

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

***Trichoderma harzianum* (Rifai) COMO BIOCONTROLADOR DE
Ceratocystis fimbriata (Ellis & Halst.) EN CLONES DE *Gmelina*
arborea (Robx.)**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO FORESTAL CON
ÉNFASIS EN MANEJO Y PRODUCCIÓN FORESTAL CON EL GRADO
ACADÉMICO DE LICENCIATURA**

SEBASTIÁN JESÚS MONTOYA DÍAZ

CARTAGO, COSTA RICA
NOVIEMBRE 2024



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

***Trichoderma harzianum* (Rifai) COMO BIOCONTROLADOR DE
Ceratocystis fimbriata (Ellis & Halst.) EN CLONES DE *Gmelina*
arborea (Robx.)**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO FORESTAL CON
ÉNFASIS EN MANEJO Y PRODUCCIÓN FORESTAL CON EL GRADO
ACADÉMICO DE LICENCIATURA**

SEBASTIÁN JESÚS MONTOYA DÍAZ

**CARTAGO, COSTA RICA
NOVIEMBRE 2024**

***Trichoderma harzianum* (Rifai) COMO BIOCONTROLADOR DE *Ceratocystis fimbriata* (Ellis & Halst.) EN CLONES DE *Gmelina arborea* (Robx.)**

Sebastián Jesús Montoya Díaz*

RESUMEN

Melina es una especie forestal de importancia comercial, pero es susceptible a la enfermedad causada por *Ceratocystis fimbriata*. El uso de *Trichoderma harzianum* como biocontrolador se propone como una estrategia preventiva. El objetivo fue evaluar la efectividad de *T. harzianum* como biocontrolador en la prevención del ataque de *C. fimbriata* en clones de *G. arborea* con diferente grado de tolerancia. Se clasificó la tolerancia a *C. fimbriata* de 92 genotipos élite de melina utilizando un índice de selección agrupado en quintiles. Luego, se realizó pruebas duales en PDA que evaluó el antagonismo de tres cepas de *T. harzianum* (THB, TGA y TTG) contra una cepa de *C. fimbriata* (CIF004), se midió el crecimiento radial y se calculó el porcentaje de inhibición radial (PICR) después de cinco días. Posteriormente, en invernadero, se inocularon nueve genotipos élite con dos cepas de *T. harzianum* (THB y TGA), la cepa CIF004 y ADE por medio de la técnica de espina de pescado con suspensión de esporas a $2,5 \times 10^6$ esporas/ml y se midió la lesión interna después de 60 días. Los resultados mostraron que el 19% de los genotipos fueron tolerantes, 29% levemente susceptibles, 16% medianamente susceptibles, 22% altamente susceptibles y 14% extremadamente susceptibles. En las pruebas duales se observó diferencias el crecimiento radial de *C. fimbriata* y la cepa THB alcanzó un máximo de 34% de PICR. En invernadero, *T. harzianum* redujo hasta un 18% la lesión interna causada por *C. fimbriata*, aunque no logró detener el avance entre los genotipos más susceptibles.

Palabras clave: Enfermedad, Control biológico, Antagonismo, Patología, Silvicultura clonal.



Esta obra está bajo una licencia CC BY-NC-SA 4.0. Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

ABSTRACT

Melina is a commercially important tree species, but it is susceptible to the disease caused by *Ceratocystis fimbriata*. The use of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol is proposed as a preventive strategy. The objective was to evaluate the effectiveness of *T. harzianum* as an agent of biocontrol in preventing the disease of *C. fimbriata* in *G. arborea* clones with various levels of tolerance. The tolerance to *C. fimbriata* of 92 elite melina genotypes was classified using a selection index grouped into quintiles. Then, dual tests were performed in PDA that evaluated the antagonism of three *T. harzianum* strains (THB, TGA and TTG) against a *C. fimbriata* strain (CIF004), radial growth was measured, and the percentage of radial inhibition (PICR) was calculated after five days. In the greenhouse, nine elite genotypes were inoculated with two strains of *T. harzianum* (THB and TGA), strain CIF004 and SDW using the herringbone shape with spore suspension at $2,5 \times 10^6$ spores/ml and the internal lesion was measured after 60 days. The results showed that 19% of the genotypes were tolerant, 29% slightly susceptible, 16% moderately susceptible, 22% highly susceptible and 14% extremely susceptible. In the dual tests, differences were observed in the radial growth of *C. fimbriata*, and the THB strain reached a maximum PICR of 34%. In the greenhouse, *T. harzianum* reduced the internal lesion caused by *C. fimbriata* by up to 18%, although it was unable to stop the advance of the disease among the most susceptible genotypes.

Keywords: Disease, Biological control, Antagonism, Pathology, Clonal forestry.

*Montoya-Díaz, S. J. (2024). *Trichoderma harzianum* (Rifai) como biocontrolador de *Ceratocystis fimbriata* (Ellis & Halst.) en clones de *Gmelina arborea* (Robx.). Tesis de Licenciatura, Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

ACREDITACIÓN

CONSTANCIA DE DEFENSA PÚBLICA DE PROYECTO DE GRADUACIÓN

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

María Rodríguez Solís M.Sc.
Directora de tesis

Olman Murillo Gamboa Ph.D.
Profesor lector

Dawa Méndez Álvarez M.Sc.
Lectora

Dorian Carvajal Vanegas M.Sc.
Coordinador Trabajo Finales de
Graduación

Sebastián Jesús Montoya Díaz
Estudiante

DEDICATORIA

A Dios.

A mi familia.

A los árboles.

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me ha permitido llegar hasta aquí.

A mami, papi, Susa, Santi, Saray y Adrián por su apoyo incondicional, siempre escucharme pacientemente en mis temas, motivarme y creer en mí.

A María por su guía, paciencia con mis dudas y disposición de ayudarme en todo este trabajo.

A mis lectores Olman y Dawa por sus observaciones y aportes de valor.

A GENFORES, Olman y Yorleny por brindarme el espacio y materiales necesarios para la realización del trabajo.

A los asistentes del Laboratorio de Patología Forestal que de una u otra manera me ayudaron en diferentes etapas del trabajo.

A la Escuela de Ingeniería Forestal y sus profesores que durante estos años me transmitieron sus conocimientos.

A mis amigos Isa, Jose y Kendall por su apoyo sincero desde el inicio.

