

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA.
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL.**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE INOCULACIÓN DE
LASIODIPLODIA THEOBROMAE Y *FUSARIUM PROLIFERATUM*
EN PLANTAS JÓVENES DE *TECTONA GRANDIS* (L.F)**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
INGENIERA FORESTAL CON EL
GRADO ACADÉMICO DE LICENCIATURA**

JAIRAN ARANTXA RODRIGUEZ SOLIS

**CARTAGO, COSTA RICA
JUNIO, 2018**



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA.
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL.**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE INOCULACIÓN DE
LASIODIPLODIA THEOBROMAE Y *FUSARIUM PROLIFERATUM*
EN PLANTAS JÓVENES DE *TECTONA GRANDIS* (L.F)**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
INGENIERA FORESTAL CON EL
GRADO ACADÉMICO DE LICENCIATURA**

JAIRAN ARANTXA RODRIGUEZ SOLIS

CARTAGO, COSTA RICA

JUNIO, 2018



EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EFECTO DE INOCULACIÓN DE *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* Y *FUSARIUM PROLIFERATUM* EN PLANTAS JÓVENES DE *TECTONA GRANDIS* (L.F)

RESUMEN

La teca es una de las especies más cultivada en las regiones tropicales del mundo. En zonas húmedas del país se dio la alarma por la aparición de enfermedades en las plantaciones, que llegaron a provocar la muerte descendente de árboles. La etiología de la enfermedad se basa en el patógeno *Lasiodiplodia theobromae* reportado en el 2007 en la zona norte del país con el sinónimo de *Botryodiplodia* spp. Así como en el patógeno invasor *Fusarium* spp, que en este estudio se determinó por medio de marcadores moleculares como *Fusarium proliferatum*. Cuyo modo de infección se especula que ocurre a través del sistema radicular, donde lograr provocar daños en las raíces y continúa hasta provocar la obstrucción del sistema vascular. Para conocer la patogenicidad de ambos hongos se aislaron y purificaron en laboratorio y se evaluó varios métodos experimentales de inoculación en plantas jóvenes clonadas, en condiciones de ambiente controlado. Se utilizó varios genotipos identificados de teca como efecto de repetición, con el objetivo de desarrollar una metodología operativa de búsqueda de materiales tolerantes a estos patógenos, en poblaciones de mejoramiento genético de la cooperativa GENFORES. Se desarrolló un ensayo experimental con arreglo factorial, donde se evaluaron tres métodos de inoculación (medio líquido inyectado al tallo, medio semisólido infectado por herida en el tallo y medio líquido infectado en la herida, como Factor A), junto con tres combinaciones de patógenos (*L. theobromae*, *F.proliferatum* y ambos) como Factor B. Conforme al seguimiento de los postulados de Koch, los resultados mostraron que todos los métodos de inoculación lograron efectivamente infectar las plantas. Cuya sintomatología después de 90 días de inoculación se basó en las variables número de hojas funcionales y presencia de un brote apical sano y activo. Los resultados sugieren que el patógeno de mayor severidad de infección fue *L. theobromae* y, que el genotipo 22x registró la mayor tasa significativa de tolerancia. La aplicación con jeringa en el tallo de 1ml de inóculo ($2,5 \times 10^5$ esporas/ml) es el procedimiento más efectivo de inoculación de ambos patógenos, como parte de un programa de búsqueda de genotipos tolerantes de teca.

Palabras clave: patología, enfermedades, mejoramiento genético forestal, silvicultura clonal.

EVALUATION OF THE INOCULATION EFFECT OF *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* AND *FUSARIUM* *PROLIFERATUM* IN YOUNG PLANTS OF *TECTONA GRANDIS* (L.F)

ABSTRACT

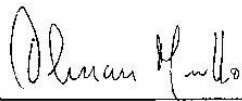
Teak is one of the tree species most cultivated in tropical regions of the world. In humid zones in the country it was given the alarm on the appearance of diseases in plantations, which may cause the terminal death in trees. The disease ethiology was based on the pathogen *Lasiodiplodia theobromae*, which was reported in 2007 in the north zone of the country, as a synonym of *Botryodiplodia* spp. As well as the invader pathogen *Fusarium* spp, which was determined by molecular markers as *Fusarium proliferatum* in this study. The mode of infection is speculated to occur through root wounds and continues up in the stem through its vascular system, until it causes its complete obstruction. In order to know about fungi pathogenicity, both of them were isolated and purified in laboratory conditions, and afterwards, inoculated through experimental trials in young cloned plants in greenhouse conditions. Genotyped clones were utilized as repetition effects in experiments, with the objective of developing a screening operational method, for searching tolerant genotypes in breeding populations in GENFORES forest breeding cooperative. A factorial experimental design was utilized, where three inoculation methods were tested (liquid medium injected, semi solid medium infected through a wound in stem, and liquid medium infected in a stem wound, all of them as Factor A), along with three pathogen combinations (*L. theobromae*, *F. proliferatum* and both together) as Factor B. According to Koch postulates, results showed that all inoculation methods are effective for infecting plants. Its symptoms after 90 days of inoculation were based on variables, number of functional leaves and presence of a healthy and active apical bud. Results suggest that pathogen *L. theobromae* is the more severe of the two and, genotype 22x recorded the higher and significant rate of tolerance. Syringe application in stem of 1ml inoculum (2.5×10^5 spores/ml) resulted in the most effective inoculation procedure for both pathogens, as part of a program for searching teak tolerant genotypes.

Key words: pathology, diseases, forest breeding, clonal forestry.

ACREDITACIÓN

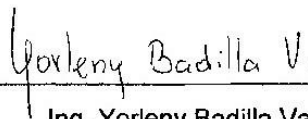
CONSTANCIA DE DEFENSA PÚBLICA DE PROYECTO DE GRADUACIÓN

Trabajo final de graduación defendida públicamente ante el Tribunal Evaluador, integrada por el Ing. Olman Murillo Gamboa, Ph.D., la Ing. Yorlery Badilla Valverde, M.Sc. y la Ing. Dawa Méndez Álvarez, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Forestal, del Instituto Tecnológico de Costa Rica.



