

ENSAYOS DE INOCULACION *IN VITRO* DE *Colletotrichum gloeosporioides* AISLADO DE HOJAS ASINTOMATICAS DE *Citrus limon*

(*In vitro* inoculation assays of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from
symptomless leaves of *Citrus limon*)

Estela L. Durán^{1*}, L. Daniel Ploper¹,
Juan C. Ramallo¹, & João L. Azevedo²

¹Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía y Zootecnia.
Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.

²Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz",
Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, Caixa Postal 83, 113400-970 Piracicaba, SP, Brasil.

*Corresponding author. Mailing address: Cátedra de Fitopatología.
Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán.
Avenida Roca 1900. (4000) Tucumán. Argentina. Phone: 54 381 4330057.
Fax: 54 381 4248025 E-mail: eslidu@fbqf.unt.edu.ar

Palabras clave: *Colletotrichum gloeosporioides*, ensayos de inoculación, *Citrus limon*, Citrange 'Troyer',
endófitos fúngicos, antracnosis.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*, inoculation assays, *Citrus limon*, Citrange 'Troyer', endophytic
fungi, anthracnose.

RESUMEN

Los hongos endofíticos pueden colonizar la parte interna de los tejidos sin causar daños aparentes al hospedador. *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis, es la especie más frecuentemente aislada de plantas sanas de *Citrus limon* en Tucumán. El objetivo de este trabajo fue estudiar, mediante técnicas de inoculación *in vitro*, la capacidad de estos aislamientos de producir infecciones sintomáticas o asintomáticas en plantines de Citrange 'Troyer' (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*) y *C. limon*. Se determinó el poder germinativo de conidios de los aislamientos No.328 y 797 obtenidos de hojas asintomáticas, y el patogénico No. N1. Plantines en tubos de ensayo y macetas fueron inoculados con una suspensión de 10⁵ conidios/ml y mantenidos en cámara de crecimiento a 25-28°C. Los conidios de todas las cepas alcanzaron el máximo de germinación (100%) entre las 6 y 7 horas de la siembra. Los aislamientos No.328 y 797 indujeron síntomas de antracnosis (clorosis de las hojas, necrosis del tallo y hoja, y defoliación) únicamente en los plantines en tubos de

ensayo en macetas no desarrollaron la enfermedad. El aislamiento patogénico produjo síntomas de enfermedad en los plantines en tubos y macetas. La frecuencia de infección asintomática de los plantines en tubo de ensayo fue del 12,5% para las cepas No.328 y 797. Los síntomas de antracnosis producidos por estas 2 cepas en plantines en tubos y no en macetas, indicarían que la falta de preservación de condiciones naturales, favorables al hongo, no resultan las apropiadas para determinar el tipo de simbiosis que ocurre en la naturaleza. Consideramos que la utilización de mutantes endofíticas y la realización de los ensayos en plantas de limón a campo, permitirían estudiar mejor el comportamiento de estos hongos en los tejidos de la planta.

ABSTRACT

Endophytic fungi can colonize the inner part of tissues without causing visible harm to the host. *Colletotrichum gloeosporioides*, causing agent of anthracnose is the species most frequently isolated from healthy plants of *Citrus limon* in Tucumán. The aim of

this paper was to study, by means of in vitro inoculation techniques, the ability of these isolations to produce symptomatic or asymptomatic infections in Citrange "Troyer" (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*) and *C. limon* seedlings. The germinative power of conidia from isolations N° 328 and 797 collected from asymptomatic leaves and pathogenous N° N1 was determined. Seedlings in test tubes and flower pots were inoculated with a 10^5 conidia/ml suspension and kept in a growing chamber at 25-28°C. Conidia from all the strains reached a germination peak (100%) within 6 and 7h of sowing time. Isolations N° 328 and 797 induced anthracnose symptoms (leaf chlorosis, stem and leaf necrosis and defoliation) only in test tubes seedlings, while those in flower pots showed no signs of the disease. Pathogenic isolation caused symptoms of disease in seedlings located in tubes and flower pots. Frequency of asymptomatic infection in test tube seedlings was 12.5% in the case of strains N° 328 and 797. Anthracnose symptoms caused by the latter strains in tube seedlings and not in flower pots would indicate that lack of preservation of natural conditions, suitable for the fungus, would not adequate to determine the kind of symbiosis occurring in nature. We think that the use of endophytic mutants and the performance of assays in lemon plants in the field would make it possible to carry out a thorough study about the behaviour of these fungi in the plant tissues.

