

Rol patogénico de la micoflora asociada a las manchas de las frutas de café^{1,2}

Lenith A. Arocho³, Rocío del P. Rodríguez⁴ y Carlos Betancourt⁵

J. Agric. Univ. P.R. 89(1-2):85-96 (2005)

RESUMEN

En cafetales de varias localidades de Puerto Rico, se recolectaron frutos de café con diferentes tipos de lesiones. Las frutas se clasificaron en una escala de 0 al 6 de acuerdo a la forma y color de las lesiones presentes. Se utilizaron tres métodos para aislar la micoflora de las lesiones. Especies de *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Cercospora*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Aspergillus* fueron aisladas de las frutas con variaciones en frecuencia. Las heridas y el estado de maduración de la fruta influenciaron el tamaño de la lesión y la patogenicidad de algunos aislados. Pruebas de patogenicidad identificaron a *Cercospora coffeicola*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. dematium* como patógenos primarios en la etiología de las manchas de las frutas de café.

Palabras clave: *Coffea arabica*, enfermedades de la fruta, métodos de aislamiento

ABSTRACT

Pathogenic role of the mycoflora associated with coffee fruit spots

Coffee fruits with different types of spots were collected on coffee farms at various locations in Puerto Rico. Fruits were classified on a scale from 0 to 6 on the basis of color and morphology of the lesions. Three methods were used to isolate the mycoflora from the lesions. Species of *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Cercospora*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Aspergillus* were isolated with variations in frequency. Wounds and fruit maturation influenced lesion length and pathogenicity of some isolates. Pathogenicity trials identified *Cercospora coffeicola*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. dematium* as primary pathogens in the etiology of fruit spots in coffee.

Key words: *Coffea arabica*, fruit diseases, isolation methods

¹Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 18 de mayo de 2004.

²Los autores agradecen a la Dra. Felicitia Varela por su colaboración en las primeras etapas de esta investigación.

³Directora Conservación y Ornato, Departamento de Obras Públicas, HC-0516711, San Sebastián, PR.

⁴Fitopatóloga (Ad Honorem), Departamento Protección de Cultivos, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico-Mayagüez, P.O. Box 9030, Mayagüez, PR 00681-9030.

⁵Catedrático (Retirado), Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico-Mayagüez.

INTRODUCCIÓN

El café es susceptible a enfermedades que ocurren en todas las etapas del desarrollo, desde la germinación hasta la fructificación. La enfermedad de las frutas se caracteriza por manchas que varían en morfología y color. Las lesiones pueden ser alargadas y secas con borde oscuro y centro claro, irregulares de color marrón, negras y húmedas sin patrón definido, o localizadas y redondas con centro levemente hundido. En una fruta pueden estar presentes uno o varios tipos de lesiones, particularmente si la misma está en etapa de maduración intermedia (amarillas). La incidencia de las enfermedades de las frutas se favorece por la alta humedad relativa asociada a lluvias abundantes. Cuando estas condiciones ambientales coinciden con la formación y desarrollo de los frutos se favorece la invasión de los tejidos (García y Guzmán, 1993).

La micoflora de las frutas de café es diversa y es común encontrarla asociada a las lesiones, indistintamente del estado de madurez de la fruta. Mignucci et al. (1985) informaron a *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cercospora coffeicola*, *Fusarium stilboides*, *Aspergillus* sp. y *Nigrospora* sp. en frutos verdes, maduros y momificados. *Fusarium oxysporum* y *F. semitectum* estuvieron asociados solamente a las lesiones de los frutos verdes, y *Phomopsis* sp. a los momificados. Estos autores añaden que, aunque en ocasiones *C. gloeosporioides*, *C. coffeicola* y *F. stilboides* fueron asociados individualmente a las manchas, prevalece encontrarlos omnipresentes en todas las lesiones sugiriendo sucesión en la colonización de los tejidos. Alves y de Castro (1998) reportaron a *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., y *Penicillium* sp. en todas las fases de maduración, *Colletotrichum* sp. y *Phoma* sp. en frutas verdes y rojas, y *Cercospora* sp. en las verdes. Phiri et al. (2001) informaron sobre una fusariosis de la fruta del café causada por *F. stilboides* muy común en Malawi.

