

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

ANÁLISIS DE TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL AGENTE
CAUSAL DE LA MARCHITEZ Y MUERTE DESCENDENTE DE LA
TECA (*Tectona grandis* L. f.) EN COSTA RICA

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

RAQUEL CHACÓN SOLÍS

CARTAGO, COSTA RICA

2021

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

ANÁLISIS DE TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL AGENTE
CAUSAL DE LA MARCHITEZ Y MUERTE DESCENDENTE DE LA
TECA (*Tectona grandis* L. f.) EN COSTA RICA

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

RAQUEL CHACÓN SOLÍS

CARTAGO, COSTA RICA

2021

RESUMEN

Raquel Chacón Solís*

Tectona grandis es una de las especies forestales de mayor importancia y de las maderas más valiosas a nivel mundial. Sin embargo, enfermedades como la marchitez y muerte descendente pueden afectar significativamente la productividad de las plantaciones de la especie. Existen diversas hipótesis sobre la causa de la enfermedad, algunos científicos argumentan que se debe a malas condiciones de sitio y otros autores atribuyen el desarrollo de esta enfermedad a organismos fúngicos como el *Ceratocystis fimbriata*.

Para diagnosticar la enfermedad, se realizó la corta de árboles en las zonas de Pococí y Abangares de Costa Rica. A los árboles se les extrajo de dos a tres galletas a diferentes alturas, se tomaron fragmentos de estas y se evaluaron métodos de aislamiento como el sándwich de zanahoria, cámara de humedad en agar agua y siembras directas en medio de cultivo. Además, con los hongos *Ceratocystis fimbriata* y *Scytalidium lignícola* aislados e identificados a partir de técnicas morfológicas y moleculares, se realizó la inoculación de tres genotipos, bajo condiciones de invernadero, para estudiar sobre la patogenicidad de estos hongos.

Como resultados, se encontró que algunos de los métodos de aislamiento no fueron efectivos, debido a que no hubo crecimiento de patógenos, otros métodos fueron contaminados por diversos hongos y tuvieron crecimiento de bacterias. Por otra parte, en las evaluaciones del ensayo de patogenicidad se observaron plantas con síntomas como rebrotes y canchales. Y al realizar los análisis estadísticos se encontró un genotipo más susceptible al efecto causado por la inoculación, así como también un genotipo con mayor desempeño. Por otra parte, se pudo evidenciar que el hongo *Ceratocystis fimbriata* es patogénico y podría representar un riesgo para las plantas de teca.

Palabras clave: métodos de aislamiento, patogenicidad, inoculación, genotipo, hongos.

* Chacón Solís, RL. 2021. Análisis de técnicas para el diagnóstico del agente causal de la marchitez y muerte descendente de la teca (*Tectona grandis* L. f.) en Costa Rica. Trabajo final de graduación para optar por el título de Ingeniera Forestal con el grado académico de Licenciatura. Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 36 p.

ABSTRACT

Tectona grandis is one of the most important forest species and the most valuable woods worldwide. However, diseases such as wilt and teak dieback can significantly affect the productivity of plantations of the species. There are various hypotheses about the cause of the disease, some scientists argue that it is due to poor site conditions and other authors attribute the development of this disease to fungal organisms such as *Ceratocystis fimbriata*.

To diagnose the disease, trees were cut in the Pococí and Abangares areas of Costa Rica. Around two to three cross sections were extracted from the trees at different heights, fragments of these were taken and some isolation methods such as carrot sandwich, humidity chamber in water agar and direct sowings in culture medium were evaluated. In addition, with the fungi *Ceratocystis fimbriata* and *Scytalidium lignicola* isolated and identified from morphological and molecular techniques, three genotypes were inoculated under greenhouse conditions, to learn about the pathogenicity of these fungi.

As a result, it was found that some of those isolation methods were not effective, because there was no pathogens, growth; other methods were contaminated by various fungi and had bacteria growth. On the other hand, in the evaluations of the pathogenicity test, plants with symptoms such as sprouts and cankers were observed. In addition, when performing the statistical analyzes, a genotype more susceptible to the effect caused by inoculation was found, as well as a genotype with a higher performance. On the other hand, it was possible to show that the *Ceratocystis fimbriata* fungus is pathogenic and could represent a risk for teak plants.

Keywords: isolation methods, pathogenicity, inoculation, genotype, fungi.

ACREDITACIÓN

CONSTANCIA DE DEFENSA PÚBLICA DE PROYECTO DE GRADUACIÓN

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

Ing. Dawa Méndez Álvarez

Directora de tesis

Ing. María Rodríguez Solís

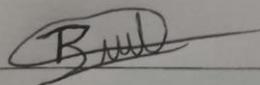
Profesora lectora

Ing. Olman Murillo Gamboa

Profesor lector

Ing. Dorian Carvajal Vanegas

Coordinador de Trabajos Finales de Graduación



Raquel Chacón Solís

Estudiante

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mi hermana Laura, a mi sobrina Stefany y mi sobrino Josue, por ser siempre mi mayor apoyo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A mi profesora guía, Dawa Méndez Álvarez, por su paciencia, dedicación, consejos, enseñanzas y el enorme apoyo brindado en todo el proceso.

A la profesora María Rodríguez, por su valiosa colaboración, consejos y enseñanzas.

Al profesor Olman Murillo, por darme la oportunidad de hacer mi proyecto con su excelente equipo de trabajo y por la ayuda brindada.

Al señor Carlos Balletero, por su ayuda en el laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
ACREDITACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	3
Área de estudio.....	3
Selección de árboles enfermos y toma de muestras	4
Métodos de aislamiento.....	5
Establecimiento de los aislamientos.....	5
Aislamiento en sándwich de zanahoria	5
Cámara de humedad en agar agua.....	6
Siembras directas en medios de cultivo.	6
Evaluación y análisis	8
Identificación morfológica y molecular del patógeno.....	8
Pruebas de patogenicidad.....	9
Evaluación y análisis	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
Métodos de aislamiento.....	10
Aislamiento en sándwich de zanahoria	10
Cámara de humedad en agar agua.....	12
Siembras directas en medios de cultivo.	13
Pruebas de patogenicidad.....	15
Evaluación a los 30 días	15
Evaluación a los 60 días	19
CONCLUSIONES	22
RECOMENDACIONES	23
REFERENCIAS.....	23

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen de los valores de p obtenidos a partir de los análisis de varianza para las variables evaluadas a los 30 días en las pruebas de patogenicidad en plantas de <i>Tectona grandis</i>	16
Cuadro 2. Resumen de los valores de p obtenidos a partir de los análisis de varianza para las variables evaluadas a los 60 días en las pruebas de patogenicidad en plantas de <i>Tectona grandis</i>	19

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Regiones de Costa Rica con plantaciones de *Tectona grandis* que presentan la enfermedad de la marchitez y muerte descendente. 4
- Figura 2.** Galletas de madera de *Tectona grandis* con manchas características de la enfermedad de la marchitez y muerte descendente. (A) Muestra de plantación de Pococí. (B) Muestra de plantación de Abangares. 5
- Figura 3.** Características morfológicas de *Ceratocystis fimbriata*. (A) Peritecios y masas de ascosporas en disco de zanahoria, vista al estereoscopio, aislado a partir de fragmentos de madera, de galletas de la zona de Pococí. (B) Hifas ostiolares con salida de conidias cilíndricas y con forma de sombrero. 11
- Figura 4.** Características morfológicas de *Scytalidium lignícola*. Hifas septadas y codinias, observadas al microscopio (40x). 12
- Los aislados de *Scytalidium lignícola* realizado a partir de los fragmentos de galletas, de árboles enfermos de Abangares, tenían micelio algodonoso de color grisáceo, presencia de hifas septadas y conidias de color marrón oscuro. Estos resultados de morfología para el *Scytalidium lignícola* son similares a los reportados por [36] para este hongo. . 12
- Figura 5.** Evaluación de los medios de cultivo según crecimiento bacteriano en el aislamiento de patógenos presentes en árboles enfermos de *Tectona grandis*. 14
- Figura 6.** Prueba Tukey para la variable diámetro (cm) según genotipo en el ensayo de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis* a los 30 días de evaluación. 17
- Figura 7.** Prueba Tukey para la variable número de hojas según genotipo en el ensayo de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis* a los 30 días de evaluación. 17
- Figura 8.** Sintomatología observada a los 30 días de inoculación en el ensayo de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis*. (A) Rebrote en herida para el genotipo 3 del T1. (B) Rebrote bajo herida para el genotipo 31e del T1. (C) Rebrotos arriba de la herida para el genotipo 31e del T0. (D) Planta muerta del genotipo 53 del T2. 18
- Figura 9.** Prueba Tukey para la variable diámetro (cm) según genotipo en el ensayo de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis* a los 60 días de evaluación. 20
- Figura 10.** Sintomatología observada a los 60 días de inoculación en el ensayo de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis*. (A) Presencia de cancro en la herida de inoculación para el clon 53 del T1. (B) Presencia de rebrotos bajo y sobre la herida de inoculación para el clon 3 del T2. 21