INTRODUCCION

Los hongos endofíticos viven en el interior de los tejidos vegetales, generalmente en tallos y hojas sin causar aparentemente daños al hospedero. La distinción entre endofíticos y patógenos latentes no es todavía clara en la práctica agrícola. Hay evidencias que sugieren que los hongos endofíticos han evolucionado directamente de hongos patógenos de plantas; aparentemente los primeros pueden causar síntomas cuando el hospedero está bajo algún tipo de estrés.

Diversos estudios sobre la micobiota endofítica vienen realizándose en numerosos hospederos (Carroll & Carroll, 1978; Petrini et al., 1982; Stone, 1987; Bertoni & Cabral, 1988; Carroll, 1988; Clay, 1988; Petrini & Fisher, 1990; Sinclair, 1991; Wright et al., 1998; Cabral et al., 1999; Sahashi et al., 1999; Azevedo et al., 2000). Los conocimientos sobre la micobiota endofítica en limón son escasos, aún tratándose de una planta leñosa, perenne, y de propagación vegetativa, características de éstas Rutáceas que lo condicionarían como excelente hospedero para hongos endofíticos (Shüpp, 1961; Childs et al., 1965; Glienke, 1995; Wright et al., 1998; Araujo

et al. 2001; Glienke-Blanco et al., 2002).

Colletotrichum gloeosporioides agente causal de la antracnosis de citrus afecta las hojas, tallos y frutos, y tiene una amplia difusión en todas las zonas citrícolas, pero de importancia secundaria en limoneros de Tucumán, pese a estar presente en la mayoría de las quintas en los tejidos senescentes (García, 1996). Fueron descritas dos razas de *C. gloeosporioides* asociadas con las especies de *Citrus*, la SGO (slow-growing-orange) de crecimiento lento y color anaranjado y la FGG (fast-growing-grey) de crecimiento rápido y color gris (Agostini et al., 1992, 1994; Timmer et al., 1994). La raza SGO produce la caída prematura de frutas pero nunca fue observada en cultivares cítricos de Tucumán, la FGG causa la antracnosis y es frecuentemente aislada de tejidos senescentes de cítricos.

Por primera vez se informó en la Argentina la presencia de hongos en los tejidos internos de las plantas sanas de limón (Durán, 2001), siendo *C. gloeosporioides* la especie más frecuentemente aislada de las quintas con limoneros de Tucumán. En el presente estudio, fue evaluada la capacidad de estos aislamientos de *C. gloeosporioides* para producir infecciones sintomáticas o asintomáticas, mediante ensayos de inoculación in vitro en plantines de Citrange «Troyer» (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*) y *Citrus limon*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas. - Fueron usadas las cepas No. 328 y 797 de *C. gloeosporioides*, seleccionadas al azar entre 520 cepas previamente aisladas de hojas sanas de limón Eureka, injertado sobre 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana* Pascuale) y limón Génova injertado sobre Citrumelo 'Swingle' (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradise*), provenientes de las plantaciones de El Manantial y Yacuchina, respectivamente, localizadas en el área citrícola de la provincia de Tucumán, Argentina. La cepa patogénica utilizada No. N1 aislada de una lesión de antracnosis de limón, fue gentilmente cedida por la Lic. Norma Cantón (Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán).

Las características culturales y morfológicas de las cepas fueron similares a las descritas para la raza FGG (Agostini et al., 1992, 1994; Timmer et al., 1994).

Preparación del inóculo. - Las cepas fueron sembradas en Agar Papa Glucosado (APG) en placas de Petri de 90 mm de diámetro e incubadas a 28°C durante 5 días, bajo luz blanca fluorescente. Las suspensiones de conidios fueron realizadas a una concentración de 10^5 células/ml en agua destilada estéril, empleando la cámara de Neubauer para cuantificar los conidios.

Poder germinativo y producción de apresorios.- Se depositaron 2 ml de Agar Agua (AA) 1,5% y APG sobre portaobjetos estériles, y después de solidificados se colocaron sobre su superficie dos gotas de la suspensión de conidios y encima un cubreobjeto esterilizado. Estos portaobjetos fueron incubados en placas de Petri de 90 mm de diámetro sobre dos círculos de papel de filtro humedecidos con agua destilada, a temperatura ambiente. Los ensayos fueron realizados por duplicado. Fue registrado el número de conidios germinados a intervalos de 1 hora a contar del inicio de la germinación, y la producción de apresorios. Cada lectura representó el número medio de conidios germinados en 10 campos microscópicos con aumento de 400 x.

