la colonia	Primero blanco algodonosa después a los 6 días las colonias fueron grises en la periferia y oscuras al centro	Primero blanco lanoso, después a los 6 días las colonias fueron grises en la periferia y oscuras al centro
Coloración del medio	Primero cremosos, luego de los 12 a 21 días las colonias se tornaron negras.	Primero cremosos, luego de los 12 a 21 días las colonias se tornaron negras.
Presencia de picnidios	A los 24 días	A los 26 días
Esporulación de los picnidios	A los 55 días	A los 58 días

Desarrollo de signos y síntomas en plantas de *E. camaldulensis* inoculadas artificialmente.

Fue necesario ilustrar, como se muestra en la Figura 1, el desarrollo de los signos y síntomas de cada uno de los cancrios y métodos de inoculación, que se fueron registrando a través del período de evaluación.

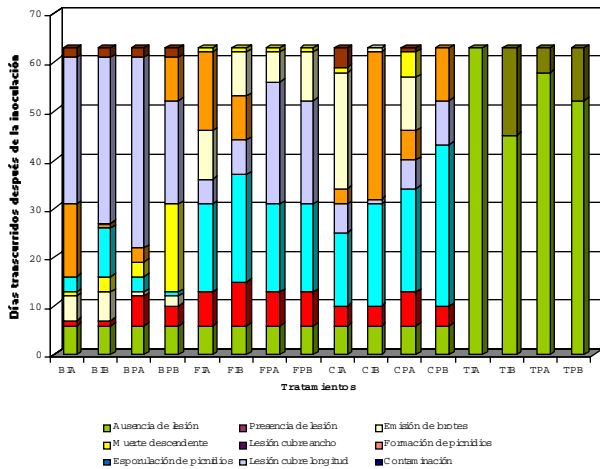


Figura 1. Aparición de signos y síntomas promedio registrados en los árboles de *Eucalyptus camaldulensis* inoculados con dos métodos, dos alturas, tres cancrios y un testigo; y tres repeticiones. Chapingo, México; 1999.

Donde:

- BIA: *Lasiodiplodia* Inserción Alta
- BIB: *Lasiodiplodia* Inserción Baja
- BPA: *Lasiodiplodia* Punción Alta
- BPB: *Lasiodiplodia* Punción Baja
- FIA: *Fusicoccum* Inserción Alta
- FIB: *Fusicoccum* Inserción Baja
- FPA: *Fusicoccum* Punción Alta
- FPB: *Fusicoccum* Punción Baja
- CIA: *Cryphonectria* Inserción Alta
- CIB: *Cryphonectria* Inserción Baja
- CPA: *Cryphonectria* Punción Alta
- CPB: *Cryphonectria* Punción Baja
- TIA: Testigo Inserción Alta
- TIB: Testigo Inserción Baja
- TPA: Testigo Punción Alta
- TPB: Testigo Punción Baja

Descripción de signos y síntomas en varetas de *E. camaldulensis* inoculadas con cada uno de los cancrios y métodos de inoculación.

Las varetas inoculadas en condiciones de laboratorio con cada uno de los cancrios y métodos de inoculación, mostraron durante el período de evaluación los signos y síntomas que se resumen en la Figura 2.

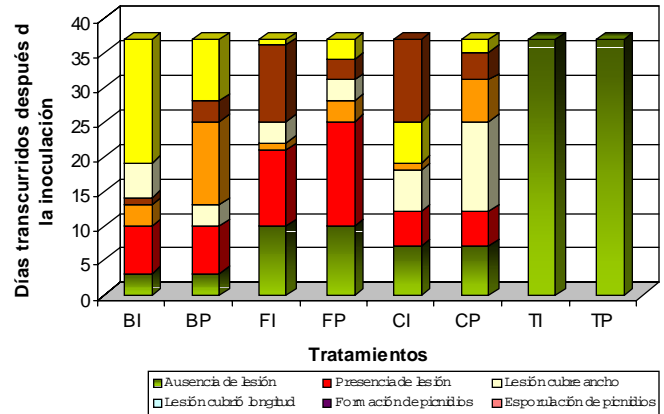


Figura 2. Aparición de signos y síntomas promedio registrados en las varetas de *Eucalyptus camaldulensis* inoculados con dos métodos, tres cancrios y un testigo; con cinco repeticiones. Chapingo, México; 1999.