INTRODUCCIÓN

Tectona grandis (teca) es una especie originaria del sudeste asiático, se encuentra principalmente en países como Birmania, Tailandia, India, Malasia, Indonesia y la República Democrática Popular de Laos [1]. La madera de teca es considerada de alto valor, debido a sus propiedades de dureza y durabilidad. Además, es una de las especies forestales de mayor importancia y de las maderas más valiosas a nivel mundial, lo que hace que exista un gran interés en realizar inversiones para cultivarla [2].

Con respecto al cultivo de la especie, para el año 2002 en Centroamérica se reportan 76 000 ha con teca. En ese año, la madera de estas plantaciones, tanto de raleos como de cosecha final es vendida en mercados internacionales, gracias a esto la teca toma importancia como una especie maderable [3]. En Costa Rica, el cultivo de teca inicia entre los años 1926 y 1929 con gran potencial, al igual que otros países de Centroamérica como Honduras y Panamá [4].

En el 2014 el censo agropecuario reporta 47 167 ha de teca, siendo la especie forestal más utilizada en la producción de madera en plantaciones a nivel nacional [5]. En este sentido, es de gran relevancia el estudio de la silvicultura en plantaciones de teca, así como el control y manejo de plagas y enfermedades. Ya que el desarrollo de alguna enfermedad no controlada podría afectar significativamente la productividad de las plantaciones de la especie [5], [6].

A nivel internacional, un estudio en Ecuador determina que en la época lluviosa los problemas fitosanitarios de mayor incidencia en teca, son ocasionados por los hongos *Colletotrichum* sp. (28,16 %), *Ceratocystis* sp. (11,86 %), y los insectos *Hyadaphis erysimi* (26,07 %), *Hortensia similis* (6,80 %) y el *Phyllophaga* sp. (6,20 %). Para la época seca las mayores incidencias son causadas por *Olivea tectonae* (56,08 %), *Colletotrichum* sp. (17,58 %), *Ceratocystis* sp. (15,86 %), *Phytophthora* sp. (0,70 %), *Hemileuca maia* (7,96 %), *Atta* sp. (3,22 %) y el *Scolytus* sp. (2,25 %) [10].

Actualmente, en Costa Rica se han identificado una variedad de problemas fitosanitarios. De ellos 20 son insectos (48,8%), 18 son patógenos (43,9%), 2 especies de animales vertebrados (4,9%) y un muérdago de la familia Loranthaceae (2,4%), que afectan las distintas partes de la planta [7], [8], [9]. En follaje el mayor impacto es causado por los hongos *Phomopsis* sp. y *Pseudoepicocus tectonae* y los insectos *Hyblaea puera* y *Rhaphdopterus* sp. En el fuste los daños se deben a ataques por la bacteria *Agrobacterium*

tumefaciens y canchros producidos por los hongos *Nectria nauriticola*, *Fusarium* sp. y *Botryodiplodia* sp. [6].

En el 2005 se reporta la enfermedad llamada “decaimiento lento de la teca”, que causa el amarillamiento y pérdida de follaje, desde las partes altas hacia las más bajas, hasta que el árbol muere. La enfermedad se encuentra presente principalmente en plantaciones de 7 a 12 años en las regiones Huetar Norte y Atlántica, con mortalidades que oscilan entre el 11 % y 60 %. Los investigadores atribuyen el desarrollo de esta enfermedad al engrosamiento de las raíces de absorción y condiciones de sitio. Además, mencionan que no está asociada a la presencia de fitopatógenos [11].

Asimismo, Ecuador realiza un estudio en el 2019 y reporta la enfermedad de la marchitez vascular en teca, en plantaciones de 2, 5 y 7 años. El estudio determina que la enfermedad tiene una incidencia del 16,6 %, 15,2 %, y 11,6 % en plantaciones de 2, 5 y 7 años respectivamente. En el caso de las plantaciones de 2 años, la mortalidad es de 60 árboles/ha y en las plantaciones de 5 y 7 años es de 20 árboles muertos/ha. Adicionalmente, determinan que el agente causal de la enfermedad es el hongo *Ceratocystis fimbriata* [12].

No obstante, existen diversas hipótesis sobre la causa de la enfermedad que ocasiona marchitez y muerte descendente en los árboles de teca. Algunos científicos argumentan que es debido a malas condiciones de sitio. En contraste, otros autores atribuyen el desarrollo de esta enfermedad a organismos fúngicos como el *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp. y el *Ceratocystis fimbriata* [11], [13], [14].

Bajo este contexto, es relevante realizar nuevos estudios sobre la enfermedad ya que, es una enfermedad muy agresiva y que no ha sido estudiada de forma exhaustiva en Costa Rica. Resulta necesario generar conocimiento actualizado de las formas de ataque, el agente causal, los métodos de propagación, entre otras características importantes. Es por esto que el presente trabajo tiene como objetivo realizar un diagnóstico correcto sobre el posible agente causal de la enfermedad que causa la marchitez y muerte descendente de la teca en Costa Rica, a partir de técnicas in vitro a nivel de ensayos en laboratorio e in vivo a través de ensayos en invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Forestal del Centro de Investigación en Innovación Forestal, de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica y está ubicado en el Campus Tecnológico Central Cartago. Además, se realizó ensayos de inoculación bajo condiciones de invernadero en las instalaciones de la Cooperativa Internacional de Mejoramiento Genético Forestal (GENFORES), ubicado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica en la Sede Regional San Carlos, en Alajuela.

El material para la investigación es procedente de plantaciones forestales de teca en Pococí de Limón y Abangares en Guanacaste, Costa Rica. La zona de Pococí (figura 1) se caracteriza por tener un clima tropical húmedo y muy húmedo, con precipitación variable anual de 3500-6000 mm, temperaturas promedio de 17 °C - 26 °C, humedad promedio de más del 80 % y predominan los suelos inceptisoles, que se utilizan para actividades agrícolas, pecuarias y forestales [15], [16].

Por otra parte, Abangares (figura 1) se encuentra dentro de la zona de vida de bosque húmedo premontano, con temperaturas promedio de 15 °C - 26 °C, precipitación promedio anual de 2700 mm, humedad relativa del 62 %, predominan los suelos alfisoles y molisoles y son dedicados a pastos, cultivos agrícolas, cobertura forestal para protección, regeneración de áreas y plantaciones forestales [17], [18]. En la figura 1 se muestra la ubicación de Abangares y Pococí en Costa Rica, zonas con plantaciones de teca que presentan la enfermedad de la marchitez y muerte descendente.