A los árboles increíbles que tuve el honor de apreciar, y a aquellos que aún me faltan por conocer, por ser los primeros en sembrar la semilla en este camino extraordinario.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT.....	ii
ACREDITACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
3.1. Procedencia del material.....	5
3.1.1. Obtención de plantas y hongos.....	5
3.2. Clasificación de tolerancia al patógeno <i>Ceratocystis fimbriata</i> en genotipos élite de <i>Gmelina arborea</i>	5
3.2.1. Bases de datos.....	5
3.2.2. Procesamiento de información.....	6
3.2.3. Análisis de información.....	7
3.3. Cultivos duales de antagonismo <i>in vitro</i>	7
3.3.1. Preparación de inóculos.....	7
3.3.2. Diseño experimental	8
3.3.3. Análisis estadístico	9
3.4. Evaluación de biocontrol de <i>Trichoderma harzianum</i> contra <i>Ceratocystis fimbriata</i>	10
3.4.1. Preparación de plantas	10
3.4.2. Preparación de inóculos.....	10

3.4.3.	Diseño experimental	11
3.4.4.	Análisis estadístico	13
4.	RESULTADOS	14
4.1.	Clasificación de tolerancia al patógeno <i>Ceratocystis fimbriata</i> en genotipos élite de <i>Gmelina arborea</i>	14
4.2.	Cultivos duales de antagonismo <i>in vitro</i>	15
4.3.	Evaluación de biocontrol de <i>Trichoderma harzianum</i> contra <i>Ceratocystis fimbriata</i>	18
5.	DISCUSIÓN	22
5.1.	Clasificación de tolerancia al patógeno <i>Ceratocystis fimbriata</i> en genotipos élite de <i>Gmelina arborea</i>	22
5.2.	Cultivos duales de antagonismo <i>in vitro</i>	24
5.3.	Evaluación de biocontrol de <i>Trichoderma harzianum</i> contra <i>Ceratocystis fimbriata</i>	25
6.	CONCLUSIONES	28
7.	RECOMENDACIONES	29
8.	REFERENCIAS	30
9.	ANEXOS	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Procedencia de los hongos de la micoteca del Laboratorio de Patología Forestal, Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. .	5
Cuadro 2. Escala de clasificación por quintiles de tolerancia a <i>Ceratocystis fimbriata</i> en genotipos de <i>Gmelina arborea</i>	7
Cuadro 3. Escala de capacidad de antagonismo del género <i>Trichoderma</i> ante hongos patógenos.	9
Cuadro 4. Clasificación de 92 genotipos de <i>Gmelina arborea</i> en relación con su tolerancia a la prueba de inoculación con <i>Ceratocystis fimbriata</i> , con base en el índice de selección, tasa de incidencia y tamaño de lesión, Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.....	14
Cuadro 5. Genotipos de <i>Gmelina arborea</i> agrupados por quintil y su clasificación de tolerancia a <i>Ceratocystis fimbriata</i>	15
Cuadro 6. Crecimiento radial promedio de <i>Ceratocystis fimbriata</i> y porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) en pruebas duales de antagonismo en presencia de cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> , Cartago, Costa Rica.	15
Cuadro 7. Promedio de diámetro, altura total, tamaño de lesión e índice de selección por inoculación de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en nueve genotipos de <i>Gmelina arborea</i> evaluados en invernadero a los 60 días, Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.	18
Cuadro 8. Efecto de la inoculación previa con <i>Trichoderma harzianum</i> en genotipos de melina en la severidad de la lesión interna a los 60 días provocada con la inoculación de <i>Ceratocystis fimbriata</i> , Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pruebas duales de antagonismo entre aislados de <i>Trichoderma harzianum</i> versus <i>Ceratocystis fimbriata</i>	8
Figura 2. Diseño factorial para el ensayo de biocontrol (4 tratamientos) contra <i>Ceratocystis fimbriata</i> en nueve genotipos de melina, invernadero de patología forestal en Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.....	11
Figura 3. Metodología de inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Ceratocystis fimbriata</i> mediante herida en forma de espina de pescado y aplicación con micropipeta.....	12
Figura 4. Tasa de inhibición del crecimiento radial de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en cultivo dual con cepas de <i>Trichoderma harzianum</i>	16
Figura 5. Prueba dual de antagonismo de <i>Trichoderma harzianum</i> (lado izquierdo de cada placa de Petri) contra <i>Ceratocystis fimbriata</i> (lado derecho en cada placa de Petri): A) cepa <i>Hevea brasiliensis</i> , B) cepa <i>Gmelina arborea</i> y C) cepa <i>Tectona grandis</i>	17
Figura 6. Severidad de lesión de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en nueve genotipos de <i>Gmelina arborea</i> , basado en el análisis de lesión interna a los 60 días. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)......	20
Figura 7. Severidad de lesión de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en cuatro tratamientos, basado en el análisis de lesión interna a los 60 días. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)......	21
Figura 8. Reaislamientos con presencia de <i>Trichoderma harzianum</i> . Placa de Petri: izquierda cepa <i>Hevea brasiliensis</i> , derecha cepa <i>Gmelina arborea</i>	21

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Clasificación por quintiles de susceptibilidad para clones de <i>Gmelina arborea</i>	37
Anexo 2. Reaislamiento de cepas A) THB y B) TGA de <i>Trichoderma harzianum</i> de los nueve genotipos de <i>Gmelina arborea</i>	40

1. INTRODUCCIÓN

Melina (*Gmelina arborea* Roxb.) es una especie arbórea de la familia Lamiaceae nativa del sureste asiático. Se considera una especie de rápido crecimiento, caracterizada por adaptarse a variedad de sitios, así como por su facilidad de propagación. Esto ha permitido la introducción con fines comerciales en países tropicales y subtropicales alrededor del mundo. A nivel del trópico latinoamericano se ha establecido como una de las principales fuentes forestales y ha propiciado la reforestación a gran escala en países como Ecuador, Brasil, México, Guatemala y Costa Rica [1], [2], [3], [4], [5], [6].

En Costa Rica, la melina se introdujo en 1966 en la región Caribe y desde entonces se ha utilizado como una de las principales para la reforestación comercial [7]. Fue la especie más cultivada en el período que va de 1980 hasta principios de 2000 y se estableció en zonas como Guanacaste, Pacífico Central y Sur, Zona Norte y el Caribe. Este proceso de establecimiento de plantaciones comerciales de melina dio paso a la creación de programas de mejoramiento genético [3], [8].

Los programas de mejoramiento genético han trascendido a escala comercial utilizando clones de alto rendimiento que han logrado un aumento significativo en sus variables productivas. Sin embargo, la aparición de plagas y enfermedades pusieron en riesgo las plantaciones comerciales y obligaron la inclusión de la resistencia genética a enfermedades dentro de los programas de mejoramiento forestal [9], [10], [11], [12], [13].