Donde:

- BI: *Lasiodiplodia* Inserción
- BP: *Lasiodiplodia* Punción
- FI: *Fusicoccum* Inserción
- FP: *Fusicoccum* Punción
- CI: *Cryphonectria* Inserción
- CP: *Cryphonectria* Punción
- TI: Testigo Inserción
- TP: Testigo Punción

Síndrome causado por el hongo *Lasiodiplodia*

a) En varetas de eucalipto inoculadas

Las varetas de *E. camaldulensis* inoculadas con el cancro *Lasiodiplodia*, fueron guardadas en cajas de petri de manera individual y colocadas dentro de una estufa a una temperatura de 29 °C. En los primeros tres días no se registró presencia de lesión alguna. Entre los tres y los nueve días después de realizada la inoculación se observó, en el área de inoculación, la formación y desarrollo de una lesión elipsoidal alargada, de color café rojiza. A partir del día seis, la lesión se tornó a un color café rojizo oscuro y ya había cubierto ¾ partes del perímetro de la vareta. Entre los días 9 a 24, la lesión ya había cubierto el perímetro de la vareta, al centro de la lesión se observaba más oscura. A partir del día 12 y hasta el día 24, la lesión cubrió la longitud de la vareta. De los 9 a los 13 días, se presentó el inicio de la formación de picnidios oscuros subcorticales a todo lo largo y ancho del tallo. De los 18 a los 27 días, algunos picnidios desarrollados estuvieron cubiertos por micelio blanco grisáceo y otros presentaron esporulación de masas de conidios unicelulares, en forma de cirros

blanco aperlados. En resumen, podemos decir que el cancro *Lasiodiplodia* inoculado en varetas con ambos métodos de inoculación, tiene un ciclo de vida entre 18 y 27 días.

b) En plantas de eucalipto inoculadas

Las plantas de eucalipto inoculadas con este tratamiento mostraron los siguientes signos y síntomas: De 1 a 5 días, no se registró presencia de lesión alguna. De 6 a 9 días después de haberse realizado la inoculación, los árboles presentaron en el área de inoculación el desarrollo de una lesión de color café rojiza de forma elipsoidal alargada. De los 7 a los 12 días, se inició la emisión de brotes en la copa del árbol y el inicio de formación de picnidios esféricos, oscuros, subcorticales. De 12 a 15 días, las hojas de la copa presentaron marchitamiento y los picnidios oscuros presentaron profusa esporulación de masas de conidios hialinos y unicelulares, en forma de cirros blanco aperlados. De 15 a los 25 días, el desarrollo de la lesión cubrió el perímetro del tallo, la lesión se había tornado café rojiza oscura. De 21-30 días, se inicia la muerte descendente del árbol, el tallo presentaba marchitamiento y las hojas inmersas en el área lesionada habían muerto. A los 2 meses la lesión había cubierto la longitud total de la planta y el tallo se observó oscuro casi negro que contrastaba con la fuerte esporulación de los picnidios en forma de cirros blanco aperlados; todos los brotes y hojas habían muerto. En resumen podemos decir que el cancro *Lasiodiplodia* inoculado en plantas, presenta un ciclo de la enfermedad entre los 12-15 días, que termina con la esporulación de conidios.

Síndrome causado por el hongo *Cryphonectria cubensis*

a) En varetas de eucalipto inoculadas

Del primero al quinto día, no se hubo registros de formación de lesión alguna. De 6-10 días, en el área de inoculación se había formado una lesión de color café rojiza de forma elipsoidal. De los 11 a los 24 días, se registró la formación de picnidios, algunos estaban creciendo sobre el medio de cultivo inoculado y presentaban gotas traslúcidas de color naranja, otros se desarrollaron en el área lesionada y eran de color café, cubiertos por micelio blanco algodonoso. De 16-30 días, el avance de la lesión había cubierto el perímetro de la vareta. A partir del día 18; en el área lesionada hubo gran cantidad de picnidios en la fase de esporulación, expelieron masas de conidios de color amarillo naranja, dando apariencia de cabezas de cerillos. De los 24 a los 30 días, la lesión café rojiza oscura había cubierto la longitud de la vareta y había picnidios café subcorticales a todo lo largo y ancho de la vareta, la cual

estuvo oscura. En resumen, el ciclo del cancro *Cryphonectria*, se dio entre el rango de 18-34 días.