Las hojas desprendidas de plantas de limón libres de *C. gloeosporioides* fueron inoculadas con la suspensión de conidios e incubadas en cámara húmeda a temperatura ambiente, durante 20 días. Las observaciones fueron realizadas en cortes transversales de las hojas en el punto de inoculación, fijados y coloreados con azul de lactofenol a diferentes intervalos de tiempo.

Plantines de limón y control de colonización por hongos endofíticos.- Para los ensayos de patogenicidad se emplearon 32 plantines de Citrange 'Troyer' (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), y 32 plantines de Eureka obtenidos a partir de semillas de limón Eureka injertado sobre 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana* Pascuale), cedidos en tubos de ensayo por la Sección Fruticultura de la Estación Experimental Agroindustrial "Obispo Colombes". La mitad de los plantines en tubos fueron transplantados en macetas conteniendo suelo estéril, y mantenidos un mes en cámara de crecimiento a 25-28°C. Cuando estos alcanzaron una altura de 7-9 cm, antes de ser inoculados, se realizó un control de colonización por hongos endofíticos y epifíticos en el follaje.

Pruebas de patogenicidad.- Los plantines fueron inoculados depositando 5 µl de la suspensión de 10⁵ conidios/ml sobre el haz y envés de cada hoja, en los controles se usó agua destilada estéril. Posteriormente, los plantines fueron incubados en una cámara de crecimiento a 25-28°C, bajo luz blanca continua.

La observación de la manifestación de síntomas de antracnosis fue realizada durante tres meses. Las hojas sintomáticas fueron retiradas, desinfectadas superficialmente con alcohol 70° durante 30 s, NaClO 5% por 90 s, y lavadas con agua destilada estéril. Los fragmentos de hojas fueron sembrados en placas de Petri con APG adicionado con penicilina (20 U/ml) y estreptomycin (40 µg/ml) e incubadas a 28°C durante 7 días.

Después de un mes de incubación de los plantines asintomáticos fueron retiradas cuatro hojas de cada plantín realizándose el control de infección, empleando el mismo procedimiento descrito para las hojas sintomáticas. La desinfección fue realizada en tiempos mas reducidos que los usados habitualmente para el aislamiento de los hongos endofíticos (Araujo et al. 2002), para evitar la eliminación de éstos de los tejidos foliares jóvenes donde el espesor de la cutícula y epidermis es menor.

RESULTADOS Y DISCUSION

La germinación de los conidios de *C. gloeosporioides* se inició dos horas después de la siembra en portaobjetos, conteniendo AA y APG. Los aislamientos endofítico No. 328 y el patogénico N1, alcanzaron el índice máximo de germinación (100%) 6 hrs posteriores a la siembra, mientras la cepa No.797, alcanzó un índice semejante recién a las 7 hrs de la siembra (Tabla 1).

Después de 6 hrs de incubación de los portaobjetos con AA y APG se inició la formación de apresorios a partir del tubo germinativo de los conidios (Figura.1). En las hojas, los apresorios comenzaron a observarse a las 8 hrs posteriores a la siembra.

El número de conidios que formaron apresorios fue similar en los dos medios de cultivo ensayados. Según Bailey et al. (1992), es necesario la formación de apresorios para que ocurra la penetración fúngica en tejidos jóvenes. Coincidentemente, Dickman et al. (1995) afirmaron que el desarrollo del apresorio es aparentemente un prerequisite para la penetración del hongo y posterior colonización del hospedador, mientras que la germinación del conidio es un prerequisite para la formación del apresorio. La producción de apresorios por

Tabla 1 - Velocidad de germinación de conidios de *C. gloeosporioides*

Tiempo después de la siembra (minutos)	Porcentaje de conidios germinados					
	Cepa No. 328		Cepa No. 797		Cepa No. N1	
	AA	APG	AA	APG	AA	APG
120	0	1	1	0	0	2
180	30	28	20	18	29	23
240	61	56	38	31	64	60
300	88	75	58	52	81	73
360	100	97	85	82	100	96
420	-	-	100	96	-	-

AA: Agar Agua.