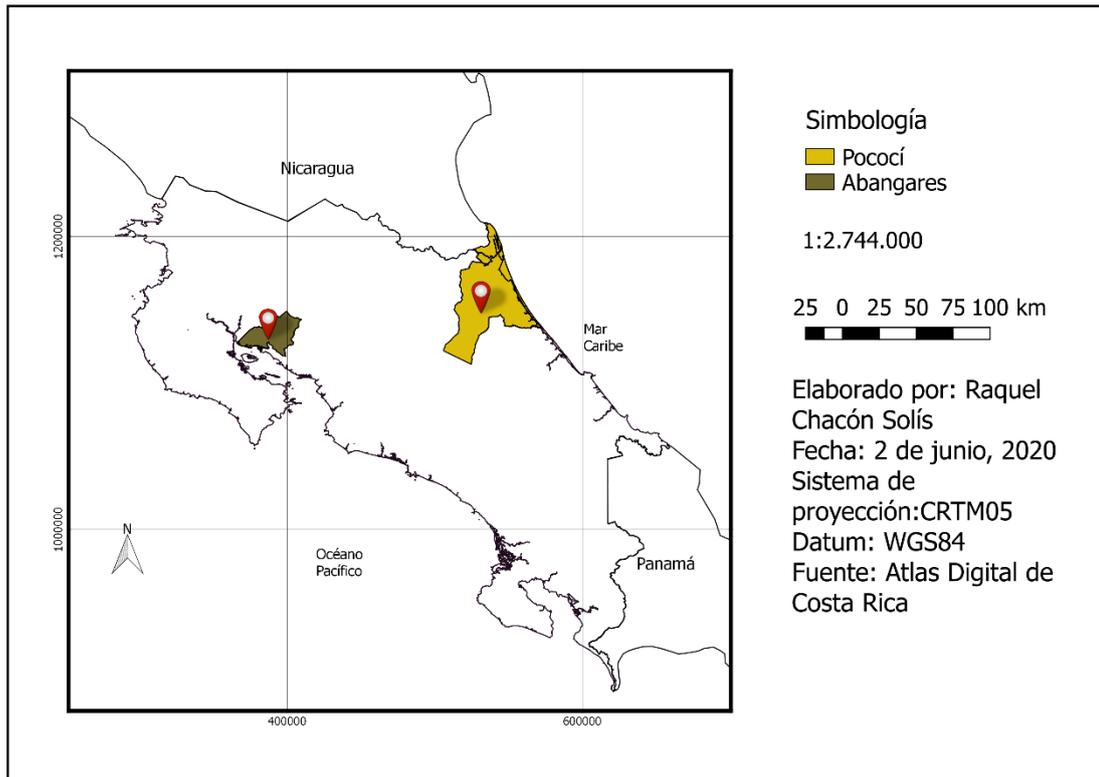


Figura 1. Regiones de Costa Rica con plantaciones de *Tectona grandis* que presentan la enfermedad de la marchitez y muerte descendente.

Selección de árboles enfermos y toma de muestras

En plantaciones comerciales de teca, se realizó a criterio de experto la selección de dos árboles enfermos por región. Los árboles tenían síntomas de la enfermedad, como marchitez foliar, necrosis del tejido vascular y exudaciones en el tallo. Estos árboles fueron talados y se extrajo de dos a tres galletas de 1 pulgada de grosor a diferentes alturas (figura 2). Las muestras fueron codificadas, almacenadas en bolsas plásticas y se trasladaron al laboratorio de patología forestal del Centro de Investigación en Innovación Forestal, de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica, con el fin de realizar el aislamiento del hongo fitopatógeno.



Figura 2. Galletas de madera de *Tectona grandis* con manchas características de la enfermedad de la marchitez y muerte descendente. (A) Muestra de plantación de Pococí. (B) Muestra de plantación de Abangares.

Métodos de aislamiento

Establecimiento de los aislamientos

Aislamiento en sándwich de zanahoria

Se utilizó la metodología descrita por Moller & De Vay [19]. Se tomaron fragmentos de las galletas extraídas de los árboles enfermos. Cada fragmento incluía tejido sano y enfermo, con un tamaño de 1 cm de largo y 5 mm de ancho aproximadamente. Las muestras se esterilizaron con alcohol al 70 % y posteriormente se flamearon con un mechero. Los fragmentos una vez esterilizados, se colocaron entre dos discos de zanahoria, formando una especie de sándwich.

Previamente, las zanahorias se pelaron y lavaron con agua y jabón antibacterial, posteriormente se sumergieron en una solución de antibiótico (0,2 g/l de penicilina, 0,2 g/l de cloranfenicol y 0,2 g/l de estreptomicina) por 20 minutos. De cada galleta se realizó cuatro sándwiches de zanahoria y se colocaron en cajas plásticas estériles, realizando una cámara de humedad (una caja por galleta). Cada caja tenía dimensiones de 20 cm de largo, 10 cm de ancho y 6 cm de alto aproximadamente.

Además, estas cajas contaban con una toalla de papel humedecida con agua destilada en la base de la caja, un soporte de cedazo sobre la servilleta y una tapa plástica para cubrir la caja, la cual se esterilizó con alcohol al 96 %. Las cajas con los sándwiches se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días. Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a

analizar los discos de zanahoria, con el fin de determinar si existían signos de organismos fúngicos.

Al observarse la presencia de algún hongo, éste se repicó a otros medios de cultivo con la ayuda de un estereoscopio y un asa micológica, extrayendo de los sándwiches de zanahoria el micelio o los cuerpos fructíferos. Se colocaron cuatro réplicas en placas de Petri con 20 ml de medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa) o de MYEA (agar extracto de malta y levadura) y mezcla de antibióticos (0,2 g/l de penicilina, 0,2 g/l de cloranfenicol y 0,2 g/l de estreptomina). Las réplicas se incubaron durante ocho días a 26 °C. Una vez transcurrido ese tiempo, se revisaron las placas para determinar si hubo crecimiento de hongos y posteriormente, se realizó la identificación morfológica de estos.

Cámara de humedad en agar agua

Se tomaron fragmentos de 1 cm de largo y 5 mm de ancho de las galletas extraídas de los árboles enfermos. Cada fragmento incluía tejido sano y enfermo, estos se esterilizaron con alcohol al 70 % y posteriormente, se flamearon con un mechero. Los fragmentos seleccionados se colocaron en placas de Petri, con cuatro réplicas por cada galleta, que contenían 12 ml de medio de cultivo agar agua (AA).

Luego, se incubaron por 8 días aproximadamente a 26 °C. Una vez transcurrido ese tiempo se revisaron las placas con el fin de determinar si existía crecimiento de micelio o algún signo, que indicara la presencia del organismo fúngico. Ante la presencia de algún hongo, este se repicó en placas de Petri con medio de cultivo PDA o MYEA, haciendo uso de un asa micológica, se incubó por ocho días a 26 °C, posteriormente se realizó la identificación morfológica de los organismos desarrollados.

Siembras directas en medios de cultivo.

Se efectuó la siembra de cuatro fragmentos (1 x 1 cm) de madera con tejido sano e infectado, en tres placas de Petri para cada medio de cultivo y se incubaron durante 8 días, a 26 °C. Transcurrido ese tiempo, los hongos desarrollados en los medios de cultivo se identificaron a nivel morfológico con la ayuda de claves taxonómicas. Además, es importante mencionar que solo para este método de aislamiento se trabajó con galletas procedentes de plantaciones de Pococí, San Carlos, Los Chiles y San Ramón y se evaluaron distintos métodos de desinfección y medios de cultivo.

a) Métodos de desinfección

Para cada método de desinfección, primero se realizó un lavado de las galletas con agua y jabón antibacterial, y posteriormente se secaron con papel toalla. Los métodos de desinfección utilizados en este estudio fueron:

Método de desinfección 1.

Una vez realizado el lavado y secado de las galletas, estas se colocaron dentro de la cámara de flujo laminar y se procedió a flamear (con alcohol al 96 %) junto con las herramientas de trabajo como cinceles, bisturís, entre otros. Después de flamear, las galletas se cortaron por la mitad con un cincel; luego haciendo uso de bisturís, se tomaron fragmentos con dimensiones de 1 x 1 cm aproximadamente y se colocaron dentro de placas de Petri estériles. Finalmente se colocaron 4 fragmentos de galletas por medio de cultivo por réplica.