La gran mayoría de los informes sobre las enfermedades de la fruta describen la micoflora en asociación a las lesiones, pero los estudios de patogenicidad son escasos. Pruebas preliminares de patogenicidad indicaron que *Cercospora* sp. y *Colletotrichum* sp. son patogénicos a los frutos del café, pero el síndrome preciso de la enfermedad no se pudo reproducir en el laboratorio ni en el invernadero (Schieber et al., 1970).

Evaluaciones sobre el impacto económico de las enfermedades de la fruta indican que hay una disminución significativa en el peso (García y Guzmán, 1993). Schieber et al. (1970) describen manchas que aparecen cuando comienza la maduración y pueden afectar del 40 al 50% de las frutas, reduciendo la calidad de las mismas. Mignucci et al. (1985) informaron pérdidas de 23.9% en producción y 19.3% en rendimiento atribuibles a enfermedades de las frutas.

En Puerto Rico, la fortaleza del cafeto hace que muchas de las enfermedades infecciosas pasen desapercibidas o sean consideradas parte de la flora normal, con poco impacto en la producción del café o en la longevidad de la plantación. Este concepto es aplicado particularmente a las manchas en las frutas, las cuales comúnmente se atribuyen a efectos de la exposición directa al sol (caricambio), a la excesiva producción o a cercosporiosis.

Sin minimizar el rol que los factores abióticos puedan tener en la etiología de las manchas de las frutas o a la interacción con organismos patógenos, consideramos necesario caracterizar la micoflora asociada a los diferentes tipos de manchas en las frutas y determinar la patogénesis de esta flora y su rol primario en el desarrollo de las lesiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de frutas de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de plantaciones localizadas en los municipios de San Sebastián (var. Bourbon), Las Marías (var. Caturra) y Adjuntas (vars. Typica y Caturra). Indistintamente del estado de madurez, se seleccionaron frutas que mostraban síntomas y se clasificaron de acuerdo a la morfología y color de las lesiones, donde 0 = fruto sin lesiones, 1 = mancha marrón circular de borde irregular, 2 = mancha marrón alargada, 3 = mancha negra alargada, 4 = mancha negra circular de borde irregular, 5 = mancha negra transversal que cubre la mitad de la fruta, y 6 = fruto completamente negro.

Aislación de la micoflora. Se utilizaron los protocolos de cámara húmeda, dilución de propágulos desarrollados en las lesiones incubadas en cámara húmeda, y siembra de tejidos en agar de papa y dextrosa (APD). Para la cámara húmeda, se colocaron tres frutos representativos de cada clasificación sobre laminillas estériles en platos de Petri con papel de filtro humedecido. Cada clasificación estuvo representada por nueve frutos. Para las diluciones, los frutos incubados en cámara húmeda se sumergieron individualmente en 10 ml de agua destilada estéril; se llevaron a cabo diluciones hasta 10^4 . De cada dilución se tomó 1 ml y se distribuyó en platos de Petri con agar de papa y dextrosa acidulado (APDac). En ambos métodos la incubación fue por un máximo de 48 h bajo condiciones de luz difusa y a 22° C. Los propágulos formados en las cámaras húmedas se transfirieron directamente a APD. Para la siembra de los tejidos, las frutas clasificadas se desinfectaron por separado utilizando inmersión por tres minutos en cada uno de los siguientes: 70% alcohol etílico, 10% detergente comercial clorinado, y agua destilada estéril. Los pedazos de tejido se tomaron del borde de las lesiones y se sembraron en APD.

Las colonias obtenidas se purificaron en APD. Los aislados de *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y *Colletotrichum* sp. se purificaron como cultivos monospóricos. La identificación de los géneros y especies se llevó a cabo utilizando las claves taxonómicas de Arx (1981), Barnett y Hunter (1987), Booth (1971, 1977), Joffre (1986), y Toussoun y Nelson (1976).