APG: Agar Papa Glucosado.

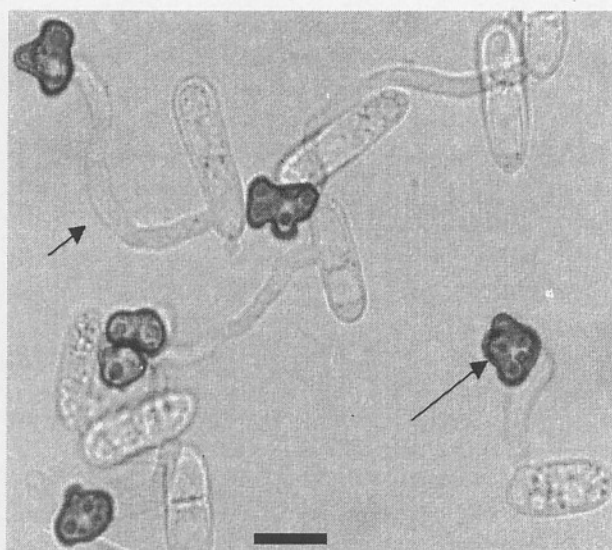


Figura 1 - Fotomicrografía de conidios germinados de *C. gloeosporioides* cepa No. 328. Apresorio (flecha mayor) y tubo germinativo (flecha menor) en Agar Agua 2,5% después de 24 horas. Escala de la barra: 10 μ m

las cepas analizadas, aún en la ausencia del tejido del hospedador, coincide con lo informado previamente por Bailey *et al.* (1992) para las especies de *Colletotrichum*. Estos autores, observaron que en estas especies el apresorio se forma fácilmente cuando el conidio germina sobre una superficie dura, tal como vidrio de un portaobjeto o una membrana de nitrocelulosa.

El control de infección de los plantines demostró que el 81,8% de éstos estaban infectados con hongos endofíticos, correspondiendo el 76% a micelio estéril claro, y el 5,8% restante a *Nodulisporium* sp. Los hongos epifíticos colonizaron el 100% de los plantines, siendo los más frecuentes *Penicillium* spp. y levaduras, seguidos en menor frecuencia por *Aspergillus* spp., micelio estéril claro, y *Cladosporium* sp. La ausencia de *C. gloeosporioides*, permitió la utilización de esos plantines para realizar las pruebas de inoculación de estas especies fúngicas.

Como se observa en la Tabla 2, los aislamientos endofíticos No. 797 y 328, indujeron síntomas de antracnosis (clorosis de las hojas, necrosis de tallo y hoja, y defoliación) únicamente en los plantines en tubos de ensayo (Figura 2).

Los plantines de macetas no fueron susceptibles de desarrollar enfermedad cuando fueron inoculados con estos endofíticos. En tanto, el aislamiento patogénico No. N1, fue capaz de producir síntomas de enfermedad en los plantines tanto en tubos de ensayo, como en macetas.

A partir de los fragmentos de tejidos de lesio-

Tabla 2 - Patogenicidad de las cepas de *C. gloeosporioides* y porcentaje de colonización asintomática de los plantines

Hospedero Aislamiento (No.)	No. plantines con síntomas ¹ por plantines inoculados	% de fragmentos de hojas infectados en plantines asintomáticos ¹
Citrangé 'Troyer' (en tubos de ensayo)		
328	24	12,5%
797	24	12,5%
N1	34	25%
Control	04	0%
Citrangé 'Troyer' (en macetas)		
328	04	0%
797	04	0%
N1	24	0%
Control	04	0%
Eureka/Volkameriano (en tubos)		
328	14	12,5%
797	04	0%
N1	14	25%
Control	04	0%
Eureka/Volkameriano (en macetas)		
328	04	0%
797	04	0%
N1	14	0%
Control	04	0%

¹ Quince días después de la inoculación.

² Fueron analizados los fragmentos de hojas, recolectadas de plantines asintomáticos después de un mes de realizada la inoculación.

nes, fueron obtenidos cultivos puros de las cepas inoculadas, posibilitando la verificación de los postulados de Koch.