Método de desinfección 2.

Para el método de desinfección 2, se tomaron fragmentos (1 x 1 cm) de las galletas con un bisturí. Los fragmentos se sumergieron por un minuto en etanol al 100 %, posteriormente se sumergieron por 30 segundos en hipoclorito de sodio al 1 % i.a, en agitación constante Finalmente, se le realizaron 3 lavados con agua destilada estéril (de un minuto cada lavado), se colocaron sobre papel filtro estéril y luego en placas Petri estériles. Finalmente se colocaron 4 fragmentos de galletas por medio de cultivo por réplica.

Método de desinfección 3.

Se siguió el mismo procedimiento que el método de desinfección 2, con la excepción de que los fragmentos solo se sumergieron en etanol al 100 % y posteriormente se realizaron los lavados con agua destilada estéril, seguidamente se secaron el papel filtro estéril y se colocaron en placas Petri estériles. Finalmente se colocaron 4 fragmentos de galletas por medio de cultivo por réplica.

a) Medios de cultivo

Se preparó cinco tipos de medio de cultivo, estos se dispensaron en placas Petri con aproximadamente 20 ml de cada medio y con tres réplicas de cada medio por método de

desinfección y procedencia de los fragmentos de galletas. Se evaluaron los siguientes medios de cultivo:

1. Agar papa dextrosa (PDA) acidificado con 250 μ l de ácido tartárico por cada litro de medio.
2. Agar jugo vegetal (V8)
3. Agar extracto de malta y levadura (MYEA) con 4 de pH
4. Agar extracto de malta (MEA) con antibióticos (0,2 g/l de penicilina, 0,2 g/l de cloranfenicol y 0,2 g/l de estreptomicina).
5. Agar zanahoria (AZ).

Evaluación y análisis

Los aislamientos de sándwich de zanahoria y de cámara de humedad en agar agua, se evaluaron solo tomando en consideración la presencia o ausencia de hongos, por lo que no se efectuó ningún análisis estadístico. Por su parte, las siembras directas en medio de cultivo se evaluaron de acuerdo con el método de desinfección y el medio de cultivo utilizado. Para realizar el análisis estadístico de los métodos de desinfección, se utilizó la cantidad de réplicas contaminadas por hongos comúnmente presentes en el ambiente.

Para la evaluación del efecto de los medios de cultivos, se tomó en consideración la cantidad de réplicas con presencia de bacterias. A los datos se les comprobó los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas, una vez verificado se realizó un análisis de varianza y una prueba Tukey con $\alpha=0,05$ en las variables que mostraron diferencias significativas. Todos los análisis estadísticos se efectuaron con el software InfoStat.

Identificación morfológica y molecular del patógeno

La identificación morfológica de los aislamientos se llevó a cabo por medio de la observación al microscopio de preparaciones fijas en portaobjetos, en las cuales se colocaron las estructuras del organismo fúngico. En cuanto a la identificación molecular, se envió una réplica de cada cultivo monospórico y axénico al Laboratorio de Técnicas Moleculares en el Centro de Investigaciones de Protección de Cultivos de la Universidad de Costa Rica, para la identificación taxonómica.

La identificación molecular, se realizó por medio de la extracción del ADN del micelio, al utilizar el método CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio). Posteriormente, se efectuó la prueba PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con cebadores universales

de la región ribosomal 4 y 5 del ITS (Internal transcribed spacer). Una vez obtenidos los resultados del PCR, estos fueron secuenciados por la empresa Macrogen en Corea del Sur. Con las secuencias editadas y corregidas se corrió un blast x en el GenBank y se determinó la identificación con similitudes superiores al 98 %.

Pruebas de patogenicidad

Se estableció un ensayo de patogenicidad en condiciones de invernadero en las instalaciones del Tecnológico de Costa Rica, en San Carlos, Alajuela. Para este ensayo se utilizaron 63 plantas de teca en total, con 15 centímetros de altura y 0,8 cm de diámetro en promedio, en potes de 41 con turba como sustrato estéril. El ensayo se estableció con un diseño experimental factorial de 3 x 3, en el cual se evaluaron 2 tratamientos más un testigo y tres genotipos élite pertenecientes a GENFORES. Se utilizaron 7 plantas de teca por cada genotipo (réplicas) y por cada tratamiento. Además, los tratamientos fueron asignados de manera aleatoria para cada una de las plantas.

En el tratamiento uno (T1) se llevó a cabo la inoculación del patógeno aislado a partir de árboles enfermos de la zona de Pococí. En cada planta de teca se realizó una incisión de 0,3 mm de diámetro en el tallo de la planta, con un sacabocado estéril. La incisión se efectuó a 5 cm de altura a partir de la base de la planta. En cada una se colocó un disco del mismo tamaño de la incisión de MYEA con micelio del hongo. Cada incisión de la planta se cubrió con papel Parafilm. En el tratamiento dos (T2), se inoculó el patógeno aislado a partir de árboles enfermos de la zona de Abangares. Se siguió el mismo proceso descrito anteriormente para el tratamiento uno.

Con respecto al tratamiento testigo o control (T0), en el tallo de cada planta se le realizó la abertura de una incisión de 0,3 mm de diámetro, con un sacabocado estéril. Estas incisiones se efectuaron a 5 cm a partir de la base de planta, dónde se colocó un disco de medio de cultivo MYEA estéril (sin ningún crecimiento miceliar). Finalmente, se selló la herida con papel Parafilm. Una vez realizadas las inoculaciones según tratamiento, las plantas se colocaron de manera aleatoria dentro del invernadero.

Evaluación y análisis

Se realizó una evaluación y medición a los 30 y 60 días después de inocular. En cada planta se midió el diámetro, la altura total, el número de hojas funcionales. Para el caso del diámetro, se efectuó la medición en la base de cada planta utilizando un calibrador

tipo Vernier. La altura se midió con una regla de 1 m desde la base hasta el ápice y se contó el número de hojas sanas. Además, se calculó el promedio de estas variables para los tres genotipos y los tres tratamientos del estudio.

Por otra parte, para la presencia síntomas se definió individuos sanos con un 0 y a los enfermos con un 1. A estos se les asignó la categoría de enfermos cuando tenían presencia de rebrotes, canchros o heridas abiertas. Con respecto al análisis, a los datos se les comprobó los supuestos de normalidad y homocedasticidad, una vez verificado se realizó un análisis de varianza y una prueba de Tukey ($\alpha=0,05$) para las variables diámetro, altura total, el número de hojas y presencia de síntomas. Los datos fueron evaluados de acuerdo con el diseño experimental de bloques completos al azar con la ecuación que se presenta a continuación:

$$Y = \beta \text{Genotipo} + \alpha \text{Tratamiento} + \varphi \text{Genotipo} * \text{Tratamiento} + e \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

β = el efecto de i -ésimo Genotipo

α = el efecto del j -ésimo Tratamiento

φ = efecto de la interacción del l -ésimo Genotipo x Tratamiento

e = error experimental

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software de InfoStat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Métodos de aislamiento

Aislamiento en sándwich de zanahoria

Utilizando el método de sándwich de zanahoria, se logró aislar los hongos *Ceratocystis fimbriata* y *Scytalidium lignícola*. Estas dos especies se identificaron por medio de técnicas morfológicas y moleculares, a partir de los aislamientos realizados con los fragmentos de galletas, de árboles enfermos procedentes de la zona de Pococí y de Abangares, respectivamente.

En la figura 3 se muestra el crecimiento típico de las estructuras del *Ceratocystis fimbriata*.