b) En plantas de eucalipto inoculadas

Las plantas inoculadas con este tratamiento mostraron los siguientes signos y síntomas: De 1 a 5 días, hubo ausencia de lesión. De 6 a 12 días después de haberse realizado la inoculación, hubo formación de una lesión elipsoidal de color café clara, con bordes café oscuros. De 9 a 41 días, se registró la emisión de brotes inmediatamente abajo del área de inoculación. De 25 a 51 días, se presentó el necrosamiento descendente y muerte de hojas inmersas en el área lesionada. De 30 a 51 días, la lesión había cubierto el perímetro del tallo. De 33 a 56 días se registró el inicio de formación de picnidios café oscuros subcorticales en la corteza que tenía una coloración café anaranjada. De 56 a 60 días, los picnidios iniciaron la esporulación de masas de conidios en forma de cirros amarillo naranja. De 57 a 63 días, el tallo estaba completamente lesionado, es decir, la lesión había cubierto la longitud de la planta, el tallo se observó café rojizo y la planta estaba muerta junto con brotes y hojas emitidas.

Síndrome causado por el hongo *Fusicoccum*

a) En varetas de eucalipto inoculadas

En los primeros ocho días no se registraron evidencias de lesión. A partir del día 9 y hasta el día 24, se observó en el área de inoculación, la formación y desarrollo de una lesión elipsoidal, de color café oscura. De los 19 a los 24 días, la lesión se había tornado oscura casi negra y había cubierto el perímetro de la vareta. En los días 21 a 27, se registró el inicio de formación de picnidios oscuros, subcorticales. En un rango de 24 a 35 días, la lesión cubrió la longitud de la vareta. Dentro del lapso de 33 a 36 días, se inició la esporulación de masas de conidios unicelulares, se formaron cirros blanco aperlados, mientras otros picnidios estaban cubiertos por micelio superficial blanquecino. En resumen, el cancro *Fusicoccum*, presentó un ciclo que requiere de 33 a 35 días, para iniciar la esporulación de conidios.

b) En plantas de eucalipto inoculadas

Las plantas inoculadas con este tratamiento mostraron los siguientes signos y síntomas: De 6 a 15 días después de haberse realizado la inoculación, hubo formación de una lesión oscura casi negra, de forma elipsoidal alargada, ligeramente hundida en la corteza. De 12 a 35 días, se registró la emisión de brotes. De 30 a 55 días, se registró muerte descendente en la punta del árbol, los brotes emitidos en esa área se observaron marchitos y

otros muertos. De 50 a 54 días se registró el inicio de formación de picnidios oscuros subcorticales. De 42 a 45 días, la lesión cubre el perímetro del tallo de la planta. De 60 días en adelante, los picnidios, inician la esporulación de masas de conidios hialinos, unicelulares en forma de cirros blanco aperlados, las hojas se encontraron secas, verde olivo y colgantes.

Medición de estructuras de reproducción: picnidios y conidios.

Para realizar las mediciones de los picnidios y conidios correspondientes a cada uno de los canchros obtenidos en forma original, así como los obtenidos de los medios de cultivo, y los inoculados en varetas y plantas de eucalipto; se realizaron cortes de tejido vegetal del material que presentó las diferentes estructuras de reproducción. Para la medición de los conidios, se realizaron transferencias de manera directa de los cirros y masas de conidios esporulados en los picnidios, mientras que en los medios de cultivo se realizó la maceración de picnidios, para obtener las preparaciones fijas semipermanentes y temporales. Las mediciones se realizaron utilizando un circuito cerrado de televisión ya que este equipo permite una mayor rapidez y precisión en las lecturas. En el Cuadro 4, se muestran las mediciones promedio obtenidas en picnidios y conidios de cada uno de los canchros en los diferentes hospedantes: campo, medio de cultivo, varetas y plantas inoculadas.