La inducción de síntomas en los plantines en tubos de ensayo y no así en los de macetas por los endofíticos, estaría relacionada principalmente a dos factores. El primero, sería la humedad relativa próxima al 100% que favoreció la germinación de los conidios y el desarrollo del hongo, y el segundo a la falta total de competencia con otros microorganismos, que ciertamente ayudaron el establecimiento de la infección. Estas condiciones no serían las apropiadas para estudiar el carácter endofítico de un microorganismo, ya que según Azevedo (1998), la falta de preservación de las condiciones naturales de la planta, favorecería al microorganismo. También, el desarrollo de los hongos inoculados en el medio

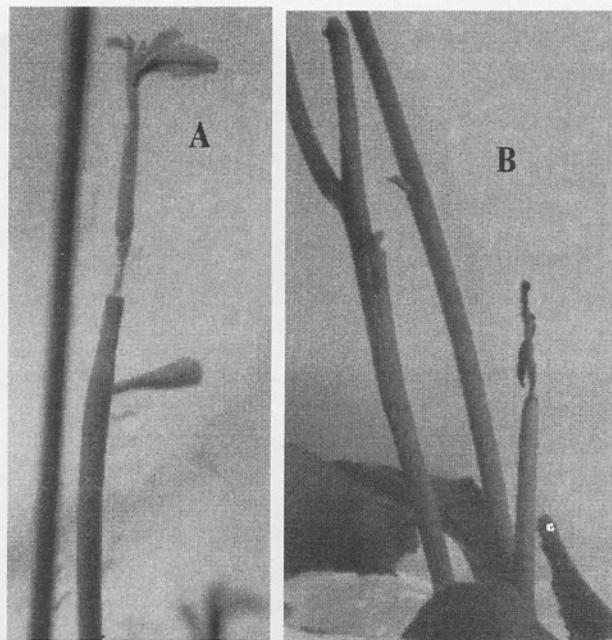


Figura 2 - Plantines de Citrange 'Troyer' (en tubos) después de 21 días de inoculación con *C. gloeosporioides*. Se observa necrosis en hojas y tallos. A - Plantín inoculado con la cepa No. 797. B - Plantín inoculado con la cepa No. 328.

de cultivo usado para el crecimiento de los plantines en tubos de ensayo, perjudicó la interpretación de los resultados, debiendo en ese caso repetirse las inoculaciones en nuevos plantines.

Por otro lado, las condiciones de estrés de las plantas en tubos de ensayo, también inducirían la transición de un estado endofítico mutualístico a uno patogénico o antagónico. Estos resultados fueron confirmados por Petrini (1991). Según este autor, las infecciones asintomáticas por hongos patógenos sugerirían que la simbiosis endofítico-hospedador no puede ser representada conceptualmente como una relación estática. Las alteraciones fisiológicas del endofítico, así como modificaciones en la susceptibilidad del hospedador causado por estrés, juegan un importante papel en el cambio de un tipo de simbiosis a otra, ya sea de mutualística a antagónica o neutra.

La frecuencia de infección asintomática de los plantines en tubos de ensayo inoculados con *C. gloeosporioides* fue 12,5% para los aislamientos endofíticos. No fue posible el aislamiento de los endofíticos, ni tampoco del patógeno, de los plantines asintomáticos mantenidos en macetas. Los valores encontrados *in vitro*, fueron visiblemente inferiores a la ocurrencia de campo, donde el menor porcentaje observado fue 34,7% (en Yacuchina) (Duran, 2001). Esta diferencia estaría rela-

cionada a las sucesivas infecciones por endofíticos que ocurren en las plantas en condiciones naturales, donde *C. gloeosporioides* se encuentra como saprófito en ramas secas, hojas o frutos momificados y en heridas cuticulares de tejidos verdes.

El proceso de interacción de *C. gloeosporioides* con el hospedador aún es desconocido. Para el esclarecimiento de varios aspectos involucrados en el proceso de infección, serían necesarios nuevos ensayos, realizados en plantas en campo, inoculadas con mutantes endofíticas de este hongo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán Programa No. 26/A215, y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas No. 4960/96. Los autores agradecen a la Dra. Aline Pizzirani-Kleiner, por las facilidades concedidas en el laboratorio de Genética de Microorganismos del Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