Pruebas de patogenicidad in vitro. Se llevaron a cabo tres pruebas de patogenicidad con frutas de cafetos, var. Caturra, provenientes de la Finca Alzamora del Recinto Universitario de Mayagüez. La primera prueba se realizó con todos los aislados utilizando glomérulos con frutas verdes colocados en cámaras húmedas. Se inocularon cuatro frutos en cada glomérulo y se observaron diariamente para el desarrollo de síntomas. La segunda prueba se llevó a cabo para determinar el efecto de la etapa de maduración y condiciones de exposición al sol de la fruta en la patogénesis. Se coleccionaron frutas verdes y comenzando a madurar (pintas) de ramas que se encontraban a la sombra o expuestas al sol y se inocularon con los micopatógenos seleccionados en la primera prueba. El porcentaje de frutas con síntomas y el tamaño de la lesión fueron criterios de evaluación que se examinaron por análisis de varianza. Una tercera prueba se realizó para determinar si las heridas en el fruto son factores importantes en la patogénesis. Las heridas al fruto verde se hicieron con una aguja desinfectada en alcohol y marcada a 2 mm para garantizar uniformidad en la profundidad de la herida. Frutas con y sin heridas se inocularon individualmente con cada aislado seleccionado.

En todas las pruebas de laboratorio las frutas seleccionadas fueron asintomáticas y desinfectadas según descrito anteriormente. Las frutas tratadas se colocaron sobre planchas de acrílico en un sistema de cámara húmeda compuesto por cajas plásticas que contenían las planchas de acrílico colocadas sobre esponjas de celulosa humedecidas con agua destilada estéril. Antes de las inoculaciones los frutos se mantuvieron por 24 h en las cámaras para estabilizar el sistema. Para las inoculaciones, se tomaron discos de 3 mm de diámetro del centro de la colonia de los aislados cultivados en APD por 21 días a 22° C y bajo luz difusa. Los testigos fueron frutas inoculadas con discos de APD solamente. Treinta días después de inoculados se seleccionaron los frutos que mostraron síntomas, se midió el tamaño de la lesión inducida (largo × ancho) y se sembraron pedazos del tejido infectado en APD. Cada tratamiento, aislado evaluado y testigo, estuvo representado por 12 frutas inoculadas distribuidas en un diseño completamente al azar. La temperatura máxima promedio fluctuó de 23.3 a 23.5° C y la mínima de 20.1 a 20.8° C.

Pruebas de patogenicidad en el campo. Durante la época de producción de frutos (julio a octubre) se llevaron a cabo cuatro pruebas utilizando aislados patogénicos seleccionados de las pruebas in vitro. Las primeras dos pruebas se realizaron para examinar el efecto de

cámara húmeda en el desarrollo de los síntomas. En la primera prueba todas las ramas tratadas se cubrieron con bolsas plásticas por 15 h. En la segunda prueba se utilizaron dos ramas por tratamiento; una fue cubierta por 15 h y la otra se mantuvo descubierta. En las próximas dos pruebas las ramas con frutas tratadas no se cubrieron con bolsas plásticas después de inoculadas.

En una plantación localizada en el Barrio Juncal del municipio de San Sebastián, se seleccionaron al azar cinco cafetos de la var. Caturra y se marcaron ramas con frutos verdes asintomáticos. Se utilizaron seis glomérulos en cada rama, excluyendo los de los extremos, y se inocularon cuatro frutas en cada glomérulo. Se utilizó un aislado por rama y los testigos consistieron de frutas tratadas con discos de APD solamente. Las inoculaciones se realizaron aproximadamente a las 4:00 pm utilizando la técnica de discos y heridas similar a la utilizada en las pruebas de patogenicidad *in vitro*. Las frutas se examinaron cada dos días para expresión de síntomas. Los criterios de evaluación fueron la presencia de síntomas y el porcentaje de frutas enfermas producto de la inoculación. La temperatura máxima promedio fue de 32.2° C y la mínima 14.4° C, la humedad relativa máxima fue de 97% y la mínima 43%, y la precipitación fue de 57.4 cm.