Para Costa Rica, y hasta el 2008, Arguedas [14] reportó 37 plagas y enfermedades para esta especie distribuidos en 43% insectos, 35% patógenos y 22% vertebrados. Los patógenos afectan semillas, raíces, plántulas, xilema y follaje [9], [14], [15]. Durante años se tuvo la percepción de que la enfermedad de la marchitez de la melina era causada por el hongo *Nectria* sp., y que se asociaba a problemas silviculturales como alta densidad de plantación y problemas de suelos [16], [17], [18]. Sin embargo, luego se determinó que el agente causal de la enfermedad era el hongo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst. [10].

C. fimbriata es ampliamente distribuido y se ha registrado que afecta hasta 31 especies de 14 familias distintas, incluyendo melina [12]. El hongo muestra especialización dentro su rango local de distribución, es decir, diferentes genotipos del hongo se desarrollan y afectan a su hospedero en un área geográfica delimitada. Lo cual introduce la variación genética del patógeno dentro del esquema de búsqueda de soluciones de prevención y manejo de la enfermedad. Taxonómicamente se ha determinado por medio de análisis de agrupamiento genético, en al menos tres grandes clados en Norteamérica, Latinoamérica y Asia [19], [20].

El mecanismo de ingreso de *C. fimbriata* a los árboles se estima que ocurre normalmente por heridas, posiblemente a nivel de raíz o fuste y se moviliza a través del sistema vascular. Presenta presumiblemente varios medios de dispersión como el agua o viento, daños mecánicos ocasionados con herramientas de poda o también movilizado por insectos vectores, atraídos por aromas frutales que emana el hongo [21], [22], [23], [24], [25]. La sintomatología observable corresponde a marchitamiento y pérdida de turgencia de las hojas, caída de follaje, clorosis, hundimiento de tejido (cancros) y exudaciones, necrosis del tejido vascular, rebrotes epicórmicos, hasta el secado del árbol. A nivel interno se da una obstrucción del sistema vascular y la lesión se extiende a lo largo del fuste ocasionando la muerte [10], [11], [20], [22], [26].

La melina ha demostrado ser muy susceptible a la enfermedad causada por *C. fimbriata*, lo que ha puesto en riesgo la sostenibilidad de la industria forestal nacional y regional. La muerte de la melina en plantaciones comerciales puede alcanzar hasta 40% y existen reportes que los primeros síntomas de la enfermedad han aparecido en plantaciones jóvenes de tan solo siete meses de edad. Los árboles de menor clase diamétrica y en posición sociológica de suprimido o intermedio, tienden a mostrar mayor grado de incidencia y severidad a la enfermedad [10], [18], [27]. Dado este patrón de susceptibilidad, el manejo integrado cobra relevancia al facilitar diagnósticos y estrategias de prevención y control adecuados.

El manejo integrado de plagas y enfermedades empieza con el correcto y oportuno diagnóstico de los organismos que afectan los cultivos, con el fin de tomar decisiones de manejo incluyendo diferentes áreas que garanticen el control y la prevención a largo plazo de la ocurrencia de plagas y enfermedades en el cultivo. Entre las técnicas de manejo más comunes están el control fitogenético, cultural, biológico, etológico, físico, legal y químico [28], [29].

En caso de *C. fimbriata*, el manejo integrado de la enfermedad se debe priorizar con el uso de material genético que haya sido determinado como tolerante o resistente. También se debe procurar el buen manejo silvicultural de las plantaciones que incluye preparación de suelo, control de malezas, planificación de poda en épocas de menor temperatura y apoyarse también con controladores biológicos [22], [27].

El control biológico se visualiza como una alternativa de bajo costo y de menor impacto ambiental, además de tener un efecto duradero y amigable con la salud humana. Un agente biocontrolador debe ser capaz de inhibir patógenos bajo diferentes condiciones ambientales con el objetivo de reducir la población patogénica. Entre los mecanismos de acción se encuentran la antibiosis, competencia por espacio o nutrientes, interacción directa con el patógeno e inducción a la resistencia [30], [31], [32], [33], [34], [35].

Existen organismos que cumplen la función de controlador biológico, entre ellos los hongos del género *Trichoderma*, caracterizados por su versatilidad y adaptabilidad en el combate biológico de enfermedades. Fue aislado del suelo por primera vez en 1794 en Alemania, pero fue hasta 1932 que se reportó como un agente con capacidad de biocontrol. Se encuentra tanto en el suelo como de manera endófito en las plantas, además presenta tres tipos de estructuras activas (hifas, clamidosporas y conidios) que son efectivas contra los patógenos por su rápida acción de parasitismo o competencia por espacio y nutrientes [32], [33], [34], [36], [37].

Trichoderma harzianum Rifai es la especie antagonista con mayor estudio y uso comercial para el biocontrol de patógenos. Actúa como un fungicida natural y favorece a la planta en crecimiento radicular y aéreo [38], [39]. Ha sido utilizada contra patógenos como *Alternaria porri*, *A. solani*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Verticillium* spp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. circinatum*, *C. paradoxa*, incluido el patógeno causante de la marchitez de la melina, *C. fimbriata* [39], [40], [41], [42], [43]. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar la efectividad de *Trichoderma harzianum* como biocontrolador en la prevención del ataque de *Ceratocystis fimbriata* en clones de *Gmelina arborea* con diferente grado de tolerancia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la efectividad de *Trichoderma harzianum* como biocontrolador en la prevención del ataque de *Ceratocystis fimbriata* en clones de *Gmelina arborea* con diferente grado de tolerancia.

2.2. Objetivos específicos

- a. Clasificar el grado de tolerancia de 92 genotipos élite de *Gmelina arborea* inoculados con *Ceratocystis fimbriata* pertenecientes al programa de mejoramiento genético de GENFORES.
- b. Analizar en laboratorio el antagonismo de tres cepas de *Trichoderma harzianum* contra la cepa CIF004 de *Ceratocystis fimbriata* mediante pruebas duales *in vitro*.
- c. Determinar a nivel de invernadero el efecto de biocontrol preventivo de *Trichoderma harzianum* contra la enfermedad causada por *Ceratocystis fimbriata* en genotipos de *Gmelina arborea*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Procedencia del material

3.1.1. Obtención de plantas y hongos

Las plantas utilizadas se obtuvieron de la colección genética clonal de melina, perteneciente a la Cooperativa Internacional de Mejoramiento Genético Forestal (GENFORES) ubicado en el Campus Tecnológico Local San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Los hongos fueron obtenidos de la micoteca del Laboratorio de Patología Forestal de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Se utilizó la cepa CIF004 de *Ceratocystis fimbriata* y las cepas TGA, TTG y THB de *Trichoderma harzianum* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Procedencia de los hongos de la micoteca del Laboratorio de Patología Forestal, Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

Cepa	Hospedero forestal	Lugar de procedencia
CIF004	<i>Gmelina arborea</i>	Pital, San Carlos
TGA	<i>Gmelina arborea</i>	Pital, San Carlos
TTG	<i>Tectona grandis</i>	Abangares, Guanacaste
THB	<i>Hevea brasiliensis</i>	Pococí, Limón

3.2. Clasificación de tolerancia al patógeno *Ceratocystis fimbriata* en genotipos élite de *Gmelina arborea*

3.2.1. Bases de datos

Se recopiló y unificó las bases de datos de los ensayos de resistencia genética de 92 genotipos élite de *G. arborea* contra *C. fimbriata* y que se generaron en el proyecto de investigación “Desarrollo de un programa de mejoramiento genético contra enfermedades en teca (*Tectona grandis* L.) y melina (*Gmelina arborea* Robx.). Fase II. Selección y reproducción comercial de genotipos” de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, periodo 2023-2024.