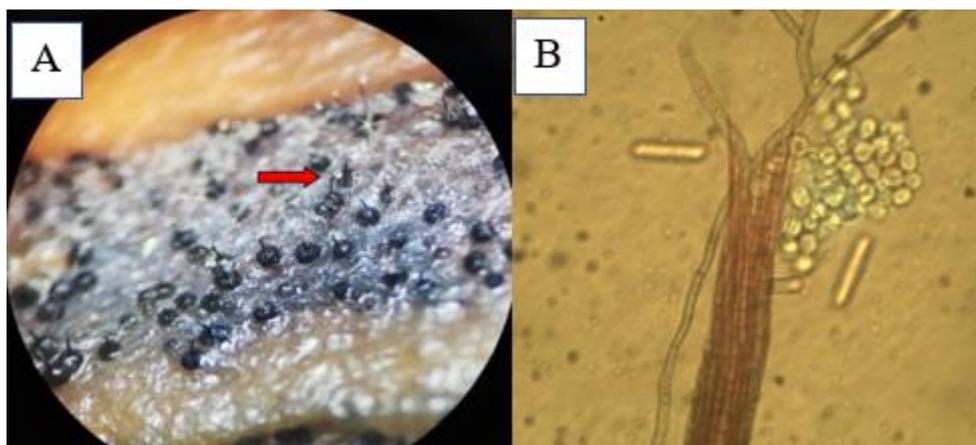


Figura 3. Características morfológicas de *Ceratocystis fimbriata*. (A) Peritecios y masas de ascosporas en disco de zanahoria, vista al estereoscopio, aislado a partir de fragmentos de madera, de galletas de la zona de Pococí. (B) Hifas ostiolares con salida de conidias cilíndricas y con forma de sombrero.

Los sándwiches con muestras necrosadas de los árboles de Pococí, tenían presencia de micelio de color grisáceo, con formación de peritecios de color negro, con forma globosa y masas de ascosporas de color anaranjado. Estas estructuras observadas en el aislado de zanahoria, concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios realizados en *Tectona grandis* en Ecuador [12] y en la especie *Coffea arabica* en Costa Rica [20] para el patógeno *Ceratocystis fimbriata*.

El crecimiento de *C. fimbriata* en zanahoria, fue satisfactorio, incluso estudios manifiestan que es la mejor forma para efectuar el aislamiento del hongo [21], gracias a que está compuesta de floema y xilema ricos en nutrientes [20] y además, favorecen el crecimiento del hongo por la forma en la que actúa el *Ceratocystis* dentro de la planta, invadiendo y desplazándose a través de los tejidos vasculares de su hospedero, es por esta razón que la zanahoria se ha vuelto un sustrato selectivo de este patógeno [20].

Según estudios realizados por investigadores en Ecuador y Brasil, *Ceratocystis fimbriata* causa la muerte de individuos de teca. El patógeno fue reportado como el agente causal de la enfermedad de marchitez de la *Tectona grandis* en el 2012 en Brasil [22] y en Ecuador para el año 2019 [12]. Los árboles enfermos en estos países presentan clorosis, pérdida de turgencia, ápices de crecimiento secos, marchitez y presencia de brotes epicórmicos en el fuste [12], [22].

Por otra parte, sobre *Scytalidium lignicola* no se tiene reportes como agente causal de enfermedades en la *Tectona grandis*, pero sí ha sido reportado en especies agrícolas como la yuca, ocasionando la enfermedad de la “podredumbre negra” en raíces y tallos [23]. Las plantas en la mayoría de los casos presentan pudrición de raíces, se desprende un olor a materia orgánica en descomposición y algunas veces se da el marchitamiento de los tallos [34], [35].

En la figura 4 se muestran las estructuras de *S. lignicola*, aislado a partir de los fragmentos de galletas, de árboles enfermos de Abangares.



Figura 4. Características morfológicas de *Scytalidium lignicola*. Hifas septadas y conidias, observadas al microscopio (40x).

Los aislados de *Scytalidium lignicola* realizado a partir de los fragmentos de galletas, de árboles enfermos de Abangares, tenían micelio algodonoso de color grisáceo, presencia de hifas septadas y conidias de color marrón oscuro. Estos resultados de morfología para el *Scytalidium lignicola* son similares a los reportados por [36] para este hongo.

Cámara de humedad en agar agua

Este método de aislamiento no fue efectivo para realizar el aislamiento de los patógenos, que estaban presentes en los fragmentos de la madera de teca, extraídos de galletas de árboles con síntomas de la enfermedad de la marchitez y muerte descendente. Debido a que, no se presentó ningún tipo de crecimiento de micelio o cuerpos fructíferos de organismos fúngicos patogénicos, por lo que no se pudo realizar ningún análisis sobre este método.

El aislamiento en cámara de humedad se realizó en placas de Petri con medio de cultivo agar agua, lo cual pudo interferir en el crecimiento del patógeno presente en los fragmentos de la madera de teca, ya que algunos microorganismos requieren nutrientes específicos y condiciones fisicoquímicas adecuadas para favorecer su crecimiento y el medio de cultivo de agar agua no proporciona ninguna de esas condiciones [24].

El agar es de mucha importancia en la preparación de medios de cultivos sólidos, porque es un agente gelificante, que muy pocos microorganismos pueden degradar [24]. Sin embargo, se debe añadir a este los nutrientes necesarios de acuerdo con el microorganismo que se desea aislar, ya que de no ser así el crecimiento puede ser muy escaso o nulo, como sucedió en este estudio.

Siembras directas en medios de cultivo.

Al realizar el análisis de varianza con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ para determinar si existía diferencias entre los métodos de desinfección de las muestras, se obtuvo un valor de $p=0,88$; por lo que se asume que no existen diferencias entre los métodos de desinfección, utilizados para efectuar las siembras directas en medios de cultivo. A pesar de que los métodos de desinfección resultaron ser iguales, la aplicación de este resultado en el laboratorio es de mucha importancia, debido a que se puede utilizar el método de desinfección más económico y que requiera de menor tiempo. Además, al evaluar el efecto de las procedencias, se encontró que no había diferencias significativas entre estos.

Como parte de este análisis, se realizó la observación de los hongos que causaron la contaminación de las placas de Petri, que acuerdo con sus características macroscópicas podrían tratarse de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* y algunos mohos que no fueron identificados. Estos hongos filamentosos detectados en el laboratorio han sido reportados comúnmente como contaminantes del ambiente externo y del aire de laboratorios [25].

Un aspecto importante que se debe destacar es que el género *Trichoderma* identificado como contaminación en este estudio, ha sido ampliamente estudiado como control biológico, por su capacidad de antagonizar patógenos y de formar asociaciones con las raíces de las plantas, lo que contribuye a mejorar la absorción de nutrientes [26]. Además, tiene la capacidad de activar la respuesta de defensa de las plantas ante el ataque de

patógenos [26], lo que podría servir en estudios futuros para atacar al agente causal de la enfermedad de la marchitez y muerte descendente.

Por otra parte, en las placas de Petri no solo se observaron hongos contaminantes, también se dio el crecimiento de hongos como el *Fusarium* sp. y el *Lasiodiplodia* sp., sin embargo, estos organismos no fueron evaluados en la inoculación, debido a que estos géneros ya han sido reportados en teca y por medio de ensayos de patogenicidad, se determinó que no son los responsables de la muerte de los árboles por causa de la enfermedad de la marchitez [30].

Con respecto a los medios de cultivo, al realizar el análisis de varianza con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ se obtuvo un valor de $p=0,0001$; de esta forma se rechaza la hipótesis nula, lo que significa que existen diferencias en el crecimiento de bacterias entre los medios de cultivo evaluados. Según la prueba estadística de Tukey realizada, se determinó el mejor de los medios de cultivo frente al crecimiento de bacterias (figura 5).

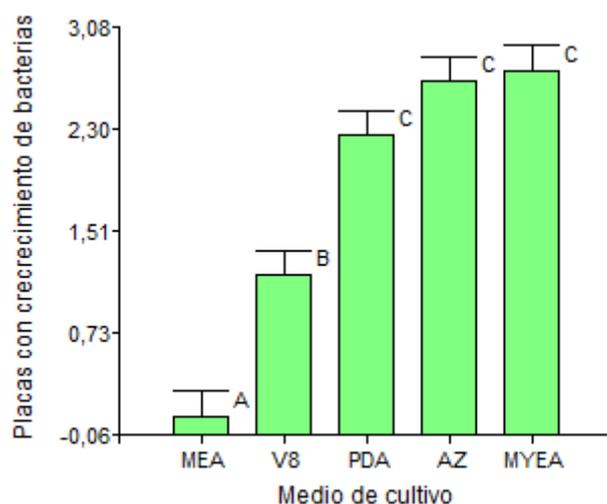


Figura 5. Evaluación de los medios de cultivo según crecimiento bacteriano en el aislamiento de patógenos presentes en árboles enfermos de *Tectona grandis*.