Ing. Olman Murillo Gamboa Ph.D.

Director de tesis



Ing. Yorlery Badilla Valverde M.Sc.

Profesora lectora



Ing. Dawa Méndez Álvarez Lic.

Lectora



Ing. Dorian Carvajal Vanegas, M.Sc

Coordinador Trabajos Finales de Graduación



Arantxa Rodríguez Solís

Estudiante

AGRADECIMIENTOS

Un profundo agradecimiento a la profesora Yorlenny Badilla por la oportunidad de realizar mi trabajo de graduación en este proyecto.

Al equipo de trabajo (Olman Murillo, Yorlenny Badilla y Dawa Méndez) por el apoyo, la franqueza y paciencia para dirigirme en todo el proceso.

Juan Carlos Valverde y Dagoberto Arias por sus consejos para mejorar el proyecto.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ACREDITACIÓN	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
CAPITULO 1	9
Resumen	9
CHAPTER 1	10
Abstract	10
Introducción	11
Procedimiento de muestreo y diagnóstico	12
Referencias	14
CAPITULO 2	16
Resumen	16
CHAPTER 2	17
Abstract	17
Introducción	18
Materiales y Métodos	19
I. Aislamiento e identificación de los patógenos	20
II. Pruebas de patogenicidad	21
III. Trabajo experimental	21

Análisis de datos	26
Resultados.....	27
Discusión	28
I. Método de inoculación	28
II. Sintomatología.....	28
Conclusiones	30
Recomendaciones.....	31
Referencias	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diseño factorial para el ensayo de inoculación en invernadero de dos patógenos en clones de teca, San Carlos, zona norte de Costa Rica.	23
Cuadro 2. Formulario para la evaluación del ensayo experimental de métodos de inoculación de <i>L. theobromae</i> y <i>F. proliferatum</i> en <i>Tectona grandis</i> L.f.....	25
Cuadro 3. Resumen de los valores de probabilidad obtenidos del ANDEVA para las variables de evaluación en el ensayo experimental de métodos de inoculación de <i>L. theobromae</i> y <i>F. proliferatum</i> en <i>Tectona grandis</i> L.f.....	27

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lesión en el fuste caracterizada por corteza esponjosa (1). Pudrición en el tronco, estado avanzado de la enfermedad (2). Cultivo axénico de *L. theobromae* (3). Estructura de conidios maduros e inmaduros a 22 días de crecimiento (4)..... 13

CAPITULO 1

Reporte de *Lasiodiplodia theobromae* asociada a la muerte descendente en *Tectona grandis* (L.F) en Costa Rica

Resumen

En el 2006 se reportó un proceso de mortalidad en plantaciones de *Tectona grandis* L.f mayores a 7 años, con una tasa de incidencia de hasta un 13% en plantaciones de la zona norte, Pacífico sur y Caribe del país. Con el fin de identificar el agente causal, se colectaron muestras de *T. grandis* en la zona de San Carlos. Los tejidos con lesiones visibles fueron aislados en el laboratorio de patología de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica en Cartago en medios de cultivos agar papa dextrosa hasta obtener un cultivo axénico y trasladadas al Laboratorio de Técnicas Moleculares aplicadas a la Fitoprotección del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica. El hongo fue identificado como *Lasiodiplodia theobromae*. Se realizaron pruebas de patogenicidad, en plantas de 90 días de edad. Al final del experimento se re aisló el patógeno cumpliendo *Lasiodiplodia theobromae* los postulados de Koch. Este es el primer reporte de *L. theobromae* asociado a la muerte descendente en teca.

Palabras clave: teca, patología, plantaciones, enfermedad, sanidad.

CHAPTER 1

Report of *Lasiodiplodia theobromae* associated to dieback in *Tectona grandis* (L.F) in Costa Rica

Abstract

In 2006, a mortality process was reported in plantations of *Tectona grandis* L.f older than 7 years, with an incidence rate of up to 13% in plantations in the north zone, south Pacific and Caribbean regions of the country. In order to identify the causative agent, samples of *T. grandis* were collected in San Carlos. Tissues with visible lesions were isolated in the pathology laboratory of the Forest Engineering School of the Technological Institute of Costa Rica in Cartago on potato dextrose agar media until obtaining a pure culture and transferred to the Molecular Techniques Laboratory applied to the phytoprotection of the “Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC) of the University of Costa Rica. The fungus was identified as *Lasiodiplodia theobromae*. Pathogenicity tests were performed on 90-days-old plants. At the end of the process the pathogen *Lasiodiplodia theobromae* was re-isolated, fulfilling Koch's postulates. This is the first report of *L. theobromae* associated with dieback in teak.

Key words: teak, pathology, plantations, disease, sanitation.

Introducción

Tectona grandis L. F. es la especie más plantada en Costa Rica y probablemente también en los trópicos del continente americano, con aproximadamente 31500 hectáreas establecidas en el país en el 2010 (Murillo et al, 2013) (citado en Camino y Pierre, 2013). Su buen crecimiento en plantación, su alta demanda y precio en los mercados internacionales y su crecimiento y alto rendimiento, han promovido su rápida expansión en la región (Rivera, 2015).

Arguedas (2006) reporta en plantaciones de *T. grandis* mayores a 7 años en regiones húmedas, un proceso de mortalidad de árboles aislados y en grupos, al que se denominó como el “Síndrome de Decaimiento Lento de la Teca” (Arias et al, 2005). Quienes reportaron una tasa de incidencia de hasta un 13% en plantaciones de la zona norte, Pacífico sur y Caribe del país.

La enfermedad se manifiesta con lesiones, presencia de formación de cancro y exudación abundante de resina viscosa en el tronco del árbol. Inicialmente en el primer estadio, se observa un amarillamiento del follaje y pérdida paulatina del mismo, generalmente desde las partes altas hacia las más bajas (Arias et al, 2005). En los siguientes estadios se observan fisuras en la base del tronco, que se tornan de color negruzco. Se puede observar una corteza esponjosa en la parte baja del fuste debido a la acumulación de humedad (Arias et al, 2005) (Fig.1). En un estado más avanzado se presentan exudaciones y pudrición del tronco, que forma un anillo necrótico en la base con prolongaciones de hasta dos metros hacia la parte alta del fuste. Algunos de estos árboles son posteriormente invadidos por hongos descomponedores de la madera (Arias et al, 2005) (Fig. 2).