CUADRO 4. Medición promedio de picnidios y conidios de los canchros: *Lasiodiplodia*, *Cryphonectria* y *Fusicoccum* obtenidos de los hospedantes: campo, medio de cultivo PDA, varetas y plantas de *Eucalyptus camaldulensis* inoculadas artificialmente. Chapingo, México; 1999

Cancro	Hospedante	PICNIDIOS (m μ)			CONIDIOS (m μ)	
		Largo	Ancho	Grosor de pared	Largo	Ancho
<i>Lasiodiplodia</i>	Campo	225.3	249.8	25.6	24.2	12.96
	Medio de cultivo	724.7	339.1	65.7	22.9	13.46
	Varetas inoculadas	310.9	322.1	37.2	23.8	13.49
	Plantas inoculadas	193.5	263.9	23.2	22.9	13.25
<i>Cryphonectria</i>	Campo	825.4	246.6	42.2	3.04	1.66
	Medio de cultivo	279.3	228.6	32.6	3.66	1.75
	Varetas inoculadas	301.3	190.0	25.0	3.40	1.65
	Plantas inoculadas	273.1	334.5	30.6	3.44	1.60
<i>Fusicoccum</i>	Campo	157.4	213.3	19.9	20.8	4.95
	Medio de cultivo	531.9	312.6	56.1	22.8	6.21
	Varetas inoculadas	218.5	315.7	23.2	19.6	6.48
	Plantas inoculadas	188.9	262.3	21.8	22.4	6.58

En resumen, podemos decir que los mayores promedios en largo, ancho y grosor de pared de los picnidios de *Lasiodiplodia* y *Fusicoccum*, se registraron en el medio de cultivo (M), esto se explica debido a la suficiente disponibilidad de alimento para el establecimiento y desarrollo del hongo, sin defensa alguna de respuesta del hospedante. Sin embargo, para el cancro *Cryphonectria*, los mayores tamaños de picnidios se registraron en el hospedante de campo (C), esto se atribuye principalmente a las condiciones ambientales favorables para el desarrollo del hongo.

Identificación de cada uno de los hongos inoculados.

La identificación de cada uno de los agentes patógenos, estuvo definida en base a las metodologías obtenidas del aislamiento y purificación, reaislamiento, elaboración de preparaciones y medición de estructuras.

Cancro *Lasiodiplodia*

El hongo inoculado y el reaislado, fue definido dentro del género *Lasiodiplodia* como el responsable de ocasionar la enfermedad; la identificación se basó en las características morfológicas de los signos que presentó. Una de ellas consistió en los contenidos blancos con paredes negras de los picnidios, esta característica es típica de las especies de *Botryosphaeria* y hongos relacionados (Glenn, 1976; Lewis, 1978; Wayne *et al.* 1987).

La identificación a nivel de especie estuvo definida principalmente por los tamaños de los picnidios y conidios. Los picnidios obtenidos en campo, fueron subcorticales, de forma semiesférica, con un promedio de 225.33 m μ de largo por 249.83 m μ de ancho y un grosor promedio de pared de 25.63 m μ , considerada gruesa y de color negro; además los picnidios presentaron un orificio prominente denominado ostiolo y conidióforos cortos y simples. Mientras que los conidios fueron de color moreno oscuro, generalmente con dos septos, pero se pueden encontrar hasta tres septos cuando son maduros y no están comprimidos en el área del septo. Al momento de la esporulación ellos son hialinos y sin septo. El tamaño promedio de los conidios encontrados en campo fue 24.47 m μ por 12.96 m μ . La superficie de los conidios maduros presenta estrías longitudinales, característica típica que define a la especie de *Lasiodiplodia*. La forma y tamaños de los picnidios y conidios fue la determinante para ubicar al hongo dentro de la especie: *theobromae* especie que se caracteriza por presentar conidios "estriados", usualmente hialinos, no septados al momento de la expulsión de los

picnidios, convirtiéndose en moreno oscuro y septados después de la expulsión, estas características son las reportadas por Glenn (1976); Lewis (1978). Finalmente podemos decir que el hongo inoculado y reaislado correspondió al cancro *Lasiodiplodia theobromae* Patouillard como el agente causal de la enfermedad.