Las bases de datos fueron creadas a partir de tres ensayos de evaluación en la población de genotipos élite de melina, en un ambiente controlado (invernadero) creado para tales fines, en las instalaciones de producción clonal de GENFORES en Santa Clara, San Carlos. Cada genotipo estuvo representado por nueve rametos y un testigo (no inoculado), que se inocularon mediante el protocolo establecido por el programa de resistencia genética a la enfermedad [12]. Las plantas se evaluaron durante 90 días a partir de los síntomas visibles de la enfermedad.

3.2.2. Procesamiento de información

La base de datos incluyó las variables diámetro en la base de la planta (mm), altura total (cm), incidencia, mortalidad y tamaño de lesión (cm) provocada por la infección con *C. fimbriata*. Con el fin de obtener una única variable de clasificación, se construyó un índice de selección como una variable compuesta utilizando las variables incidencia visual y tamaño de lesión interna (Ecuación 1). La incidencia consideró un peso de 30% y la lesión interna un peso de 70% en la escala.

$$IS = \left\{ \left[\left(\frac{\%Incidencia - \bar{x}}{s} \right) * 0,3 \right] + \left[\left(\frac{Lesión - \bar{x}}{s} \right) * 0,7 \right] \right\} + \alpha \quad (1)$$

Donde, IS: índice de selección, \bar{x} : promedio de la variable, s : desviación estándar de la variable, α : valor constante para garantizar valores positivos.

Con base en este índice de selección se estableció una escala en quintiles para clasificar los genotipos en relación con su grado de tolerancia al patógeno (Cuadro 2) con el propósito de agrupar los genotipos con comportamiento similar.

Cuadro 2. Escala de clasificación por quintiles de tolerancia a *Ceratocystis fimbriata* en genotipos de *Gmelina arborea*.

Quintil	Clasificación
I	Tolerante
II	Levemente susceptible
III	Medianamente susceptible
IV	Altamente susceptible
V	Extremadamente susceptible

3.2.3. Análisis de información

La base de datos se procesó en hojas electrónicas en el programa Microsoft Excel versión Office 365. Se ordenó de menor a mayor por índice de selección. Con la base de datos ordenada se procedió a seccionar en quintiles al restar el número más grande con el número más pequeño y dividido entre cinco para determinar los intervalos de cada quintil.

3.3. Cultivos duales de antagonismo *in vitro*

3.3.1. Preparación de inóculos

El ensayo dual se realizó en el Laboratorio de Patología Forestal de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica en Cartago, Costa Rica. Se activó los aislados de los hongos en placas de Petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo PDA (por sus siglas en inglés, Potato Dextrosa Agar) donde se colocó un disco de micelio conservado al centro de cada placa para reactivar el crecimiento de las cepas, tanto de *T. harzianum* como *C. fimbriata*. Posteriormente se repicaron en PDA (39 g/l) con penicilina (0,2 g/l), estreptomycin (0,2 g/l) y tiamina (0,2 g/l). Se incubó los aislados de *T. harzianum* durante siete días y *C. fimbriata* durante 15 días a una temperatura de 28 ± 2 °C.

3.3.2. Diseño experimental

El ensayo dual se realizó con los hongos previamente incubados. El diseño experimental se estableció como un diseño completamente aleatorio (DCA) con cuatro tratamientos (tres cepas de *T. harzianum* y una cepa de *C. fimbriata*) y ocho repeticiones (Figura 1). Los tratamientos fueron TGA + CIF004, TTG + CIF004, THB + CIF004 y CIF004 como control, donde CIF004 corresponde a la cepa del patógeno *C. fimbriata*.

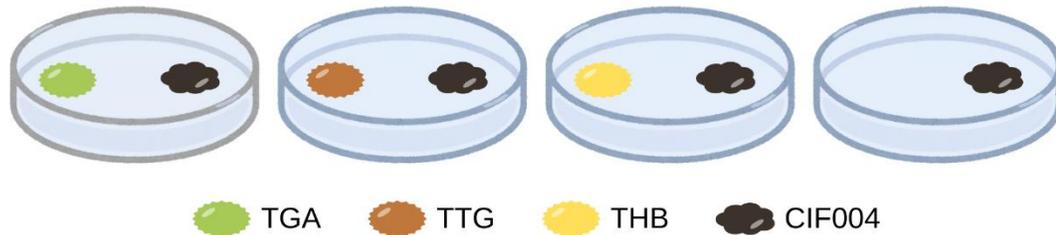


Figura 1. Pruebas duales de antagonismo entre aislados de *Trichoderma harzianum* contra *Ceratocystis fimbriata*.

En cada placa de Petri con PDA, se colocó un disco de 6 mm del aislado de *T. harzianum* a 1 cm del borde y el aislado de *C. fimbriata* se ubicó con una separación de 7 cm. Esta prueba se repitió dos veces; en la primera repetición se colocó *C. fimbriata* y *T. harzianum* al mismo momento. En la segunda repetición se colocó *C. fimbriata* tres días antes que *T. harzianum* en las placas correspondientes como sugiere Aswini *et al.* [44] para hongos de lento crecimiento. Se dejó los ensayos creciendo durante cinco días donde se le midió diariamente el crecimiento radial a *C. fimbriata* en milímetros con una regla desde el borde de cada disco hacia el centro de la placa con el propósito de determinar la efectividad de acción.

El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) y la capacidad antagonística de cada cepa de *T. harzianum* se evaluó mediante el procedimiento empleado por Rivera-Méndez *et al.* [45] como se muestra en la Ecuación 2.

$$PICR = \frac{C - T}{C} \times 100 \quad (2)$$

Donde, PICR: porcentaje de inhibición de crecimiento radial, C: crecimiento radial del patógeno en la placa control, en milímetros, T: crecimiento radial del patógeno en la placa dual, en milímetros.