RESULTADOS

Aislaciones de la micoflora. El método de aislamiento utilizado influyó la frecuencia de los géneros encontrados. *Fusarium* spp., *Cercospora coffeicola* y *Colletotrichum* spp. fueron los géneros de hongos predominantemente aislados, indistintamente del tipo de lesión o del método de aislamiento (Cuadro 1). *Fusarium* spp. se encontró asociado a todas las frutas clasificadas y se observó que la frecuencia de colonias obtenidas aumentó proporcionalmente con la severidad de las lesiones. *Colletotrichum* spp. también se encontró asociado a todas las frutas, aunque con mayor frecuencia en las frutas asintomáticas, en las lesiones redondas color marrón y en las redondas negras. *Cercospora coffeicola* fue mayormente encontrado asociado a las frutas con lesiones alargadas color marrón o alargadas negras.

Fusarium spp. y *C. coffeicola* se aislaron con mayor frecuencia cuando se utilizó el método de cámara húmeda, mientras que *Colletotrichum* spp. fue aislado más frecuentemente de la siembra de pedazos de lesión en medio PDA (Figura 1). Igualmente, la frecuencia de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Cladosporium* fluctuó de acuerdo al método de aislamiento. El método de diluciones no permitió determinar la frecuencia de los géneros debido a la presencia de bacterias y a la dificultad para separar las colonias.

CUADRO 1.—Porcentaje de colonias de hongos asociados a las lesiones en las frutas de café de acuerdo a la clasificación.

Género aislado	Escala de clasificación de las lesiones ²						
	0	1	2	3	4	5	6
<i>Cercospora</i>	11 ¹	9	21	16	2	0	3
<i>Colletotrichum</i>	51	53	27	28	43	13	13
<i>Fusarium</i>	20	30	37	35	54	87	70
<i>Cladosporium</i>	18	0	0	11	1	0	10
<i>Trichoderma</i>	0	8	11	5	0	0	1
<i>Penicillium</i>	0	0	4	2	0	0	3
<i>Aspergillus</i>	0	0	0	3	0	0	0

¹Promedio de 30 siembras utilizando los métodos de cámara húmeda y siembra de tejido enfermo en APD.

²0 = fruto asintomático, 1 = lesión redonda marrón, 2 = lesión alargada marrón, 3 = lesión alargada negra, 4 = lesión redonda negra, 5 = lesión transversal negra, 6 = fruto completamente negro.

Fusarium spp. se aisló con igual frecuencia indistintamente de la localidad y la variedad de cafeto (Figuras 2A, B). La aislación de *Colletotrichum* spp. no fue afectada por la variedad, pero sí por la localidad, siendo mayor en Adjuntas. La frecuencia de *C. coffeicola* varió de

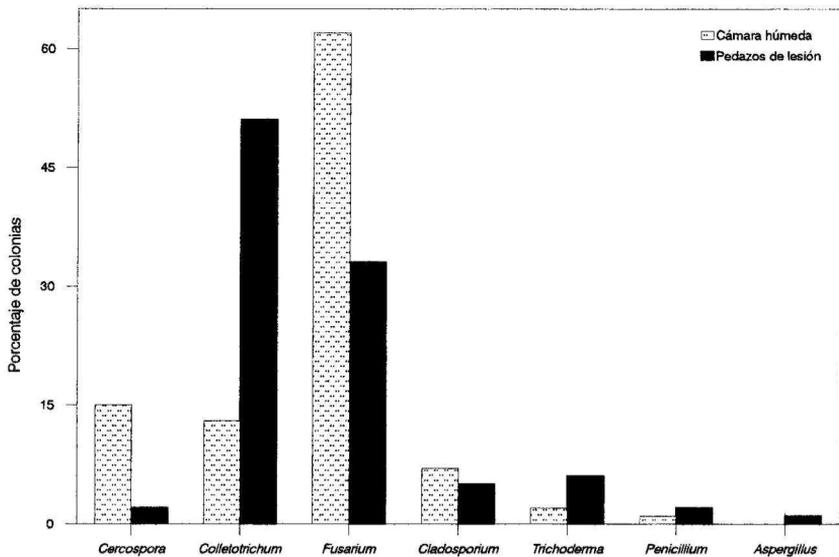


FIGURA 1. Frecuencia de los géneros de hongos asociados a las lesiones de frutas de café de acuerdo al método utilizado para aislar.