Cancro *Cryphonectria*

La identificación del cancro *Cryphonectria*, se realizó con base en las características morfológicas similares que presentaron los medios de cultivo, tales como colonias blanco cremosas al inicio con posterior cambio de coloración a amarillo naranja pálido y finalmente naranja amelonado por la presencia de picnidios de paredes blandas, cubiertos por micelio de color crema anaranjado, los tiempos de aparición de síntomas y signos en las colonias no difieren de las reportadas en los estudios hechos por el CATIE (1991). En el presente estudio sólo se encontró la forma asexual: picnidios; los cuales en medios de cultivo y los reaislados de plantas y varetas inoculadas midieron de 273.1 a 301.3 μm de largo por 190 a 334.5 μm de ancho; sin embargo, los encontrados en campo midieron un mayor tamaño, su cuello fue más grande. Los tamaños de conidios son de forma oval, y caen en el rango 2.7 a 4.0 μm de largo por 1.6 a 1.9 μm de ancho, medidas que entran dentro de los rangos reportados por Ferreira *et al.* (1977) quienes mencionan los tamaños de conidios entre 2.5 a 4.0 por 1.8 a 2.2 μm y Barnard *et al.* (1987), reportan las dimensiones de los conidios de 3.6 por 1.6 μm . Por las características morfológicas descritas anteriormente, se concluye que el hongo inoculado y reaislado pertenece al cancro *Cryphonectria cubensis* Bruner.

Cancro *Fusicoccum*

La identificación del cancro inoculado se realizó únicamente a nivel de género, debido a controversias que han surgido para la identificación del hongo a nivel de especie por expertos en enfermedades del eucalipto. En función de las características morfológicas que presentó el cancro en este estudio, destacan la presencia de picnidios subcorticales, oscuros, ostiolados y de tamaños variables que se ubican dentro del rango 157.4 a 218.5 μm de largo por 213.3 a 334.5 μm de ancho y un grosor de pared promedio de 21.6 μm . Los conidios fueron unicelulares, hialinos, de forma oval a fusoide, alargados y de tamaños grandes, dentro del rango 19.6 a 22.8 μm de largo por 4.9 a 6.5 μm de ancho. Además de que los cortes de picnidios exhibieron contenidos blancos y paredes negras muy gruesas, estas características son típicas de las especies del género *Botryosphaeria*. Por los tamaños de picnidios y conidios se relaciona con las formas asexuales llamadas *Macrophoma* y *Dothiorella* de las cuales es sinónimo. Por

lo anterior, únicamente podemos decir que el hongo corresponde a una especie de *Fusicoccum*.

Descripción de avances de lesión desarrollados en varetas de eucalipto inoculadas.

En el Cuadro 5, se muestran los tiempos que tardaron las lesiones en cubrir la longitud y perímetro de las varetas. Esta información se presenta con la finalidad de observar el comportamiento de los avances de las lesiones desarrolladas por cada uno de los hongos inoculados, se presentan los resultados por cada uno de los métodos de inoculación, inserción y punción, realizados en las varetas de eucalipto de 8.5 cm de longitud y de un rango de perímetros de 14.81-19.32 mm.

CUADRO 5. Tiempos que tardaron los cancos en cubrir la longitud y perímetro de las varetas de eucalipto inoculadas por el método de inserción (I) y punción (P).

Variable	Cancros inoculados en varetas							
	<i>Lasiodiplodia</i>		<i>Fusicoccum</i>		<i>Cryphonectria</i>		Testigo	
	I	P	I	P	I	P	I	P
Días en cubrir el perímetro de la vareta	17-20	17-20	20-26	23-32	20-29	26-35	-	-
Días en cubrir la longitud de la vareta	20-23	26-29	23-32	32-38	38-44	44-47	-	-

En resumen, el cancro *Lasiodiplodia* con ambos métodos de inoculación, inserción y punción, fueron los más rápidos en cubrir la longitud y perímetro de las varetas, después le siguió el cancro *Fusicoccum* con ambos métodos de inoculación y por último el cancro *Cryphonectria* fue el que más tardó en cubrir la longitud y perímetro de las varetas, lo cual se resume en la Figura 3. En los tres cancos inoculados, el método por inserción fue en promedio, el que menos tiempo requirió para cubrir el perímetro y longitud de las varetas; lo anterior se debió principalmente a la herida realizada que expone el xilema, logrando poner en contacto directo con ella, toda la superficie del inóculo, mientras que por el método de punción, sólo una pequeña cantidad de micelio fue insertado al interior de la corteza con las punciones realizadas. En cada uno de los cancos y con ambos métodos de inoculación, se registraron los signos y síntomas típicos de la enfermedad. Sin embargo, los tratamientos Testigo no presentaron desarrollo de infección alguna durante el período de evaluación.