Procedimiento de muestreo y diagnóstico

Se colectaron muestras del tronco de 5 árboles (4 enfermos visiblemente en el primer estadio y un árbol sano vecino) en dos plantaciones comerciales con edades de 13 y 15 años ubicadas en los sitios El Amparo y Arco Iris, en el cantón de Los Chiles, zona norte de Costa Rica. Los árboles se cortaron y se obtuvieron discos de madera de 3cm de espesor en la base, a 2,5m, 5m y 7,5m de altura, que se llevaron al laboratorio de patología de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica en Cartago.

De cada disco de madera (muestra) se obtuvo en el laboratorio fragmentos de tejido visiblemente lesionado, que se procedió a cultivar en medio de agar papa dextrosa PDA (extracto de papa 4,0* (equivalente a 200 g de papa en la mezcla), dextrosa 20,0 y agar 15,0) g/l. Del primer cultivo obtenido se establecieron subcultivos hasta obtener un cultivo axénico. Todos los cultivos resultantes presentaron un mismo patrón, que inicia con un crecimiento micelial blanco, gradualmente gris en la parte superior de la placa y negro al reverso (Fig. 3).

Una vez obtenidos los cultivos axénicos se realizaron preparaciones fijas en portaobjetos estériles para ser observadas al microscopio, donde se identificó el hongo por medio de sus estructuras morfológicas: hifas, conidios, clamidosporas, conidióforos hialínicos (Fig. 4) (Picos-Muñoz et al, 2015). Una réplica de los cultivos axénicos se envió para su identificación taxonómica al Laboratorio de Técnicas Moleculares aplicadas a la Fitoprotección del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica. Donde se utilizaron cebadores universales de la región ribosomal del ITS y de la región de la B-tubulina según O' Donnell et al (2000). El hongo fue identificado como *Lasiodiplodia theobromae*.

Se realizaron pruebas de patogenicidad, en plantas de 3 meses de edad. El procedimiento de inoculación se basó en una adaptación de la metodología descrita por Machado da Fonseca, et al (2010). Al final del experimento se aisló el mismo patógeno *Lasiodiplodia theobromae*, cumpliendo así los postulados de Koch.

Borges (2014) reporta en los estados de Mato Grosso y Pará en Brasil, la incidencia del cancro en la teca causada por este mismo *Lasiodiplodia theobromae*, que ha provocado grandes pérdidas en las plantaciones comerciales en ese país. Doilom et al (2015) reportan al norte de Tailandia, la incidencia de éste patógeno asociado a muerte descendente en teca. También se ha reportado como uno de los patógenos asociados a la mancha azul en *Ficus insipida* en Venezuela (Mohali et al, 2017). Velasteguí et al (2010), lo reportan en El Balzar, provincia de Guayas (Ecuador) con el sinónimo de *Botryodiplodia theobromae* (Huamán, 2015), que provoca la muerte en el ápice y ramas.

En Costa Rica, Arguedas (2007) reporta la presencia del género *Botryodiplodia spp* en lesiones del fuste en teca, en la región de San Carlos. Sin embargo, este el primer reporte de *L. theobromae* asociado a la muerte descendente en teca que causa el cancro en el fuste del árbol. Este patógeno llega a producir daños de mancha en la madera y hasta pudrición completa de los árboles afectados, lo que la convierte en una amenaza de alto impacto comercial para los inversionistas de teca en el país.

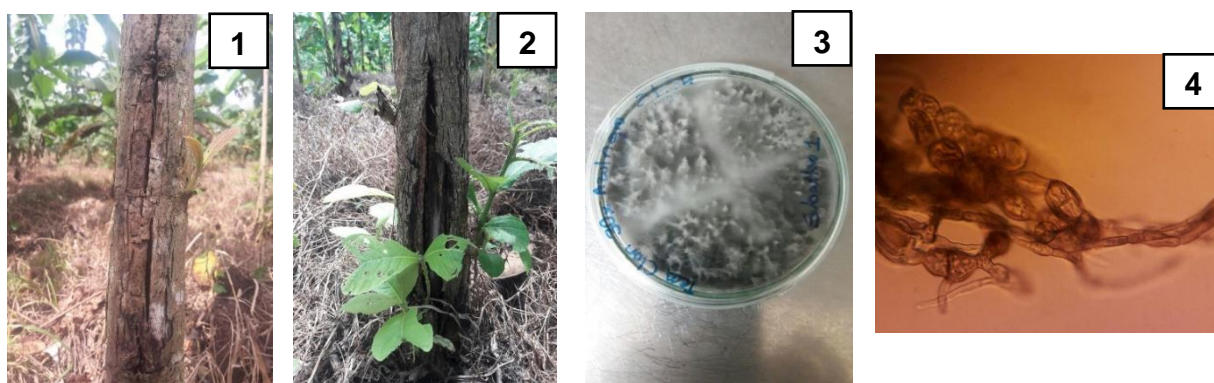


Figura 1. Lesión en el fuste caracterizada por corteza esponjosa (1). Pudrición en el tronco, estado avanzado de la enfermedad (2). Cultivo axénico de *L. theobromae* (3). Estructura de conidios maduros e inmaduros a 22 días de crecimiento (4).