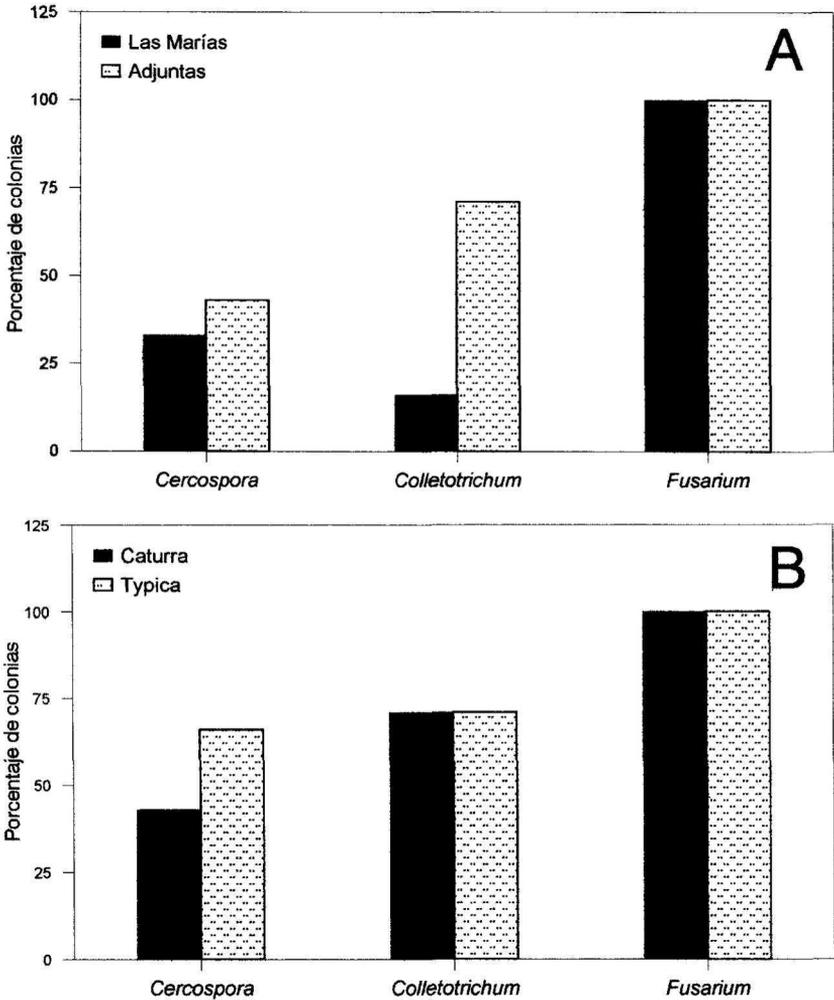


FIGURA 2. Influencia de la localidad y la variedad del cafeto en la frecuencia de los principales géneros de hongos asociados a las lesiones de frutas. A. Localidad en la variedad Caturra. B. Variedad en la localidad de Adjuntas.

acuerdo a la variedad y localidad ya que fue aislada con mayor frecuencia de la variedad *Typica* y en la localidad de Adjuntas.

Pruebas de patogenicidad en el laboratorio. En total se inocularon 65 aislados: 33 *Fusarium* spp., 10 *Penicillium* spp., ocho *Trichoderma* spp., cinco *Cladosporium* spp., seis *Colletotrichum* spp. y tres *Cer-*

cospora coffeicola. El 50% de los aislados de *Colletotrichum* spp. y de *Fusarium* spp. fueron patogénicos aunque variaron en virulencia (Cuadro 2). Esta variación en virulencia fue observada en todas las pruebas de laboratorio por lo que la selección de los aislados para las pruebas realizadas se fundamentó en la consistencia de la patogenicidad y en la virulencia. *Fusarium decemcellulare* y algunos aislados de *F. solani* causaron manchas alargadas; las lesiones inducidas por los restantes aislados inoculados fueron redondas y negras. *Trichoderma*, *Cladosporium* y *Penicillium* no fueron patogénicos.