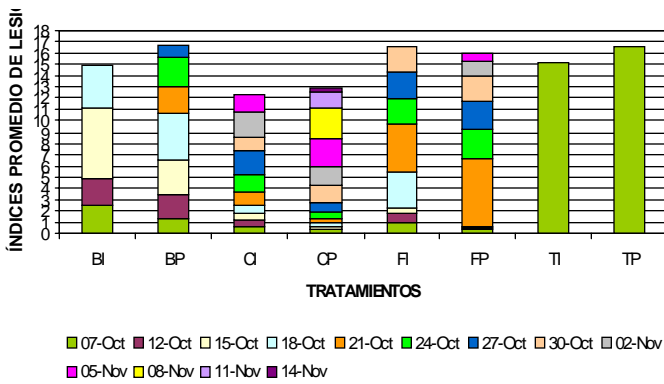


Figura 3. Índices promedio de lesión desarrollados por cada uno de los canchros inoculados en las varetas de eucalipto. Chapingo, México; 1999.

Porcentajes de infección desarrollados en las plantas, con dos métodos y dos partes de inoculación.

Los porcentajes de infección desarrollados en condiciones de invernadero en las plantas de 110 cm de altura y perímetros dentro del rango de 22.80 a 26.72 mm, y que fueron inoculadas con tres diferentes canchros más un testigo, dos métodos y dos partes de inoculación, se resumen en la Figura 4. En ella se puede observar que los mayores porcentajes de infección se registraron en los tratamientos: *Cryphonectria* por método de inserción en la parte alta (CIA), *Lasiodiplodia* por el método de punción en la parte alta (BPA) y parte baja (BPB), en todos los tratamientos se presentaron los síntomas típicos de la enfermedad.

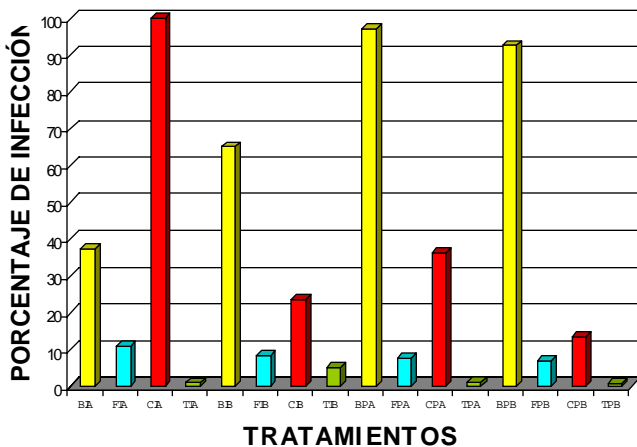


Figura 4. Porcentaje de infección desarrollados en las plantas de eucalipto inoculadas con tres canchros más un testigo, dos métodos y dos partes de inoculación. Chapingo, México; 1999.

Análisis de varianza realizado a los índices de lesión obtenidos para cada uno de los canchros, inoculados con dos métodos en las varetas de eucalipto.

Para analizar los índices de lesión desarrollados por cada uno de los canchros inoculados en las varetas de eucalipto, se utilizó el programa de computo SAS (Versión 6.12).

De esta forma, los resultados mostraron que para el canchro *Lasiodiplodia*, existen diferencias significativas a un nivel de confiabilidad del 95 % entre los métodos de inoculación realizados: inserción y punción. Con la prueba de Tukey realizada a las medias de índices de lesión desarrollados en el canchro *Lasiodiplodia*, se observó que el método de inserción fue el que presentó los mayores promedios de índices de lesión con 3.55 cm².