La clasificación de las cepas se realizó siguiendo la capacidad de antagonismo propuesta por Bell [46] y se modificó con el potencial biocontrolador (Cuadro 3).

Cuadro 3. Escala de capacidad de antagonismo del género *Trichoderma* ante hongos patógenos.

Clase	Descripción	Potencial de biocontrol
1	<i>Trichoderma</i> creció completamente sobre el patógeno y se extendió por toda la superficie del medio, se observó presencia de esporulación	Muy alto
2	<i>Trichoderma</i> cubrió al menos dos tercios de la superficie del medio	Alto
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizaron aproximadamente la mitad de la superficie del medio, sin evidencia de dominio de ninguno sobre el otro	Neutral
4	El patógeno colonizó al menos dos tercios de la superficie del medio y resiste el avance en crecimiento de <i>Trichoderma</i>	Bajo
5	El patógeno creció completamente sobre <i>Trichoderma</i> y cubrió toda la superficie del medio	Muy bajo

Fuente: [46].

3.3.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para el crecimiento radial con una confiabilidad de 95%, de previo se aplicó la prueba de normalidad Shapiro Wilk y la prueba de homocedasticidad de Levene de homogeneidad de varianzas. Luego se realizó la prueba de Tukey para determinar si hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Los datos se analizaron utilizando un diseño completo al azar (Modelo A) mediante el software estadístico InfoStat versión 2020.

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad (\text{A})$$

Donde y_{ij} : repuesta de la variable observada en la j -ésima unidad experimental del i -ésimo tratamiento, μ : media general de los tratamientos, τ_i : efecto del i -ésimo tratamiento, ε_{ij} : error experimental.

3.4. Evaluación de biocontrol de *Trichoderma harzianum* contra *Ceratocystis fimbriata*

3.4.1. Preparación de plantas

El ensayo *in vivo* se realizó en el invernadero de resistencia de enfermedades de GENFORES en Santa Clara (10° 22' 3,15'' Norte y 84° 30' 45,95'' Oeste) a una altitud de 170 msnm. El sitio presenta una temperatura promedio de 25,7 °C y precipitación de 3371 mm anuales [43].

Se seleccionaron nueve genotipos élite de melina (1, 5, 51, 20, 58, 63, 15N, 32PC y 16PZ) con diferente grado de tolerancia previamente determinada según las categorías establecidas en el Cuadro 2. Las plantas se produjeron en maceteros #400 utilizando turba TS1 como sustrato, se aplicó fertilizante al momento del trasplante y antes de iniciar el ensayo. Al momento del ensayo en el invernadero, las plantas tenían aproximadamente cuatro meses de edad, al menos 1 cm de diámetro y alturas homogenizadas con poda para garantizar las mismas condiciones.

3.4.2. Preparación de inóculos

Se seleccionaron las cepas THB y TGA de *T. harzianum* resultantes de las pruebas de antagonismo. La preparación del material de *T. harzianum* y *C. fimbriata* se realizó mediante suspensión de esporas siguiendo el procedimiento descrito por Méndez-Álvarez *et al.* [12]. Se cuantificó la cantidad de esporas con ayuda de una cámara de Neubauer y se diluyó a una concentración de $2,5 \times 10^6$ esporas/ml.

3.4.3. Diseño experimental

El diseño experimental se estableció como un arreglo factorial 9 x 4 tratamientos, donde se utilizó nueve genotipos vs. cuatro inóculos (dos cepas de *T. harzianum*, una cepa de *C. fimbriata* y el control). La unidad experimental consistió en una planta por genotipo en cada tratamiento, con lo cual se obtuvo diez repeticiones (Figura 2). Cada genotipo correspondió al factor A y el inóculo como factor B, los cuales fueron b1) cepa THB + CIF004, b2) cepa TGA + CIF004, b3) solamente la cepa CIF004 y B4) el control con agua destilada estéril (ADE).

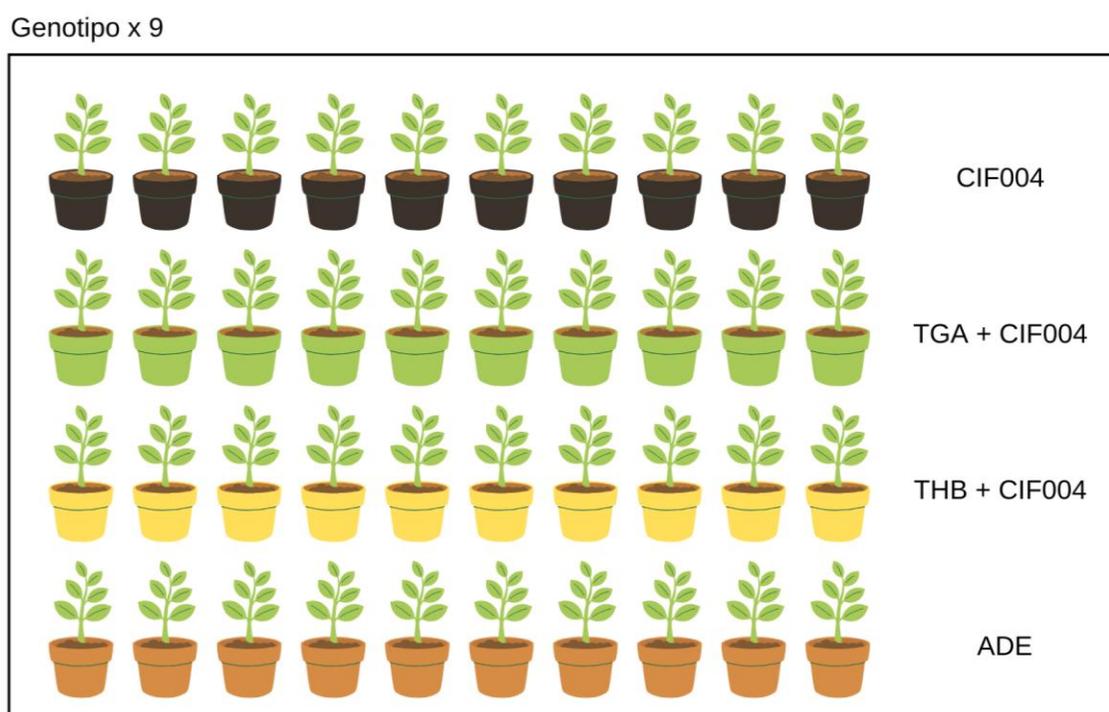


Figura 2. Diseño factorial para el ensayo de biocontrol (4 tratamientos) contra *Ceratocystis fimbriata* en nueve genotipos de melina, invernadero de patología forestal en Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.