El estado de maduración influyó significativamente el tamaño de la lesión inducida (Figura 3). Los patógenos inoculados en las frutas pintas causaron lesiones de mayor tamaño que las obtenidas en las frutas verdes. La exposición al sol no afectó significativamente el desarrollo de las lesiones. La presencia de heridas al momento de la inoculación facilitó la patogénesis garantizando el éxito de la inoculación y favoreció el desarrollo de lesiones de mayor tamaño.

CUADRO 2.—Aislados patogénicos en frutas verdes bajo condiciones de laboratorio.

Aislados ¹	(Código)	Porcentaje de frutas con lesiones ²
<i>Fusarium solani</i>	(11a)	50
<i>F. solani</i>	(12)	100
<i>F. solani</i>	(19a)	50
<i>F. solani</i>	(21)	50
<i>F. solani</i>	(24c)	50
<i>F. solani</i>	(27a)	50
<i>F. solani</i>	(32b)	62
<i>F. solani</i>	(35)	50
<i>F. solani</i>	(84)	100
<i>F. oxysporum</i>	(15)	100
<i>F. oxysporum</i>	(40)	75
<i>F. avenaceum</i>	(24b)	25
<i>F. dimerum</i>	(102)	41
<i>F. equiseti</i>	(108)	37
<i>F. decemcellulare</i>	(112)	41
<i>Fusarium</i> sp.	(24a)	25
<i>Fusarium</i> sp.	(36a)	12
<i>Fusarium</i> sp.	(48)	25
<i>Cercospora coffeicola</i>	(May.)	37
<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	(18b)	62
<i>C. dematium</i>	(110)	75
Testigos		0

¹El total de aislados inoculados fue 65.

²Promedio de tres repeticiones con cuatro frutas inoculadas por repetición.

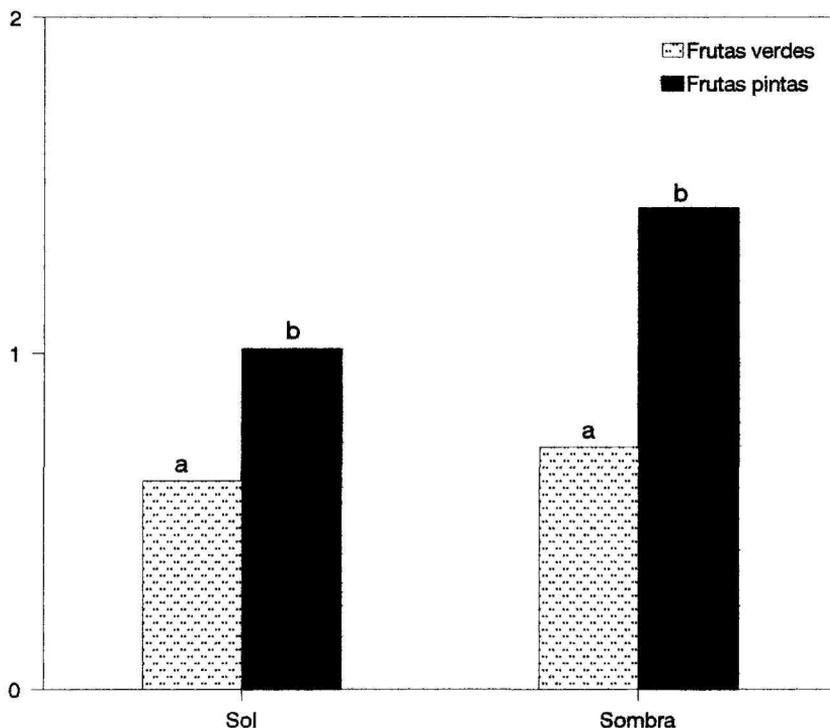


FIGURA 3. Influencia del estado de maduración de la fruta en el tamaño de la lesión. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes al nivel de probabilidad de 1% en el valor de F.