Mientras que para el canchro *Cryphonectria*, y el canchro *Fusicoccum*, los análisis de varianza realizados a un nivel de confiabilidad del 95 %, no presentaron diferencias significativas entre los métodos de inoculación: inserción y punción realizados. Con la prueba de Tukey, únicamente podemos decir que el canchro *Cryphonectria* presentó un índice de lesión promedio de 1.22 cm², siendo ligeramente el método de inserción el que presentó un mayor índice de lesión con 1.28 cm², mientras que la prueba de Tukey para el canchro *Fusicoccum* sólo se presentó un índice de lesión promedio de 2.13 cm², siendo el método de inserción en donde se alcanzaron ligeramente los mayores promedios de índices de lesión con 2.41 cm².

Análisis de varianza realizado a los índices de lesión obtenidos para cada uno de los canchros, inoculados con dos métodos y dos partes de inoculación en los árboles de eucalipto.

Se utilizó el programa de computo SAS (Versión 6.12), para analizar los índices de lesión desarrollados por cada uno de los canchros inoculados en los árboles de eucalipto, al igual que los comportamientos de los métodos de inoculación: punción (P) e inserción (I), y las partes de las plantas inoculadas: alta (A) y baja (B). Para el canchro *Lasiodiplodia*, el análisis de varianza realizado, a un nivel de confiabilidad del 95 %, no mostró diferencias significativas tanto para el factor método de inoculación como para el factor parte inoculada. Con la prueba de Tukey para las medias de índices de lesión desarrollados por el canchro *Lasiodiplodia*, se observó que este canchro presentó un índice de lesión promedio de 7.27 cm².

Mientras que para el canchro *Fusicoccum*, el análisis de varianza realizado, mostró a un nivel de confiabilidad del 95 %, que existen diferencias significativas para el factor

método de inoculación y no así para el factor parte inoculada. Con la prueba de Tukey, se observó que existen diferencias significativas para el factor métodos de inoculación, siendo el método de inoculación por punción el que presentó los mayores promedios con 6.34 cm².

Para el cancro *Cryphonectria*, el análisis de varianza realizado, mostró que a un nivel de confiabilidad del 95 %, existen diferencias significativas tanto para el factor método de inoculación como para el factor parte inoculada. Al realizar la prueba de Tukey para las medias de índices de lesión desarrollados por el cancro *Cryphonectria* con los dos métodos y dos partes inoculadas, se observó que el cancro *Cryphonectria* presentó por el método de inserción los mayores índices de lesión promedio con 8.00 cm², también la parte inoculada alta presentó los mayores índices de lesión con 8.14 cm².

Mientras que para el *Testigo*, el análisis de varianza realizado, a un nivel de confiabilidad del 95 %, no mostró diferencias significativas tanto para el factor método de inoculación como para el factor parte inoculada. Esto se debió principalmente al medio de cultivo PDA limpio, utilizado como fuente de inóculo.

CONCLUSIONES

Los aislamientos y purificaciones de cada uno de los cancos, se realizaron exitosamente en el medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (PDA). Logrando el establecimiento y desarrollo de cada uno de ellos en forma rápida, fácil y económica.

El uso de varetas colocadas en cámara húmeda, permitió desarrollar de una forma controlada y acelerada el desarrollo y establecimiento de los hongos inoculados, ya que se tiene un estricto control de la temperatura de incubación para el desarrollo de los agentes patógenos con la mínima defensa del hospedante. Además dicha metodología permite realizar una estimación de días que requieren cada uno de los hongos para esporular en tejido vegetal.

Los cancos de los géneros *Lasiodiplodia*, *Cryphonectria* y *Fusicoccum* aislados de tejido vegetal enfermo en campo, fueron patogénicos en plantas de *Eucalyptus camaldulensis*.

En función de las características morfológicas de los cancos *Lasiodiplodia* y *Cryphonectria* desarrollados en condiciones de laboratorio e invernadero, así como de los signos y síntomas evaluados, y las observaciones microscópicas hechas de cada uno de ellos, condujeron a la identificación a nivel de especie de los agentes causales de los cancos como: *Lasiodiplodia theobromae* y

Cryphonectria cubensis respectivamente. Mientras que el cancro *Fusicoccum* únicamente se identificó a nivel de género y se relacionó con las formas asexuales llamadas *Macrophoma* y *Dothiorella*.

Para el cancro *Lasiodiplodia*, los mayores promedios en altura, ancho y grosor de pared de los picnidios, se dieron en el hospedante medio de cultivo (M) y los menores promedios fueron los registrados en plantas inoculadas (P) y los obtenidos en campo (C).