En la figura 5, se observa que hay diferencias entre el MEA y los otros medios y el V8 con el resto, siendo el MEA el que posee la menor incidencia de bacterias con una media de 0,08. Esto se debe principalmente al hecho de que el MEA fue el único de los medios de cultivo al que se le adicionó una mezcla de antibióticos, compuesto por penicilina, cloranfenicol y estreptomina, lo que concuerda con la literatura en la que se ha revelado

la eficiencia del uso de antibióticos, ya que inhiben la síntesis de la pared, división y crecimiento bacteriano [27].

Por su parte el V8, a pesar de que no hubo mucha presencia de bacterias, no se puede considerar como uno de los mejores medios de cultivo, ya que el crecimiento de micelio fue muy escaso o nulo en algunas de las placas de Petri. Este comportamiento podría estar influenciado por la presencia de ácido cítrico y ácido ascórbico en este medio, lo que haría que el pH cambié y que afecte directamente el crecimiento de los hongos presentes en los fragmentos de madera necrosada [28].

En cuanto a los medios de agar papa dextrosa (PDA) acidificado con ácido tartárico y agar extracto de malta y levadura (MYEA) con pH de 4, se obtuvieron dos de las medias más altas en la variable de placas con crecimiento de bacterias, con resultados de 2,25 para el PDA y 2,75 para el medio MYEA. Con respecto a esto, en la literatura se reporta que, al ajustar el pH por debajo de 4 en los medios de cultivo, se puede inhibir el crecimiento de bacterias [25] sin afectar el desarrollo de los hongos, debido a que muchos de estos pueden crecer de manera óptima a pH inferiores a 5 [29].

Sin embargo, la alta incidencia de bacterias en los medios de cultivo de PDA y MYEA puede explicarse, ya que luego de tres días el pH del medio en promedio sube a 5,8 [25], lo que favorecería el crecimiento de las bacterias y comenzarían a competir con los hongos que estaban presentes en los fragmentos de madera de teca.

Pruebas de patogenicidad

Evaluación a los 30 días

A partir del análisis de varianza ($\alpha=0,05$) para las variables altura, diámetro y número de hojas funcionales, se obtuvo diferencias significativas en las variables diámetro y hojas funcionales como se observa el Cuadro 1.

Cuadro 1. Resumen de los valores de p obtenidos a partir de los análisis de varianza para las variables evaluadas a los 30 días en las pruebas de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis*.

Fuente de variación	Valor de p		
	Altura	Diámetro	Número de hojas funcionales
Genotipo	0,184	0,003	0,001
Tratamiento	0,527	0,361	0,096
Tratamiento*genotipo	0,558	0,528	0,864

En el cuadro 1, se muestra que para la altura no existen diferencias significativas para los genotipos, los tratamientos y para las interacciones entre tratamiento*genotipo. Este comportamiento también se evidenció para el diámetro y el número de hojas en las fuentes de variación de tratamiento y las interacciones tratamiento*genotipo, ya que no se presentaron diferencias significativas entre estos. Sin embargo, para los genotipos si se presentaron diferencias para el diámetro y para el número de hojas.

En la figura 6, se observa como el genotipo 3 es diferente a los genotipos 53 y 31e, siendo el genotipo 3 el que posee el mayor promedio con 0,90 cm, mientras que los genotipos 53 y 31e poseen valores de 0,75 cm y 0,78 cm de diámetro, respectivamente.

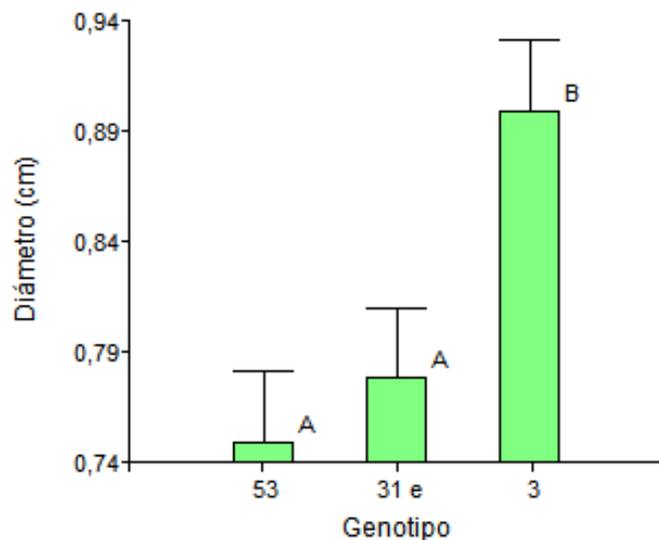


Figura 6. Prueba Tukey para la variable diámetro (cm) según genotipo en el ensayo de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis* a los 30 días de evaluación.

En figura 7, la prueba Tukey demostró que, para el número de hojas el genotipo 31e es distinto a los genotipos 53 y 3, además, posee un promedio de 8 hojas funcionales, el cual es el mayor valor promedio para esta variable.

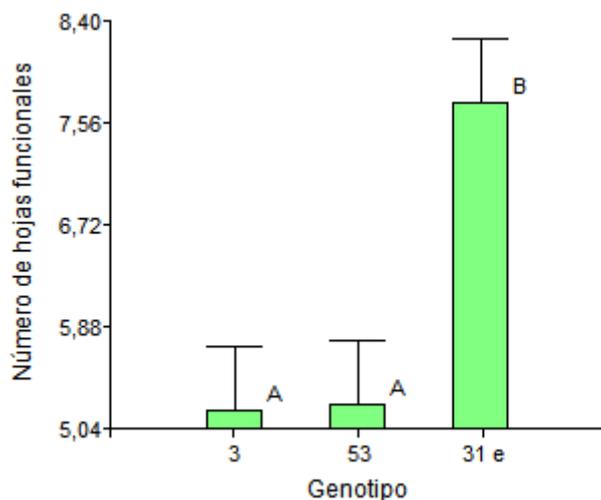


Figura 7. Prueba Tukey para la variable número de hojas según genotipo en el ensayo de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis* a los 30 días de evaluación.

Las diferencias encontradas para los genotipos en las variables número de hojas y diámetro, concuerda con lo reportado por [30], ese estudio evaluó un ensayo de patogenicidad durante 90 días y se encontró que algunos de los genotipos evaluados

poseían desempeños superiores para estas variables, cuando fueron inoculados con los hongos *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium poliferatum*, lo que deja en evidencia que las diferencias entre los genotipos pueden dar ventajas a algunos individuos contra el ataque de organismos fúngicos.

Síntomas

Al momento de la evaluación, el único síntoma observado en las plantas fue la presencia de rebrotes en los diferentes tratamientos (figura 8). Estos rebrotes estaban presentes en la herida de inoculación, arriba y debajo de esta y en las yemas axilares.