Referencias

- Arguedas, M. (2006). Diagnóstico de plagas y enfermedades forestales en Costa Rica. *Raíces*, 2(8): 0-4.
- Arguedas, M. A. (2007). Plagas y enfermedades forestales en Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 4(11): 1-69.
- Arias, D., Calvo, J., Arguedas, M., & Salas, B. (2005). SÍNDROME DE LA MORTALIDAD DE LA TECA EN COSTA RICA.
- Borges, R. (2014) Etiologia do cancro da teca e caracterização patogênica e molecular de *Lasiodiplodia theobromae*. xii, 98 f., il. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) — Universidade de Brasília, Brasília.
- Doilom, M., Shuttleworth, L. A., Roux, J., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2015). Botryosphaeriaceae associated with *Tectona grandis* (teak) in Northern Thailand. *Phytotaxa*, 233(1): 1-26.
- Huamán, R. (2015). *ETIOLOGÍA Y CONTROL DE LA PUDRICIÓN DEL TALLO DE LA VID, EN LA LOCALIDAD DE CHINCHA - ICA*. Lima.
- Machado da Fonseca, S., Vilela de Resende, M., Couto Alfenas, A., Da Silva Guimarães, L., de Assis, T., & Grattapaglia, D. (2010). Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto. Viçosa: UFV.
- Mohali, S., Castro-Medina, F., Úrbez-Torres, J., & Gubler, W. (2017). First report of *Lasiodiplodia theobromae* and *L. venezuelensis* associated with blue stain on *Ficus insipida* wood from the natural forest of Venezuela. *Forest Pathology*. doi: 10.1111/efp.12355.
- Murillo, O., Wright, J., Monteuis, O., & Montenegro, F. (2013). Mejoramiento genético de la Teca en América Latina. En R. de Camino, & J. Pierre, *Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades* (pág. 392). Turrialba, C. R: CATIE. 392 p.- (Serie técnica. Informe técnico/ CATIE; no. 397.

- O'Donnell, K., Kistler, H., Tacke, B., & Casper, H. (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14): 7905-7910. doi: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.130193297.
- Picos-Muñoz, P., García-Estrada, R., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* in Agricultural Crops in Mexico: Taxonomy, Host, Diversity and Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(1): 54-74.
- Rivera, M. (2015). Análisis de la producción maderable de teca (*Tectona grandis* Linn. F.) en plantaciones y sistemas agroforestales en Hojancha, Costa Rica, y bases para el desarrollo de un plan de incidencia política para promover su cultivo. Turrialba: CATIE.
- Velastegui, T. F., Guerrero, F. C., & Gutiérrez, R. C. (2010). Plagas y enfermedades en plantaciones de teca (*Tectona grandis* LF) en la zona de Balzar, Provincia del Guayas. *Ciencia y Tecnología*, 3(1): 15-22

CAPITULO 2

Inoculación de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium proliferatum* en *Tectona grandis* (L.F)

Resumen

En las regiones húmedas del país se alarma a inicios de los años 2000, por la aparición de enfermedades en las plantaciones de teca. El proceso de infección llega a provocar la muerte. Para conocer los patógenos involucrados, se colectaron muestras en campo de árboles enfermos. Se realizaron aislados para determinar los agentes causales. Hubo una asociación invariable de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium proliferatum*. Para demostrar la patogenicidad se realizaron algunas técnicas de inoculación. Por esto, se evaluó diferentes métodos para inocular como parte de la búsqueda de genotipos tolerantes a *L. theobromae* y *F. proliferatum*. El estudio se realizó en las instalaciones de la Cooperativa Internacional de Mejoramiento Genético Forestal (GENFORES), en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede regional en San Carlos, zona norte del país. El ensayo constó de un arreglo factorial con 6 genotipos de la colección de GENFORES. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple Tukey. Los análisis se basaron con un valor de $p=0,95$. Se identificó el clon 22x, con la media más alta evidenciando un comportamiento superior en las variables sintomatológicas contempladas. La aplicación de 1ml de inóculo ($2,5 \times 10^5$ esporas/ml) aplicado con jeringa en el tallo, es efectivo para inocular plantas de teca. No se evidenció sintomatología en las plantas. *L. theobromae*, resultó ser el agente inoculante más severo en las plantas.

Palabras clave: mejoramiento genético, patología, teca, enfermedades, resistencia genética, silvicultura clonal.

CHAPTER 2

Inoculation of *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium proliferatum* in *Tectona grandis* (L.F)

Abstract

In the humid regions of the country, it was given the alarm at the beginning of the 2000s, by the appearance of diseases in teak plantations. The process of infection ends in death. To know the pathogens involved, samples were collected from diseased trees. Isolates were made to determine the causative agents. There was an invariable association of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium proliferatum*. To prove pathogenicity, some inoculation techniques were performed. Therefore, different methods were evaluated to inoculate as part of the search for tolerant genotypes to *L. theobromae* and *F. proliferatum*. The study was carried out at the facilities of (GENFORES), at the Technological Institute of Costa Rica, in San Carlos. The trial consisted of a factorial arrangement with 6 genotypes from the GENFORES collection. An analysis of variance and a Tukey multiple comparison test were performed. The analyzes were based on a value of $p = 0.95$. The clone 22x was identified, with the highest mean showing a superior behavior in the symptomatic variables contemplated. The application of 1ml of inoculum (2.5×10^5 spores / ml) applied with a syringe on the stem, is effective to inoculate teak plants. No symptomatology was observed in the plants. *L. theobromae*, turned out to be the most severe inoculating agent in plants.

Key words: forest breeding, pathology, teak, diseases, genetic resistance, clonal forestry.

Introducción

La teca es la especie de madera tropical más cultivada en el mundo debido a sus propiedades: liviana, durable y con estabilidad dimensional (De Camino y Pierre, 2013). En Costa Rica, se planta en regiones con climas diversos, con temperaturas entre 21 a 28 °C, precipitaciones que van desde los 1400 a 2500 milímetros anuales y una época seca de 0 a 6 meses (De Camino y Pierre, 2013; Badilla y Murillo, 2016).

En las regiones húmedas del país se dio la voz de alarma a inicios de los años 2000, por la aparición de enfermedades en las plantaciones de teca, que llegan a provocar la muerte de árboles robustos y con más de 7 años (Arias et al, 2005). Quienes reportaron una tasa de incidencia de hasta un 13% en plantaciones de la zona norte, Pacífico sur y Caribe del país.

El proceso de infección llega a provocar mortalidad en árboles aislados, de donde irradia hacia los árboles vecinos en un patrón espacial grupal. Dado el complejo de síntomas se le denominó como “síndrome del decaimiento lento de la teca”, que tiene aparentemente su inicio en heridas en las raíces adventicias (Arguedas, 2006).