Para el cancro *Fusicoccum*, los mayores promedios en altura y grosor de pared de los picnidios, se dieron en el hospedante medio de cultivo (M), y los menores promedios fueron los registrados en el hospedante obtenido en campo (C). Mientras que para la variable ancho de picnidios los mayores promedios fueron los registrados en el hospedante «varetas inoculadas» (V) y los menores promedios se dieron en el hospedante obtenido en campo (C).

Para el cancro *Cryphonectria*, los mayores promedios en altura y grosor de pared de los picnidios, se dieron en el hospedante obtenido en campo, mientras que los mayores anchos de picnidios se dieron en el hospedante: planta inoculada.

En laboratorio, el cancro *Lasiodiplodia* con ambos métodos de inoculación: inserción y punción fue más rápido en cubrir la longitud y perímetro de las varetas, después siguió el cancro *Fusicoccum* con ambos métodos de inoculación y por último el cancro *Cryphonectria* fue el que más tardó con ambos métodos de inoculación en cubrir la longitud y perímetro de las varetas.

En los tres cancos inoculados en varetas de eucalipto en condiciones de laboratorio, el método de inoculación por inserción fue en promedio, el que menos tiempo tardó en cubrir el perímetro y longitud de las varetas. En cada uno de los cancos y con ambos métodos de inoculación, se registraron los signos y síntomas típicos de la enfermedad. Además, se registró una infección del 100% con ambos métodos de inoculación en los tres cancos inoculados.

Los porcentajes de infección desarrollados en las plantas de 110 cm de altura y perímetros dentro del rango de 22.80-26.72 mm en condiciones de invernadero, y que fueron inoculadas con tres diferentes cancos más un testigo, dos métodos y dos partes de inoculación, se concluye que los mayores porcentajes de infección se registraron en los tratamientos: *Cryphonectria* por método de inserción en la parte alta (CIA), *Lasiodiplodia* por el método de punción en la parte alta (BPA) y parte baja (BPB), en todos los tratamientos se presentaron de los síntomas típicos de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

- BARNARD, E. L.; GEARY T.; ENGLISH J.; GILLY P. 1987. Basal cankers and coppice failure of *Eucalyptus grandis* in Florida. USA. *Plant Disease* 71: 358-361.
- CATIE 1991. Plagas y Enfermedades en América Central. Guía de Campo. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. (Serie Técnica. Manual técnico CATIE No 4. Turrialba Costa Rica.
- CONRADIE, E.; SWART W., J.; WINGFIELD M., J. 1990. *Cryphonectria* Canker of *Eucalyptus*, an Important Disease in Plantation Forestry in South Africa. Departments of Plant Pathology and Microbiology. University of the Orange Free State, Bloemfontein.
- FERREIRA, F. A.; REIS, M. S.; ALFENAS C. A.; HODGES, C. S. 1977. Avaliação da Resistência de *Eucalyptus* spp. As cancro causado por *Diaphorte cubensis* Bruner. *Fitopatología Brasileira*. 2: 225-241.
- FLORENCE, E. J. M.; SHARMA, J. K.; Mohanan, C. 1986. A stem canker disease of *Eucalyptus* caused by *Cryphonectria cubensis* in Kerala. Kerala Forest Research Institute Scientific Paper. 66: 384-387.
- GLENN W. 1976. Disease of Russian-olive caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Plant Disease Reporter*. 60:490-494.
- GIBSON, I. A. S. 1981. A canker disease of *Eucalyptus* new to Africa. *FAO For. Genet. Res. Inf.* 10: 23-24.
- LEWIS, R., Jr. 1978. Influence of infection court, host vigor, and culture filtrates on canker production by *Lasiodiplodia theobromae* conidia in sycamore. *Plant Disease Reporter* 35: 29-30.
- STACK R. W.; LAMEY H. A. 1995. Deciduous Tree Diseases. North Dakota State University. Extension Service. p 697.
- WAYNE A. SINCLAIR; HOWARD H. LYON; WARREN T. JOHNSON. 1987. Diseases of trees and shrubs. Department of Plant Pathology, Cornell University. Ithaca, New York. 575 p.