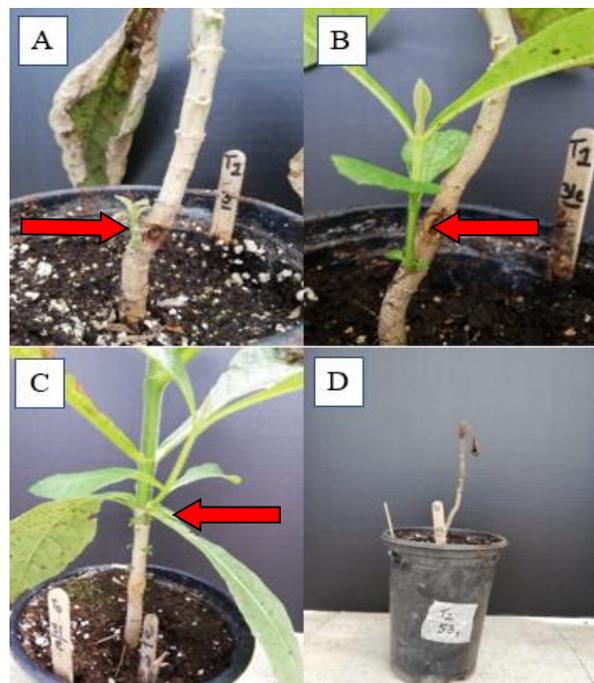


Figura 8. Sintomatología observada a los 30 días de inoculación en el ensayo de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis*. (A) Rebrote en herida para el genotipo 3 del T1). (B) Rebrote bajo herida para el genotipo 31e del T1. (C) Rebrotos arriba de la herida para el genotipo 31e del T0. (D) Planta muerta del genotipo 53 del T2.

En la figura 8, se presentan los síntomas observados en las plantas para los distintos tratamientos. En el caso del testigo T0, una planta del genotipo 31e se observaron rebrotes en yemas axilares arriba de la herida de inoculación. En el tratamiento T1, se encontraron 2 plantas con rebrotes, una con rebrote en la herida de inoculación para el genotipo 3 y otra con rebrote bajo esta herida, para el genotipo 31e. Por su parte, para el T2 se encontró

una planta del genotipo 53 con rebrotes en yemas arriba de la herida de inoculación y una planta muerta para este mismo genotipo.

Con respecto a lo anterior, es importante destacar que las plantas poseen mecanismos para hacer frente a condiciones de estrés, defenderse y para contrarrestar los efectos de enfermedades causadas por diversos organismos patogénicos, que causan daños y muerte [31], [32]. Los rebrotes observados en las plantas de los diferentes tratamientos evaluados podrían estar relacionadas a un mecanismo de defensa para hacer frente a alguna condición externa a la inoculación, esto debido a que también en el testigo hubo presencia de estos rebrotes.

Evaluación a los 60 días

A partir del análisis de varianza ($\alpha=0,05$) para las variables altura, diámetro y número de hojas funcionales, se obtuvo diferencias significativas en la variable diámetro como se observa el cuadro 2.

Cuadro 2. Resumen de los valores de p obtenidos a partir de los análisis de varianza para las variables evaluadas a los 60 días en las pruebas de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis*.

Fuente de variación	Valor de p		
	Altura	Diámetro	Número de hojas funcionales
Genotipo	0,194	0,001	0,078
Tratamiento	0,550	0,897	0,672
Tratamiento*genotipo	0,452	0,692	0,996

En el cuadro 2, se observa que para la altura y el número de hojas funcionales no existen diferencias significativas para ninguna de las fuentes de variación evaluadas para este estudio. Por su parte, para la variable diámetro se obtuvo que no había diferencias para los tratamientos y para la interacción tratamiento*genotipos, pero si había diferencias entre genotipos.

En la figura 9, se observa como el genotipo 53 es diferente a los genotipos 31e y 3. Además, el genotipo 53 presentó el menor promedio de diámetro, esto con un valor de

0,67 cm, mientras que el genotipo 3 obtuvo el mayor promedio con 0,85 cm y seguido por el genotipo 31e con 0,82 cm para esta variable.

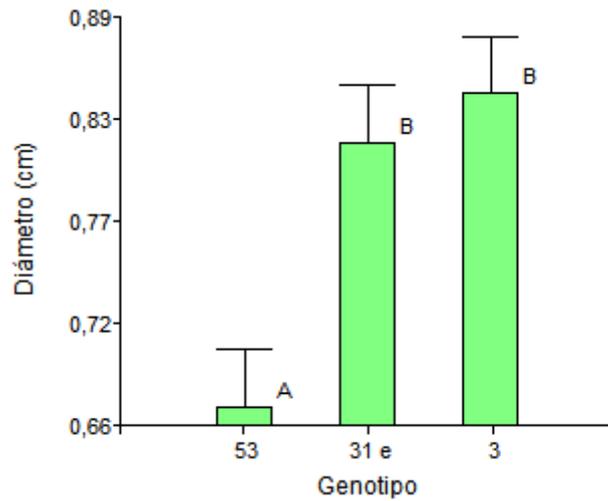


Figura 9. Prueba Tukey para la variable diámetro (cm)según genotipo en el ensayo de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis* a los 60 días de evaluación.

Que los genotipos presentaran diferencias entre sí, se puede dar debido a las condiciones fisiológicas propias de cada uno de estos, que hacen que las plantas tengan una respuesta específica de acuerdo con la amenaza a la que están expuestas, en este caso a la inoculación de organismos fúngicos. Estas respuestas son reguladas genéticamente en muchos casos y proveen a las plantas de distintos mecanismos de defensa, que las ayudan a hacer frente a las enfermedades [33].

Síntomas

En la evaluación a los 60 días, se observaron canchales en las heridas de inoculación para los tratamientos T1 y T2. Además, hubo presencia de rebrotes para el T0, T1 y T2, para los distintos genotipos evaluados (Figura 10).



Figura 10. Sintomatología observada a los 60 días de inoculación en el ensayo de patogenicidad en plantas de *Tectona grandis*. (A) Presencia de cancro en la herida de inoculación para el clon 53 del T1. (B) Presencia de rebrotes bajo y sobre la herida de inoculación para el clon 3 del T2.

En la figura 10, se observan dos de los síntomas más frecuentes encontrados en las plantas del ensayo, los canchros y los rebrotes en distintas partes de la planta. Se debe mencionar, que la presencia de canchros solo se observó en los tratamientos T1 y T2, lo cual es de mucha importancia, dado que en estos tratamientos se realizó la aplicación de los hongos *Ceratocystis fimbriata* y *Scytalidium lignicola* y podría ser un buen indicio del efecto patogénico de estos hongos.

Por otra parte, la presencia de rebrotes se observó en el T1, T2 y en el testigo T0, por lo que este síntoma fue descartado como un mecanismo para contrarrestar el efecto que los hongos *Ceratocystis fimbriata* y *Scytalidium lignicola* pudieran tener en las plantas. Una posible causa de estos rebrotes podría deberse a la fertilización antes de inocular, este fue un factor que no se controló de manera adecuada y pudo ocasionar una intoxicación de las plantas del ensayo. Además del factor fertilización, las condiciones del invernadero y riego podrían estar relacionadas con la mortalidad de los individuos, ya que se encontraron muertas algunas plantas testigo.

Otro aspecto importante sobre la presencia de síntomas es que al realizar el análisis estadístico ($\alpha=0,05$), se encontraron diferencias entre los genotipos. Siendo el genotipo 53 diferente al 31e y al 3. También, demostró ser el más susceptible, debido a que presentó el mayor promedio para esta variable con un valor de 0,81. Por el contrario, el

genotipo 31e mostró un desempeño superior, ya que a pesar de la presencia de síntomas ninguna de las plantas murió por causa de los tratamientos aplicados.

También, se encontraron diferencias entre los tratamientos, donde el T1 es diferente al T2 y al tratamiento testigo T0. El T1 fue el tratamiento con el mayor promedio para presencia de síntomas con un valor de 0,86; por su parte, para los tratamientos T2 y T0 se obtuvo un valor de 0,43. Aunque no se pudo comprobar que los hongos *Ceratocystis fimbriata* y *Scytalidium lignícola* son los agentes causales de la enfermedad de la marchitez y muerte descendente, debido a la muerte de las plantas testigo, se deja en evidencia que el hongo *Ceratocystis fimbriata* es fitopatogénico y podría representar un riesgo para las plantas de teca [12].

CONCLUSIONES

La aplicación de antibióticos en los medios de cultivo, son de mucha importancia para evitar el crecimiento de bacterias y es una de las formas más eficaces para este propósito, ya que también se probó la técnica de acidificación, pero no fue muy efectiva.