La inoculación de *T. harzianum* y *C. fimbriata* se realizó siguiendo la metodología aplicada por Méndez-Álvarez *et al.* [12] adaptada para cada hongo y considerando el tiempo de inoculación del biocontrolador [47]. Se hizo una herida aproximada de 2,0 cm en forma de espina de pescado con un bisturí estéril y a 10 cm de la base de la planta (Figura 3). Se aplicó con micropipeta 500 μ l de la suspensión de esporas de las cepas de *T. harzianum* con una concentración de $2,5 \times 10^6$ esporas/ml. La herida se cubrió con algodón, plástico adhesivo y ADE para favorecer un ambiente de humedad. Una semana después en la misma herida, se aplicó con micropipeta 150 μ l de la suspensión de esporas de CIF004 en una concentración de $2,5 \times 10^6$ esporas/ml. Las plantas control se inocularon con ADE.

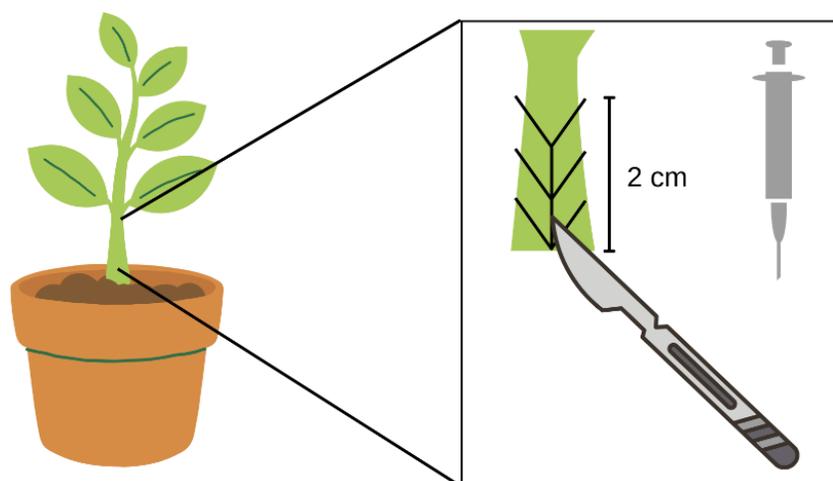


Figura 3. Metodología de inoculación de *Trichoderma harzianum* y *Ceratocystis fimbriata* mediante herida en forma de espina de pescado y aplicación con micropipeta.

Cada 15 días se midió el progreso de la lesión hasta cumplir con una duración total de 60 días. Al finalizar este periodo, se realizó la destrucción de los árboles para medir la lesión en ambas direcciones desde el punto de inoculación [48] y se calculó la severidad de la lesión por medio de porcentaje utilizando la Ecuación 3 propuesta por Oliveira [49].

$$SL\% = \frac{TL}{H} * 100 \quad (3)$$

Donde, SL%: severidad de lesión, TL: tamaño de la lesión, en centímetros, H: altura total del árbol, en centímetros.

Posteriormente, para completar los postulados de Koch, se cortaron pequeños trozos de la planta de cada genotipo y se incubaron en placas de Petri con PDA para el reaislamiento de los hongos inoculados.

3.4.4. Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro Wilk a los datos de severidad de lesión. Los datos presentaron una distribución no normal, por lo que se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con comparación a pares con una confiabilidad de 95%. Los datos se analizaron utilizando un diseño completamente al azar con un arreglo factorial (Modelo B) mediante el software estadístico InfoStat versión 2020.

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \rho_j + (\tau\rho)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (B)$$

Donde y_{ijk} : repuesta de la variable observada en el j-ésimo nivel de A, el i-ésimo nivel B y la repetición k-ésima, μ : media general, τ_i : efecto del i-ésimo nivel del factor A, ρ_j : efecto del j-ésimo nivel del factor B, $(\tau\rho)_{ij}$: interacción del i-ésimo nivel del factor A con el j-ésimo nivel del factor B en su repetición k, ε_{ijk} : error experimental.

4. RESULTADOS

4.1. Clasificación de tolerancia al patógeno *Ceratocystis fimbriata* en genotipos élite de *Gmelina arborea*

El índice de selección de la tolerancia de una población de 92 genotipos melina resultó con un intervalo de valores desde 0,06 hasta 2,77. Del total de la población, 17 (19%) se clasificaron como tolerantes dentro del quintil I con valores promedio de incidencia de 14,76% y tamaño de lesión de 7,69 cm. Los genotipos con susceptibilidad intermedia se ubicaron en los quintiles II y III con 27 (29%) y 15 (16%) genotipos, respectivamente. Mientras que 20 (22%) se ubicaron como altamente susceptibles y 13 (14%) como extremadamente susceptibles que suman juntos 33 (36%) y se ubicaron en los quintiles IV y V, respectivamente con valores promedio de 97,69% de incidencia y tamaño de lesión de 115,21 cm (Cuadro 4). Anexo 1.

Cuadro 4. Clasificación de 92 genotipos de *Gmelina arborea* en relación con su tolerancia a la prueba de inoculación con *Ceratocystis fimbriata*, con base en el índice de selección, tasa de incidencia y tamaño de lesión, Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.

Quintil	Cantidad de genotipos	Índice de selección	Incidencia (%)	Lesión (cm)
I	17	0,06 - 0,53	14,76	7,69
II	27	0,54 - 1,07	87,56	17,46
III	15	1,08 - 1,62	91,78	44,01
IV	20	1,63 - 2,16	94,12	74,02
V	13	2,17 - 2,77	97,69	115,21

Entre los genotipos tolerantes ubicados en el quintil I, se observó nueve genotipos destacados con respecto a la incidencia de la enfermedad con valores nulos de incidencia y un valor promedio de lesión de 7,10 cm. Los mejores genotipos de este primer grupo fueron 1, 43, 46, 27, 5, 51, 16, 12 y 47. Mientras en el otro extremo de la clasificación, genotipos extremadamente susceptibles fueron 3PZ, 4 PZ, 6, 56, 32, 38, 13, 40, 44, 26, 15N, 29 y 30 ubicados dentro el quintil V, que registraron lesiones muy extensas y alta incidencia al patógeno *C. fimbriata* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Genotipos de *Gmelina arborea* agrupados por quintil y su clasificación de tolerancia a *Ceratocystis fimbriata*.