Pruebas de patogenicidad en el campo. El cubrir la rama con bolsas plásticas afectó adversamente el éxito de la inoculación debido a la dificultad de mantener el inóculo en el sitio destinado. La incidencia de frutas con lesiones varió de acuerdo al aislado inoculado. *Fusarium solani* y los dos aislados de *C. coffeicola* ocasionaron la mayor incidencia de frutas enfermas (Cuadro 3). *Colletotrichum dematium* indujo lesiones irregulares color marrón (Figura 4A). Las lesiones inducidas por *F. solani* fueron redondas, negras y húmedas muy similares a las inducidas en el laboratorio (Figura 4C). Las frutas inoculadas con *C. coffeicola* mostraron lesiones alargadas, negras y secas, y en ocasiones culminaron en frutos completamente negros (Figuras 4D, E). Los testigos no desarrollaron lesiones de significancia (Figura 4B). En todas las pruebas realizadas, de laboratorio y de campo, los aislados inoculados fueron recuperados exitosamente.

CUADRO 3.—Patogenicidad de aislados seleccionados en frutas de café inoculadas en el campo.¹

Aislados ²	Porcentaje de frutas con lesiones
<i>Fusarium solani</i>	16.50
<i>F. oxysporum</i>	3.00
<i>Cercospora coffeicola</i> (May)	13.50
<i>C. coffeicola</i> (SS)	37.50
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	4.50
<i>C. dematium</i>	6.50
Testigo	0.02

¹Promedio de dos pruebas de campo con un total de 40 frutas inoculadas.

²May = aislado de Mayagüez, SS = aislado de San Sebastián.

DISCUSIÓN

Los métodos utilizados fueron adecuados para aislar micoflora de lesiones de las frutas de café. Sin embargo, consideramos que seleccionar propágulos desarrollados en las lesiones de frutas en cámara húmeda es más eficiente para obtener cultivos puros de toda la micoflora asociada. Este hecho es particularmente importante para hongos como *C. coffeicola*, que tiene crecimiento lento y por tanto compite pobremente con otras especies en medio de cultivo. Las variaciones observadas en la frecuencia de los aislados de acuerdo a la localidad y variedad es indicativo de la influencia de las condiciones ambientales en el desarrollo de la micoflora (Bridge, 1979). Aunque la patogenicidad de los aislados fue evidente indistintamente del estado de maduración de las frutas, la infección fue mayor cuando las inoculaciones se llevaron a cabo en frutas pintas. Mulinge (1970) encontró que la susceptibilidad de las frutas de café varía con el grado de crecimiento del fruto y los frutos verdes son relativamente más resistentes que los maduros.

Las inoculaciones realizadas en el laboratorio fueron útiles para seleccionar las especies patogénicas, pero no para establecer la relación entre el tipo de lesión y el aislado. La mayoría de las lesiones obtenidas fueron de color negro y húmedas, y generalmente afectaban toda la fruta. En el laboratorio las condiciones óptimas de humedad favorecían al patógeno y no permitieron el desarrollo de una relación parásito-hospedero similar a la que ocurre bajo condiciones naturales.

En las pruebas realizadas en el campo fue posible discriminar entre el tipo de lesión y el aislado inoculado. Las lesiones alargadas oscuras con centro claro son causadas por *C. coffeicola*, lesiones irregulares color marrón se deben a la infección por *Colletotrichum* spp., y las lesiones negras y húmedas las causa *Fusarium* spp. Las variaciones encontradas en la patogénesis de aislados de una misma especie es in-