Lasiodiplodia theobromae ataca a través de heridas producidas por herramientas de trabajo, insectos o causas naturales (Picos-Muñoz et al, 2015). (Borges, 2014), gomosis, tizón de la hoja, pudrición de raíz en plantas frutales y maderables, donde inician su ataque principalmente en el sistema radical de los cultivos (Picos-Muñoz et al, 2015).

F. proliferatum, hongo cosmopolita (Figuroa-Rivera, et al, 2010), ataca principalmente el sistema radicular, provocando podredumbre (Tremacoldi et al, 2013) reportado en *Gmelina arborea* causando cancro, podredumbre y muerte (Murillo et al, 2014) y deterioro en las plantas hospederas (Souza et al, 2007).

Arguedas et al (2004) lo reportan en muerte de árboles adultos de teca, situados en lugares con altos niveles de precipitación y ausencia de drenaje, protagónico en infecciones y pudriciones en semillas de ajo (Galvéz-Patón et al, 2011), en tomate

(Veloza, 2015) y como causante de la pudrición de la corona del banano (Umaña-Rojas y García, 2009).

Para conocer la etiología de la enfermedad se deben realizar pruebas de patogenicidad bajo ciertas técnicas de inoculación. La metodología más empleada para realizar la inoculación de plantas es por medio de heridas (Castellano y Guanipa, 2004). Se provoca heridas en el tallo de la planta, para exponer el tejido xilemático e inocular el patógeno, en medio líquido o micelio cultivado en algún medio de cultivo (Huamán, 2015) (Alama et al, 2006). En cultivo de *Pouteria sapota* (Jacq) se realiza una herida en las ramitas y tallo y se coloca un disco micelial (Vásquez-López et al, 2009).

En el campo forestal la inoculación de *Fusarium circinatum* en semillas de *Pinus sylvestris* se utiliza para evaluar el efecto del patógeno y la supervivencia de las semillas (Flores, 2015). En árboles con 3 años de *Pseudotsuga menziesii var glauca* se realizaron de 40 a 50 incisiones en la base del árbol para inocular discos de colonias puras con *Phytophthora cinnamomi* Rands y *Fusarium oxysporum* Schltdl (Mendoza et al, 2011).

Por tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar un método efectivo de inoculación de *L. theobromae* y *F. proliferatum* en plántulas de teca, como parte de una metodología de determinación de genotipos tolerantes o resistentes a estos patógenos.

Materiales y Métodos

El estudio se realizó en las instalaciones de la Cooperativa Internacional de Mejoramiento Genético Forestal (GENFORES), en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede regional en San Carlos, zona norte del país. El sitio se localiza en las coordenadas 10° 21 '39,28" N y 84° 30' 28,72" Oeste.

El comportamiento climatológico del sitio señala un régimen lluvioso durante todo el año, con un promedio de hasta 3200 mm anuales, distribuido, principalmente entre los

meses de mayo a enero, con disminución no menor a los 50 mm durante los meses de febrero a abril (IMN, 2017). Mientras que la temperatura promedio anual se reportan en 25°C; los valores más altos ocurren durante los meses de marzo a junio, los más bajos de diciembre a febrero (IMN, 2017).

Se colectaron muestras del tronco de 5 árboles (4 enfermos visiblemente en el primer estadio y un árbol sano vecino) en dos plantaciones comerciales con edades de 13 y 15 años ubicadas en los sitios El Amparo y Arco Iris, en el cantón de Los Chiles, zona norte de Costa Rica. Los árboles se cortaron y se obtuvieron discos de madera de 3cm de espesor en la base, a 2,5m, 5m y 7,5m de altura. Cada disco se envolvió en papel aluminio con su respectiva identificación y se guardó a 4°C, hasta su procesamiento en el laboratorio de patología de la Escuela de Ingeniería Forestal, del Instituto Tecnológico de Costa Rica en Cartago.

I. Aislamiento e identificación de los patógenos

Los discos de madera se lavaron con agua destilada y se colocaron dentro de una cámara de transferencia. Se seleccionaron 16 muestras por disco de 1,5 cm de largo x 3m de grosor y 1 cm de ancho cada una, que contenían tejido sano e infectado. Cada muestra se sumergió en hipoclorito de sodio al 1% (NaOCl) durante 1 minuto, posteriormente; se colocaron en alcohol al 95% durante 15 segundos y finalmente en agua destilada durante 2 minutos. El exceso de humedad se eliminó por capilaridad al colocarlos sobre servilletas de papel previamente estériles.

Una vez desinfectadas las muestras se colocaron sobre el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) en forma equidistante se dispusieron 4 trozos por placa con 4 repeticiones, sellando cada placa con plástico parafilm para incubarlas a 26°C durante 8 días y 80% de humedad relativa. Transcurrido ese periodo, se seleccionaron punta de hifas del hongo, y se inocularon en placas de Petri con PDA nuevamente por 8 días a 26°C y 80% de humedad relativa. De cada colonia se establecieron 2 subcultivos axénicos (Alama et al, 2006).

Una vez obtenidos los cultivos axénicos, se observó al microscopio preparaciones fijas en portaobjetos estériles para identificar el hongo por medio de sus estructuras morfológicas: hifas, conidios, clamidosporas, conidióforos hialínicos, entre otros (Picos-Muñoz et al, 2015). Una réplica de los cultivos axénicos se envió para su identificación taxonómica al Laboratorio de Técnicas Moleculares aplicadas a la Fitoprotección del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica.

II. Pruebas de patogenicidad

Una vez identificados los patógenos: *Fusarium proliferatum* (CIPROC, 2016) y *L. theobromae* (CIPROC, 2016), tanto morfológicamente como molecularmente, ambos se pusieron a crecer en medio líquido de extracto de malta durante 8 días a 26 °C, 80% de humedad relativa y agitación constante. La concentración de conidios en la suspensión se determinó mediante conteo en una cámara *neubauer*. Se determinó que la concentración de esporas alcanzó un valor aproximado de $2,5 \times 10^5$ en la suspensión que se utilizó para la inoculación de las plantas en los experimentos. El cultivo de ambos hongos se mantuvo en un medio semisólido de PDA, bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

III. Trabajo experimental

Se estableció un diseño experimental con arreglo factorial para evaluar tres métodos de inoculación (factor A) con dos patógenos (Factor B) en una colección de clones de teca. Los métodos de inoculación consistieron en la aplicación de una solución con cada uno de los patógenos de la siguiente manera:

a1) por medio de una inyección en la base superior del tallo con la solución en medio líquido;

a2) una herida longitudinal en la base superior del tallo donde se inoculó por inyección los patógenos;

a3) se colocó solución en medio semisólido sobre la herida realizada en la base superior del tallo.