Quintil	Clasificación	Genotipos
I	Tolerante	1, 43, 46, 27, 5, 51, 16, 24, 12, 7, 22, 15, 47, 11, 28, 21, 8
II	Levemente susceptible	1N, 19PZ, 58, 45, 8PZ, 4, 26PZ, 63, 2, 57, 19, 17, 20CA, 60, 24PZ, 19CA, 20PZ, 34, 14PZ, 28PZ, 37, 35PC, 21PZ, 13PZ, 61, 23PZ, 35
III	Medianamente susceptible	1PZ, 15PZ, 10PZ, 55, 11PZ, 24CA, 22PZ, 16PZ, 5N, 25, 33PC, 7VPZ, 26PC, 27PZ, 12PC
IV	Altamente susceptible	49, 100, 18PC, 25PZ, 20, 32PC, 9, 48, 54, 39, 5PZ, 62, 7PZ, T, 4CA, 14, 42, 41, 33, 59
V	Extremadamente susceptible	3PZ, 4PZ, 6, 56, 32, 38, 13, 40, 44, 26, 15N, 29, 30

4.2. Cultivos duales de antagonismo *in vitro*

Las cepas de *T. harzianum* THB y TGA (aislados de *H. brasiliensis* y *G. arborea*, respectivamente) mostraron el mejor porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) contra *C. fimbriata*. A los cinco días, la cepa THB mostró la mayor inhibición con un promedio un 33,7% para la repetición uno y 18,8% en el segundo ensayo. Luego se ubicó la cepa TGA y la que mostró menor PICR fue la cepa TTG (aislada de *T. grandis*) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Crecimiento radial promedio de *Ceratocystis fimbriata* y porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) en pruebas duales de antagonismo en presencia de cepas de *Trichoderma harzianum*, Cartago, Costa Rica.

Cepa	Repetición 1		Repetición 2	
	Promedio crecimiento radial (mm)	PICR (%)	Promedio crecimiento radial (mm)	PICR (%)
THB	8,6	33,7	14,7	18,8
TGA	9,0	30,8	15,7	13,3
TTG	9,7	25,5	15,9	11,9
CIF004	13,0	-	18,1	-

Durante la incubación, *T. harzianum* colonizó rápidamente la placa de Petri alcanzando el área de crecimiento de *C. fimbriata* al cuarto día en promedio para las tres cepas. En cuanto al crecimiento radial se determinó significativamente ($p < 0,05$) la inhibición del crecimiento radial de *C. fimbriata* en presencia de *T. harzianum* a los cinco días, pero no hubo diferencias entre cepas de *T. harzianum* en la primera repetición. En la segunda prueba resultó diferencias entre las distintas cepas, además de *C. fimbriata*. En ambas repeticiones THB fue la cepa que registró la mayor tasa de inhibición del crecimiento de *C. fimbriata* (Figura 4).

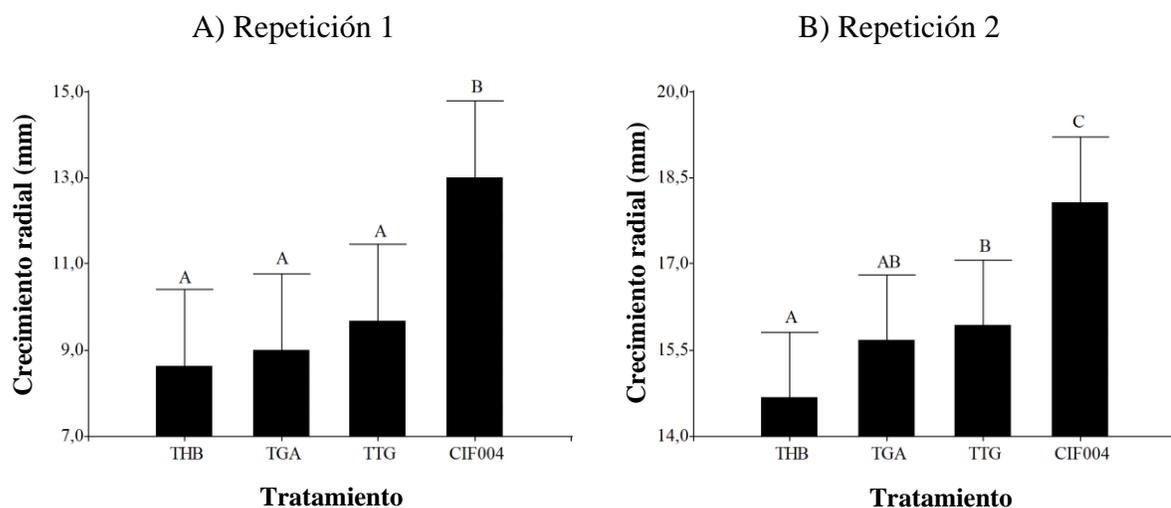


Figura 4. Tasa de inhibición del crecimiento radial de *Ceratocystis fimbriata* en cultivo dual con cepas de *Trichoderma harzianum*.

Las tres cepas de *T. harzianum* mostraron una capacidad de antagonismo de “Clase 1” con potencial biocontrolador “Muy Alto” basado en el Cuadro 3 contra el hongo patógeno *C. fimbriata* (Figura 5).