REFERENCIAS

- Agostini, J.P.; Timmer, L.W. & Mitchell, D.J. (1992). Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82:1377-1382
- Agostini, J.P. & Timmer, L.W. (1994). Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. *Phytopathology* 84:420-425
- Araujo, W.L.; Maccheroni Jr., W.; Aguilar-Vildoso, C.I.; Barroso, P.A. V.; Saridakis, N. O.; Azevedo, J.L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47: 229-236
- Araujo, W.L.; Lima, A.O. de S.; Azevedo, J.L.; Marcon, J.; Sobral, J.K.; Lacava P.T. (2002). Manual: isolamento de microorganismos endofíticos. CALQ, Piracicaba, Brasil
- Azevedo, J.L. (1998). Microorganismos endofíticos. In: *Ecologia Microbiana*. I. S. Melo, and J. L. Azevedo, eds. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna, Brasil. pp. 117-137
- Azevedo, J.L.; Maccheroni, W., Jr.; Pereira, J.O. & Araujo, W.L. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4/
- Bailey, J.A.; O'Connell, R.J.; Pring, R.J. & Nash, C. (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey, and M. J. Jeger, eds. CAB International, Wallingford, England
- Bertoni, M.D. & Cabral, D. (1988). Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis* II: Distribution of endophytes. *Nova Hedwigia* 46:491-502
- Cabral, D.; Cafaro, M.J.; Saidman, B.; Lugo, M.; Reddy, P.V.; White, J.F., Jr. (1999). Evidence supporting the occurrence of a new species of

- endophyte in South American grasses. *Mycologia* 91:315-325
- Carroll, G.C. & Carroll, F.E.** (1978). Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Can. J. Bot.* 56:3034-3043
- Carroll, G.C.** (1988). Fungal Endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69:2-9
- Childs, J.F.L., Kopp, L.E. & Johnson, R.E.** (1965). A species of *Physoderma* present in citrus and related species. *Phytopathology* 55: 681-687
- Clay, K.** (1988). Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69:10-16
- Dickman, M.B.; Buhr, T.L.; Warwar, V.; Trusdell, G.; Huang, C.X.** (1995). Molecular signals during the early stages of alfalfa anthracnose. *Can. J. Bot.* 73:1169-1177
- Durán, E.L.** (2001). Aislamiento, identificación y diversidad genética de hongos endofíticos de limón. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- García, M.A.** (1996). Plantación y mantenimiento de la quinta. In: Manual de Producción de Limón. M.O., Haro, ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Famaillá, Tucumán, Argentina. pp. 113-190
- Glienke, C.** (1995). Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD. Tese M.Sc. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.
- Glienke-Blanco, C.; Aguilar-Vildoso, C.I.; Carneiro-Vieira, M.L.; Barroso, P.A.V.; Azevedo, J.L.** (2002). Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. *Genet. and Mol. Biol.* 25:251-255
- Petrini, O.; Stone, J. & Carroll, F.E.** (1982). Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: A preliminary study. *Can. J. Bot.* 60:789-796
- Petrini, O. & Fisher, P.J.** (1990). Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. *Mycol. Res.* 94:1077-1080
- Petrini, O.** (1991). Fungal endophyte of tree leaves. In: *Microbial Ecology of Leaves*. J. H. Andrews, and S.S. Hirano, eds. Springer-Verlag, New York, USA. pp. 179-197
- Sahashi, N.; Kubono, T.; Miyasawa, Y. & Ito, S.** (1999). Temporal variations in isolation frequency of endophytic fungi of Japanese beech. *Can. J. Bot.* 77:197-202
- Shüepp, H.** (1961). Untersuchungen über *Guignardia citricarpa* Kiely, den erregere der scharzfleckenkrankheit auf citrus. *Phytopathol. Z.* 40:258-271
- Sinclair, J.B.** (1991). Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant. Dis.* 75: 20-224
- Stone, J.K.** (1987). Initiation and development of latent infections by *Rhabdochloa parkeri* on Douglas-fir. *Can. J. Bot.* 65:2614-2621
- Timmer, L.W.; Agostini, J.P.; Zitko, S.E. & Zulfiqar, M.** (1994). Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. *Plant Disease* 78:329-334
- Wright, J.G.; Johnson, G.I. & Hyde, K.D.** (1998). Studies on the endophytic mycota of *Citrus* spp. In: *Disease resistance in fruit. Proceedings of an international workshop held at Chiang Mía, Thailand, 18-21 May 1997*. G.I. Johnson, and E. Highley, eds. ACIAR-Proceedings-Series No. 80. pp. 167-171