En el método de inyección se utilizó una pistola de aire comprimido con un tanque con capacidad de 6000 psi. Para cada planta se calibró una presión por disparo de 50 kPa. Se aplicaron dos disparos de 0,5 ml cada uno, en el mismo orificio del tallo. Para el tratamiento con los dos patógenos, se realizaron en dos orificios separados del tallo. Dado que el orificio era sumamente pequeño, no se procedió a tapar la herida causada. La pistola se desinfectó cada vez que se inoculaba un patógeno diferente.

Los tratamientos con la herida consistieron en abrir una ventana longitudinal en el tallo de aproximadamente 5 centímetros de largo por 1 cm de ancho, cerca de la base de las plantas. La herida se realizó por medio de un bisturí desinfectado. Se utilizó una misma jeringa específica para cada patógeno.

En el tratamiento semisólido se utilizó el área de corte de un disco de 0,7 mm de diámetro de agar con micelio para cada patógeno en todas las plantas a inocular. En los tratamientos con herida en el tallo una vez aplicado los patógenos se envolvió la zona del tallo con algodón impregnado del mismo medio líquido de cada patógeno. Posteriormente se colocó seguido una cubierta de plástico para proteger el algodón y por ende el punto de inoculación (Machado da Fonseca et al, 2010).

Cuadro 1. Diseño factorial para el ensayo de inoculación en invernadero de dos patógenos en clones de teca, San Carlos, zona norte de Costa Rica.

		Factor B	b1	b2	b3	b4
Factor						Testigo
A	Tratamiento	<i>L. theobromae</i>	<i>F. proliferatum</i>	Ambos		(solución acuosa)
a1	Inyección	a1b1	a1b2	a1b3	a1b4	
a2	Herida + medio líquido	a2b1	a2b2	a2b3	a2b4	
a3	Herida + medio semi- sólido	a3b1	a3b2	a3b3	a3b4	

El trabajo experimental se desarrolló dentro de un invernadero, donde se dispuso de un sistema de riego por goteo para cada planta, con una frecuencia de dos veces por día. Las plantas se propagaron vegetativamente en los mini jardines clonales de la cooperativa de mejoramiento genético GENFORES, localizado en el campus del Instituto Tecnológico de Costa Rica en su sede regional en Santa Clara de San Carlos, zona norte del país. Las plantas (rametos) de 6 semanas de edad, se trasplantaron en potes plásticos de 1357.73 cm³ con un sustrato de tierra (75%) + abono orgánico (25%). Las plantas tenían al inicio del experimento, un promedio en altura total de 26,09 cm, diámetro al cuello de 0,56 cm y 4 pares de hojas completas.

Se realizó 1 re-inoculación a 1,5 meses de establecido el ensayo. Estas re-inoculaciones fueron aplicadas de la misma manera como se estableció el ensayo. Con el tratamiento con pistola de aire comprimido, se tuvo que cambiar el punto de inoculación a la parte más tierna del tallo del clon, ya que la aguja no penetraba la base del tallo por su mayor grado de lignificación.

Todas las plantas fueron medidas, evaluadas e inoculadas en un mismo día. Para observar el comportamiento de la infección se realizó una evaluación cada mes, durante 3 meses (Machado da Fonseca et al, 2010), como se muestra en el cuadro 2.

Como parte del trabajo experimental se siguieron los postulados de Koch. De una muestra de cada tratamiento aplicado, se tomó tejido inoculado para aislar los patógenos del hospedero enfermo. Con estas muestras se obtuvo un cultivo axénico, para confirmar la presencia del patógeno deseado (Fuentes, 2007).

En cada una de las plantas se midió el diámetro en la base o cuello, altura total como variables de crecimiento. Número de hojas totales y funcionales (presentan actividad fotosintética, sin marchitez visual evidente y mantienen más del 50% de área verde (Carlier et al, 2002)); presencia o ausencia de brote apical; cantidad y tipo de brote (basal, tallo, basal/tallo y sin brote), como variables sintomatológicas; para un total de 7 variables (Cuadro 2)

Cuadro 2. Formulario para la evaluación del ensayo experimental de métodos de inoculación de *L. theobromae* y *F. proliferatum* en *Tectona grandis* L.f.

Bloque	Tratamiento	Planta	Diámetro al cuello (cm)	Altura Total	Número de hojas totales	Número de hojas funcionales ¹	Tipo de Rebrote ²	Cantidad de Rebrote	Brote Apical
1	1	1							
1	1	2							
1	1	3							
1	1	4							
1	1	5							
1	1	6							
1	2	1							
1	2	2							
1	2	3							
1	2	4							
1	2	5							
1	2	6							

1. Se consideró como hojas funcionales, aquellas que presentan actividad fotosintética, sin marchitez visual evidente y mantienen más del 50% de área verde. 2. Rebrote basal o lateral en la planta inoculada.

Análisis de datos

En una hoja de Excel (versión 2016) se organizó la base de datos para su revisión y facilidad de análisis posterior. En la base de datos se realizó una depuración donde se eliminaron las plantas muertas. Con ayuda del software InfoStat (versión actualizada de noviembre 2016), se probaron los supuestos básicos de normalidad, independencia y homocedasticidad. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar diferencias entre los tratamientos de inoculación, evaluados a partir de las variables medidas en cada planta, y una prueba de Tukey para la comparación múltiple de los tratamientos. Todos los análisis se basaron en un valor de p de 0,95.