Los métodos de aislamiento con cámara de humedad agar agua y siembra directa en medio de cultivo agar jugo vegetal (V8) no fueron efectivos para realizar el aislamiento de hongos, debido a que el crecimiento de micelio fue muy escaso o nulo en estos dos medios.

Con las técnicas in vitro a nivel de ensayos de laboratorio e in vivo a través de ensayos en invernadero, se logró el aislamiento y evaluación de patogenicidad de los hongos *Ceratocystis fimbriata* y *Scytalidium lignícola*, sin embargo, no se pudo comprobar que fueran el agente causal de la enfermedad de la marchitez y muerte descendente de la teca en Costa Rica.

Los canchros observados en las plantas del ensayo de patogenicidad, podrían ser un buen indicio del efecto patogénico de los hongos evaluados.

Se encontraron diferencias entre los genotipos evaluados, siendo el genotipo 53 el más susceptible y el 31e el de mayor desempeño, porque no presentó mortalidad para ninguno de los tratamientos evaluados.

El hongo *Ceratocystis fimbriata* evaluado para este estudio es fitopatogénico y podría representar un riesgo para las plantas de teca.

RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar el que método de desinfección 1, debido a que se obtienen los mismos resultados que los demás métodos evaluados y, además, requiere de menor tiempo en su aplicación.

Se recomienda adicionar antibióticos a los medios de cultivo, para evitar el crecimiento de bacterias, que compiten e interfieren en el desarrollo de los hongos que se están aislando.

Realizar de nuevo el ensayo de patogenicidad con los hongos *Ceratocystis fimbriata* y *Scytalidium lignícola* con condiciones de fertilización y riego más controlada, para poder evaluar de forma acertada el efecto de la inoculación.

REFERENCIAS

- [1] M. Espitia, O. Murillo y C. Castillo, “Ganancia esperada en teca (*Tectona grandis* L.f.) en Córdoba (Colombia)”, Córdoba, Colombia, 2011.
- [2] R. Camino y J. Morales, “Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades”, Turrialba, Costa Rica, 2013.
- [3] L. Matarrita, J. Sandoval y M. Arguedas, “Prevalencia de la roya *Olivea tectonae* (Rac.) de la teca (*Tectona grandis* L.f.) en Costa Rica”. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú (Costa Rica)*, vol. 3, n° 9, 2006.
- [4] D. Pandey y C. Brown, “La teca una visión global”, *Revista Internacional de Silvicultura e Industrias Forestales*, vol. 51, 2000.
- [5] INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos), “VI Censo Nacional Agropecuario”, San José, Costa Rica, 2015.
- [6] M. Arguedas, P. Cannon, M. Winfield y F. Montenegro, “Capítulo 8: Principales riesgos fitosanitarios en plantaciones de teca”, de *Las plantaciones de teca en América Latina: mitos y realidades*, Turrialba, CATIE, 2013, pp. 134- 158.

- [7] M. Arguedas, “La roya de la teca *Olivea tectonae* (Rac.): consideraciones sobre su presencia en Panamá y Costa Rica”, *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, vol 1, n° 1, 2004
- [8] M. Arguedas, “Escarabajos barrenadores de la madera: reconocimiento de daños y manejo”, *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, vol. 1, n° 1, 2004
- [9] M. Arguedas, P. Chaverri, y J. Verjans, “Problemas fitosanitarios de la teca en Costa Rica”, 2004.
- [10] T. Flores, R. Crespo y F. Cabezas, “Plagas y enfermedades en plantaciones de teca (*Tectona grandis* L.F) en la zona de Balzar, provincia del Guayas”, Quevedo, Ecuador, 2010.
- [11] J. Calvo, D. Arias, M. Arguedas y B. Salas, “Síndrome de la mortalidad de la teca en Costa Rica”, 2005.
- [12] C. Belezaca, E. Solano, R. López, R. Baque, A. Ávila, M. Córdor, T. Bohórquez, y D. Dueñas, “Hongos fitopatógenos asociados a la enfermedad de marchitez vascular y muerte regresiva en plantaciones de *Tectona grandis* L.f. (teca) en el Trópico Húmedo Ecuatoriano”, Quevedo, Ecuador, 2019.
- [13] INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias), “Etiología de la muerte regresiva de la teca en Ecuador y rol de insectos en su dispersión”, Ecuador, 2017.
- [14] A. Rodríguez, D. Méndez, Y. Badilla & O. Murillo, “First report of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium proliferatum* causing teak die back in Costa Rica”, *Forest Pathology*, vol. 49, 2019.
- [15] INDER (Instituto de Desarrollo Rural), “Informe de caracterización Integral Básica Del Territorio Pococí”, 2014.
- [16] INDER (Instituto de Desarrollo Rural), “Plan de desarrollo rural territorial Pococí 2015-2020”.
- [17] Municipalidad de Abangares, “Plan estratégico de largo plazo 2012-2027”.
- [18] INDER (Instituto de Desarrollo Rural), “Informe de caracterización básica territorio Abangares-Cañas-Bagaces-Tilarán”. Guanacaste, Costa Rica, 2015.

- [19] W.J. Moller & J. De Vay, "Carrot as a species-selective isolation medium for *Ceratocystis fimbriata*", *Phytopathology*, 1968.
- [20] G. Meneses, "Estudio de aislamientos del hongo fitopatógeno del café *Ceratocystis fimbriata*", Tesis, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 2008.
- [21] M. Marin, B. Castro, A. Gaitan, O. Preisig, B. Wingfield & M. Wingfield, "Relationships of *Ceratocystis fimbriata* Isolates from Colombian Coffee-Growing Regions Based on Molecular Data and Pathogenicity", 2003.
- [22] A.C. Firmino, H.J. Tozze & E.L. Furtado, "First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil", São Paulo, Brasil, 2012.
- [23] M. Ribeiro de Souza, G. Soares, F. Silva y L. Ferreira, "*Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno", Brasil, 2009.
- [24] L. Barrero. *Microbiología clínica*, España: Editorial Síntesis S.A, 2016.
- [25] F. Aguilar. "Análisis de las fuentes de contaminación en un laboratorio de cultivo de tejidos: detección y medidas de control", Cartago, Costa Rica. 2000.
- [26] T. Gómez, "Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de *Trichoderma* sp. mediante fermentación en líquido y sólido", Tesis, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 2017.
- [27] Facultad de ciencias bioquímicas y farmacéuticas, "Crecimiento bacteriano y efecto de los antibióticos", Santa Fe, Argentina. 2020.
- [28] M. López y Y. Tomás, "Estudio de medios de cultivo sobre el crecimiento lineal y la esporulación de *Phytophthora infestans*", *Fitosanidad*, vol. 3, n° 3, 1999.
- [29] M. Madigan, J. Martinko y J. Parker, "Biología de los Microorganismos", Madrid, España, 2004.
- [30] A. Rodríguez-Solís, "Evaluación del efecto de inoculación de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium poliferatum* en plantas jóvenes de *Tectona grandis* (L.F)" Tesis, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 2018.
- [31] K. Madriz-Ordeñana, "Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno", San José, Costa Rica. 2002.
- [32] O. Burbano-Figueroa, "Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal", Córdoba, Colombia, 2020
- [33] J. Pastorino, "Bases genéticas de la resistencia de los árboles a las plagas", 2009.

[34] I. Oliveira, E. Peixoto, N. Nascimento, G. Souza, J. Paiva y V. Ferreira, “*Trichoderma* sp. antagonismo a fitopatógenos causando pudrición de raíz de yuca en Alagoas”, 2020.

[35] K. Alcantara, “Prospecção de fitopatógenos e caracterização de solos arenosos envolvidos na supressividade ou conducividade da podridão radicular da mandioca, causada por *Scytalidium lignícola*”, Tesis, Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil, 2012.

[36] Y. Oren, A. Sadowsky, D. Gefen, Z. Solel & M. Kimchy. “*Scytalidium* wilt of citrus”, *European Journal of Plant Pathology*, pp. 467–470, 2001.