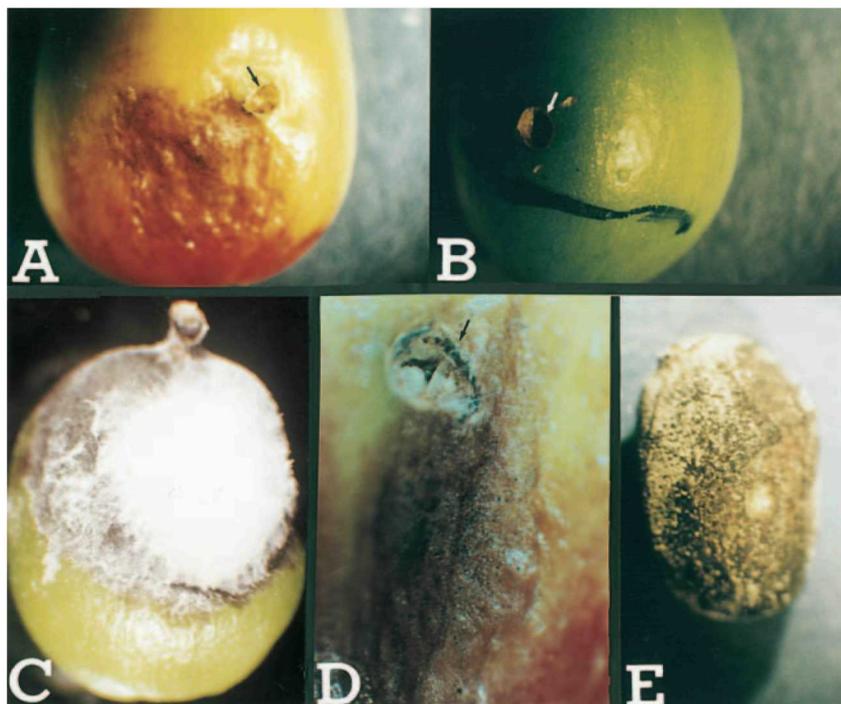


FIGURA 4. Lesiones inducidas en inoculaciones con varios aislados en frutas de café var. Caturra. Flechas señalan la herida provocada artificialmente. A. Mancha irregular color marrón causada por *Colletotrichum dematium* en inoculaciones en el campo (X125). B. Testigo (X125). C. Mancha redonda negra causada por *Fusarium solani* en inoculaciones en el laboratorio (X63). D. Mancha alargada oscura causada por *Cercospora coffeicola* en inoculaciones en el campo (X315). E. Fruto seco a consecuencia de la infección causada por *Cercospora coffeicola* en inoculaciones en el campo (X125).

dicativa de la diversidad en el ambiente natural donde hay formas patogénicas y saprofitas. Sin excluir la posible sucesión de especies, ya sea con formas saprófitas o patogénicas en estados avanzados del desarrollo de las lesiones, concluimos que *Cercospora coffeicola*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. dematium* son patógenos primarios de las frutas de café ocasionando lesiones típicas para cada género.

LITERATURA CITADA

- Alves, E. y H. A. de Castro, 1998. Fungos asociados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. *Summa Phytopathologica* 24(1):4-7.

- Arx, J. A., 1981. A revision of the fungi classified as *Gloesporium*. Second ed. Bibl. Micol. 203 pp.
- Barnett, H. L. y B. Hunter, 1987. An Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth ed. MacMillan Publishing Co., N.Y. 218 pp.
- Booth, C., 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 238 pp.
- Booth, C., 1977. *Fusarium*. Laboratory Guide to Identification of the Mayor Species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 58 pp.
- Bridge, C. W., 1979. The Ecology of Fungi, CRC Press, Inc., Boca Ratón, FL 33431, 274 pp.
- García, J. M. y C. Guzmán, 1993. Determinación de pérdidas ocasionadas por hongos que atacan el fruto del café en la zona central de El Salvador. Memorias Reunión Anual Sociedad Americana de Fitopatología, División del Caribe, San Salvador, El Salvador, C.A. No. 11.
- Joffe, A. Z., 1986. *Fusarium* Species: Their Biology and Toxicology. John Wiley & Sons, New York, 588 pp.
- Mignucci, J. S., P. R. Hepperly, I. Ballester y C. Rodríguez-Santiago, 1985. Anthracnose and berry disease of coffee in Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P.R.* 69:107-117.
- Mulinge, S. K., 1970. Development of coffee berry disease in relation to the stage of berry growth. *Ann. Appl. Biol.* 65:269-276.
- Phiri, N. A., R. J. Hillocks y P. Jeffries, 2001. Incidence and severity of coffee diseases in small holder plantation in northern Malawi. *Crop Protection* 20(4):325-332.
- Schieber, E., A. Zentmeyer, D. J. Mitchell y J. Roheim, 1970. Coffee berry necrosis in Guatemala and Costa Rica. *Phytopathology* 60:1545.
- Toussoun, T. A. y P. E. Nelson, 1976. A Pictorial Guide to the Identification of *Fusarium* Species 2nd Ed. The Pennsylvania State University Press. 51 pp.