Resultados

Cuadro 3. Resumen de los valores de probabilidad obtenidos del ANDEVA para las variables de evaluación en el ensayo experimental de métodos de inoculación de *L. theobromae* y *F. proliferatum* en *Tectona grandis* L.f

Fuente de Variación	Valor de p						Presencia Brote Apical
	Diámetro al cuello	Altura Total	No Hojas Totales	No Hojas Funcionales	Tipo de Rebrote	No de Rebrotos	
Bloque	0,004	0,009	0,0001	0,004	0,046	0,001	0,081
Inoculación	0,439	0,016	0,435	0,859	0,271	0,088	0,501
Patógeno	0,727	0,529	0,154	0,0001	0,934	0,144	0,070
Inoculación* Patógeno	0,223	0,798	0,780	0,717	0,853	0,427	0,675

Modelo: $Y_{ijk} = \text{Bloque} + \text{Inoculación} + \text{Patógeno} + \text{Inoculación} * \text{Patógeno} + \text{Error}$

Discusión

I. Método de inoculación

Se obtuvo diferencias significativas entre bloques (clones) para todas las variables analizadas, excepto para presencia de brote apical. De los 6 clones evaluados, el clon 2 presentó la media más baja en la variable hojas funcionales. El clon 22x demostró un desempeño superior con las medias más altas en las variables hojas totales y funcionales, tipo y número de rebrotes; sin embargo, es superado por el clon 4 identificado con el mejor crecimiento en diámetro al cuello y altura.

La diferencia entre el efecto del clon con el método de inoculación se puede explicar por un principio de diferencias fisiológicas asociadas al genotipo. Donde algunos individuos, genéticamente podrían poseer diferencias o estrategias en sus mecanismos de reacción ante un patógeno determinado (Pérez et al, 2003).

Estos mecanismos están involucrados en la expresión génica a los diferentes tipos de respuesta durante el proceso de infección (Martínez-Botello, 2015). Que precisamente son los que explican el modo de acción y la existencia de genotipos tolerantes o resistentes a patógenos determinados.

La variable altura total logró mostrar diferencias significativas entre los métodos de inoculación. La prueba de comparación de Tukey muestra que la técnica de realizar una herida e inyectar el inoculo con jeringa es el mejor, entre los métodos probados. Gonçalves et al (2011) y Alama et al (2006) reportan que el uso de la jeringa es el método de inoculación de mayor uso, por su funcionalidad, eficiencia y facilidad de aplicación.

II. Sintomatología

Las pruebas realizadas en el laboratorio confirman los postulados de Koch para *L. theobromae* y *F. proliferatum*. Sin embargo, los clones inoculados no mostraron

sintomatología visible; la necrosis y caída de hojas no fueron significativas para el análisis ya que el efecto ambiental y los intervalos tan extensos de visitas al ensayo no fueron favorables para descartar la posibilidad de una afectación externa y que los síntomas si fueran provocados por los patógenos inoculados.

La variable número de hojas funcionales presenta diferencias significativas entre los agentes inoculantes, presencia de brote apical es una posible variable para evaluar sintomatología en las plantas inoculadas. Tukey muestra al testigo con la media más alta con respecto a los otros patógenos. Entre éstos las diferencias no son evidentes, conviene trabajar con plantas más pequeñas.

Sin embargo, la combinación de ambos patógenos fue la que mostró la media más baja. Debido a que las sucesiones de eventos implican probablemente más de un agente causal ya que la enfermedad no tiene su etiología solamente en *Lasiodiplodia theobromae*, sino también en varios agentes causales, entre ellos, como patógeno invasor *Fusarium* spp (Lopes, 2018).

No hubo diferencias significativas entre las interacciones inoculación*patógeno, sin embargo, en la mayoría de las variables la media más alta fue para el patógeno testigo en las diferentes maneras de inoculación, ambos casos evidencian el efecto del inóculo en las plantas.

En la última evaluación, la zona del corte en el tallo de las plantas inoculadas con *L. theobromae*, se observó una necrosis en el tejido xilemático. Similar al reportado por Alama et al (2006), quienes muestran tejido necrosado de color marrón oscuro, cuya intensidad aumenta a medida que se profundizan los cortes longitudinales en la muestra. El daño se extiende desde el punto de inoculación hacia el ápice, evidenciado por los cortes realizados a diferentes alturas de la muestra.

Éste patógeno tiende a colonizar el tejido cortical, lo que podría explicar su modo de acción como un patógeno primario, que expresa su potencial de causar enfermedad y, por tanto, ser más agresivo que *Fusarium proliferatum* (Vásquez-López et al, 2009).

Conclusiones

Aislados de *Lasiodiplodia theobromae* encontrados en los tejidos enfermos de árboles en campo, comprueban que es patogénico en clones de *Tectona grandis*.

Los aislados demuestran que *Fusarium proliferatum* es un patógeno invasor que está asociado al síndrome del decaimiento lento de la teca.

Hubo diferencias significativas entre los clones evaluados. El clon 22x demostró un desempeño superior con las medias más altas en las variables hojas totales y funcionales, tipo y número de rebrotes.

Los resultados permiten concluir que 1ml de inóculo ($2,5 \times 10^5$ esporas/ml) aplicado con jeringa en el tallo, es efectivo para inocular plantas de teca y determinar su tolerancia o resistencia a enfermedades.

Presencia de hojas funcionales y brote apical son un buen indicio de variables para diferenciar el efecto de los patógenos en las plantas.

Entre los patógenos inoculados no hubo diferencias significativas. La expresión de la sintomatología en las plantas no fue evidente.

Lasiodiplodia theobromae resultó ser más agresivo que *Fusarium proliferatum* por su naturaleza de colonizar tejido cortical.

Recomendaciones

Se recomienda aumentar la dosis de esporas de los inóculos para investigar el posible efecto e intentar visibilizar los síntomas del ataque en plantas susceptibles a esta enfermedad.

Trabajar con plantas más pequeñas para aumentar la probabilidad de observar síntomas a corto plazo y evaluar más seguido el ensayo para notar pequeños cambios que se puedan estar generando en el proceso de evaluación.

Referencias

- Alama, I., Maldonado, E., & Gálvez, E. R. (2006). *Lasiodiplodia theobromae* afectando el Cultivo de Palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. *Universalia*, 11(2), 4-13.
- Arguedas, M., Chaverri, P., & Verjans, J. (2004). Problemas fitosanitarios de la teca en Costa Rica. *Recursos Naturales y Ambiente*(41).
- Arguedas, M. (2006). Diagnóstico de plagas y enfermedades forestales en Costa Rica. *Raíces*, 2(8): 0-4.
- Arias, D., Calvo, J., Arguedas, M. & Salas, B. (2005). *Síndrome de la mortalidad de la Teca en Costa Rica* Cartago: Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Badilla, Y. y Murillo, O. 2016. Impacto de los programas de mejoramiento genético de teca (*Tectona grandis* Roxb.) en Costa Rica y América Latina En: XIV CONAFA, 25-27 de octubre, Belén, Costa Rica.
- Borges, R. C. F. (2014). Etiologia do cancro da teca e caracterização patogênica e molecular de *Lasiodiplodia theobromae*.
- Carlier, J., De Waele, D., & Escalant, J. V. (2002). Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nematodos (Vol. 6). Bioversity International.
- Castellano, G., & Guanipa, N. (2004). Comportamiento de diez cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) a la inoculación con *Fusarium decemcellulare* Brix. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 200-206.
- CIPROC. (2016). *Reporte del patógeno Fusarium proliferatum TM-390b*. San José: Universidad de Costa Rica.
- CIPROC. (2016). *Reporte del patógeno Lasiodiplodia theobromae TM-0381*. San José: Universidad de Costa Rica.

- De Camino, R., y Pierre, J. (2013). Las plantaciones de teca en América Latina: mitos y realidades. Turrialba. C.R: CATIE. 392 p.- (Serie técnica. Informe técnico/ CATIE; no. 397.
- Figueroa-Rivera, M., Rodríguez-Guerra, R., Guerrero-Aguilar, B., González-Chavira, M., Pons-Hernández, J., Jiménez-Bremont, J., . . . Mendoza-Elos, M. (2010). Caracterización de Especies de *Fusarium* Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2): 124-134.
- Flores Pacheco, J. A. (2015). Evaluación de la susceptibilidad de procedencias europeas de *Pinus sylvestris* frente al chancro resinoso del pino (*Fusarium circinatum*).
- Fuentes, C. (2007). Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2): 262-267.
- Galvéz-Patón, L., Gil-Serna, J., Bango, D., & Palmero, D. (2011). La podredumbre del ajo causada por *Fusarium proliferatum*. *Horticultura revista de frutas hortalizas flores y plantas ornamentales*, 297: 48-51.
- Gonçalves Mafía, R., Couto Alfenas, A., Ferreira, E. M., & Breda Binoti, D. H. (2011). Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Revista Árvore*, 35(4).
- Huamán, R. (2015). *ETIOLOGÍA Y CONTROL DE LA PUDRICIÓN DEL TALLO DE LA VID, EN LA LOCALIDAD DE CHINCHA - ICA*. Lima.
- Instituto Meteorológico Nacional. (2010). <https://www.imn.ac.cr>. Obtenido de Instituto Meteorológico Nacional: <https://www.imn.ac.cr/clima-en-costa-rica>.
- Instituto Meteorológico Nacional. (2017). <https://www.imn.ac.cr>. Obtenido de Instituto Meteorológico Nacional: <https://www.imn.ac.cr/web/imn/inicio>.

- Lopes, E. D. S. (2018). Levantamento de doenças foliares de natureza fúngica em áreas de plantio de *Acacia mangium* e *Eucalyptus urograndis* no município de Itacoatiara-AM.
- Machado da Fonseca, S., Vilela de Resende, M., Couto Alfenas, A., Da Silva Guimarães, L., de Assis, T., & Grattapaglia, D. (2010). Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto. Viçosa: UFV.
- Martínez Botello, D. H. (2015). Bases conceptuales del mecanismo de interacción planta-patógeno (patosistema cacao-monilia).
- Mendoza Campos, A., Cibrián-Tovar, D., & García-Díaz, S. E. (2011). *Phytophthora cinnamomi* Rands. y *Fusarium oxysporum* Schltdl. como agentes causales de pudrición de raíz en *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Mayr) Franco. In Memorias del XV Simposio Nacional de Parasitología Forestal (pp. 191-195).
- Murillo, O., Badilla, Y., Rojas, F., & Mata, X. (2014). Uso de biocontroladores y materiales tolerantes a los patógenos asociados al síndrome de la muerte descendente de la teca (*Tectona grandis*) y cancro nectria de la melina (*Gmelina*. Cartago.
- Pérez, L., Batlle, A., & Fonseca, J. (2003). *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense en Cuba: biología de las poblaciones, reacciones de los clones híbridos de la FHIA y biocontrol. *Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Taller Guayaquil, EC*: 141-155.
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* in Agricultural Crops in México: Taxonomy, Host, Diversity and Control. *Revista Mexicana De Fitopatología*, 33(1): 54-74.

- Souza, A.E.F., Araújo, E. & Nascimento, L.C. (2007). Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. *Fitopatologia Brasileira* 32:465-471.
- Tremacoldi, C. R., Lunz, A. M., Coelho, I. L., & Boari, A. J. (2013). Cancro em mogno africano no estado do Pará. *Brazilian Journal Of Forest Research / Pesquisa Florestal Brasileira*, 33(74): 221-225. doi: 10.4336/2013.pfb.33.74.415.
- Umaña-Rojas, G., & García, J. (Julio de 2009). Efficacy of plant extracts on growth reduction of *Colletotrichum musae* and *Fusarium proliferatum*, causal agents of crown rot of bananas. *International Conference on Postharvest and Quality*.
- Vásquez-López, A., Mora-Aguilera, J. A., Cárdenas-Soriano, E., & Téliz-Ortiz, D. (2009). Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore y Stearn) en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia*, 43(7): 717-728.
- Veloza, S. (Febrero de 2015). Velozo, S. G. M. (2015). *Identificação, caracterização e avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de fusarium spp. para o controle de thaumastocoris peregrinus (hemiptera: thaumastocoridae)*. Campus de Botucatu: Universidad Estatal Paulista.