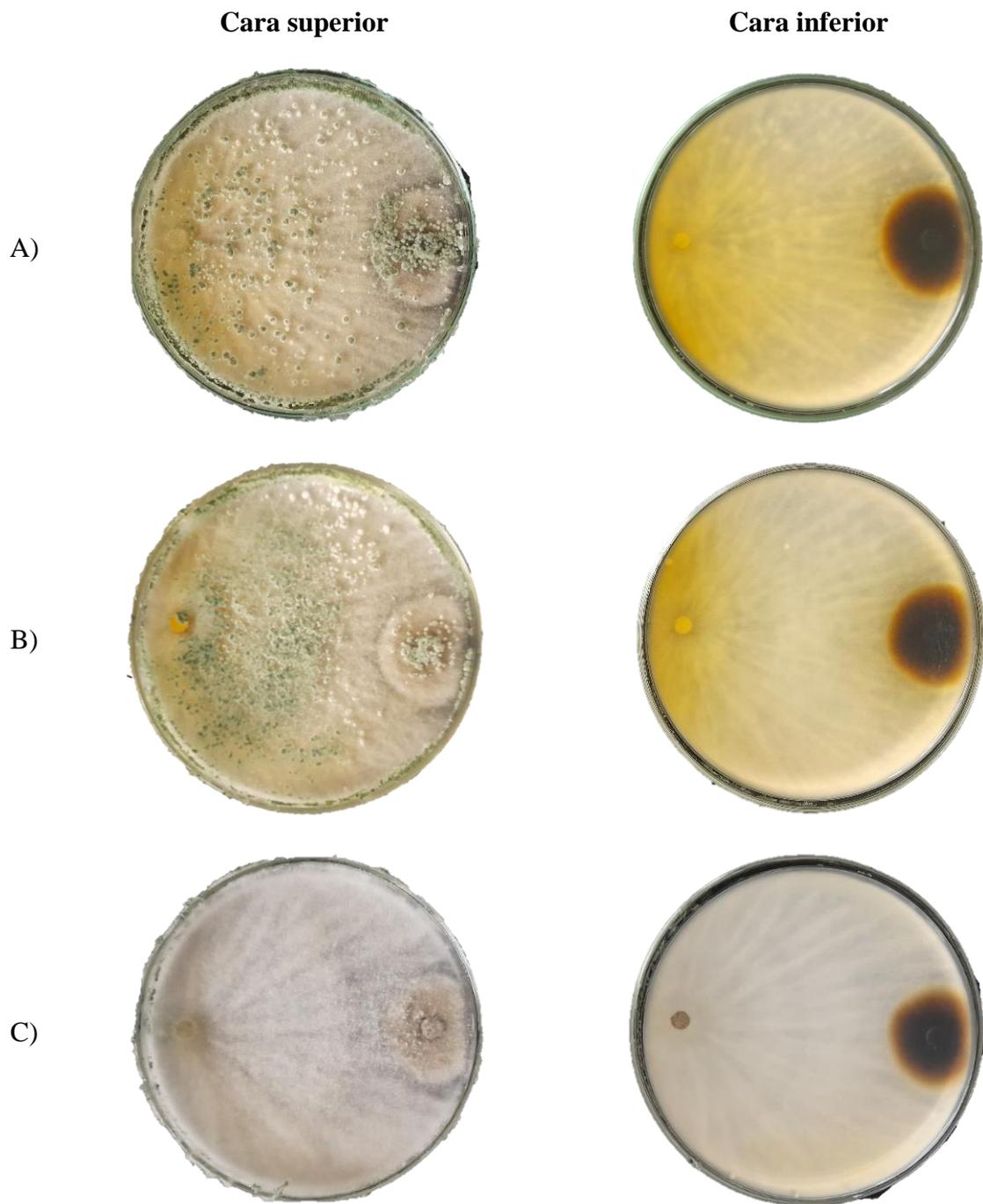


Figura 5. Prueba dual de antagonismo de *Trichoderma harzianum* (lado izquierdo de cada placa de Petri) contra *Ceratocystis fimbriata* (lado derecho en cada placa de Petri): A) cepa *Hevea brasiliensis*, B) cepa *Gmelina arborea* y C) cepa *Tectona grandis*.

4.3. Evaluación de biocontrol de *Trichoderma harzianum* contra *Ceratocystis fimbriata*

A los 60 días de evaluación se observó que en promedio el diámetro varía entre 11,95 y 16,75 mm, la altura total varía entre 106,32 y 156,71 cm y la lesión interna varía entre 7,24 y 58,11 cm (Cuadro 7).

Cuadro 7. Promedio de diámetro, altura total, tamaño de lesión e índice de selección por inoculación de *Ceratocystis fimbriata* en nueve genotipos de *Gmelina arborea* evaluados en invernadero a los 60 días, Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.

Genotipo	Diámetro (mm)	Altura planta (cm)	Lesión (cm)	Índice de selección
1	14,50	148,08	7,24	0,06
5	14,17	156,71	7,84	0,08
51	14,95	147,37	6,34	0,11
58	14,65	141,16	24,41	0,69
20	16,65	136,71	30,50	1,71
63	13,35	123,33	47,38	0,83
32PC	17,26	128,46	51,11	1,72
16PZ	11,95	106,92	53,16	1,32
15N	16,78	139,90	58,11	2,68

Las plantas control tratadas con agua destilada estéril no mostraron en ningún momento presencia de síntomas ni lesión más allá de la ocasionada con la herida de bisturí. En las plantas tratadas solo con *C. fimbriata* se observó una rápida aparición de síntomas como marchitez, pérdida de turgencia y clorosis de las hojas a los 30 días después de la inoculación del patógeno, más evidente en los genotipos clasificados como susceptibles. En cuanto a las plantas tratadas con ambas cepas de *T. harzianum* se evidenció la presencia de síntomas 45 días después de la inoculación principalmente en los genotipos más susceptibles. Mientras que en los genotipos clasificados como tolerantes no se observó presencia de síntomas o en muy pocas plantas.

A los 60 días se registraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la interacción genotipo x tratamiento, lo que muestra que la efectividad de la interacción varía entre genotipos y tratamientos (Cuadro 8). Los genotipos con el tratamiento ADE se mostraron saludables durante todo el ensayo con un registro de severidad de lesión relativamente bajo o casi nulo entre 1,49% hasta 2,27%. Los genotipos 1 y 5 exhibieron una severidad de lesión baja en el tratamiento con la cepa de *C. fimbriata*, lo que resultó en que son tolerantes a la enfermedad.

Por otro lado, los genotipos 58, 63, 20, 32PC, 16PZ y 15N mostraron una severidad mayor al 40%, pero únicamente bajo *C. fimbriata*, donde el valor mayor se registró en el genotipo 16PZ con 90,76%. La respuesta de ambas cepas de *T. harzianum* fue variable entre genotipos donde la cepa THB permitió la menor severidad de lesión promedio en los genotipos 1, 63, 20, 16PZ y 15N. Mientras que la cepa TGA permitió la menor severidad de lesión promedio en los genotipos 5, 51, 58 y 32PC. Estos resultados no necesariamente registraron diferencias significativas en todos los casos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de la inoculación previa con *Trichoderma harzianum* en genotipos de melina en la severidad de la lesión interna a los 60 días provocada con la inoculación de *Ceratocystis fimbriata*, Santa Clara, San Carlos, Costa Rica.

Genotipo	Tratamientos				Promedio
	ADE	THB + CIF004	TGA + CIF004	CIF004	
1	1,71	4,26	13,00	6,85	6,46^{AB}
5	1,53	12,32	2,15	8,38	6,10^A
51	2,27	2,32	2,30	26,55	8,36^A
58	1,86	21,73	7,02	43,87	18,62^{AB}
63	2,24	48,11	58,71	54,06	40,78^{CD}
20	1,49	17,00	17,49	57,73	23,43^{BC}
15N	2,27	50,18	58,18	58,75	42,35^D
32PC	1,65	53,69	29,18	79,04	40,89^{CD}
16PZ	2,16	56,57	80,28	90,76	57,44^D
Promedio	1,91^A	29,58^B	29,81^B	47,33^C	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

A nivel de genotipos, el 1, 5 y 51 mostraron el nivel de severidad de lesión más bajo, sin diferencias estadísticamente significativas. Mientras que en el otro extremo, los genotipos 63, 32PC, 15N y 16PZ exhibieron la mayor severidad de la lesión en general a pesar de haber sido inoculados con dos cepas de *T. harzianum* (Cuadro 8, Figura 6).

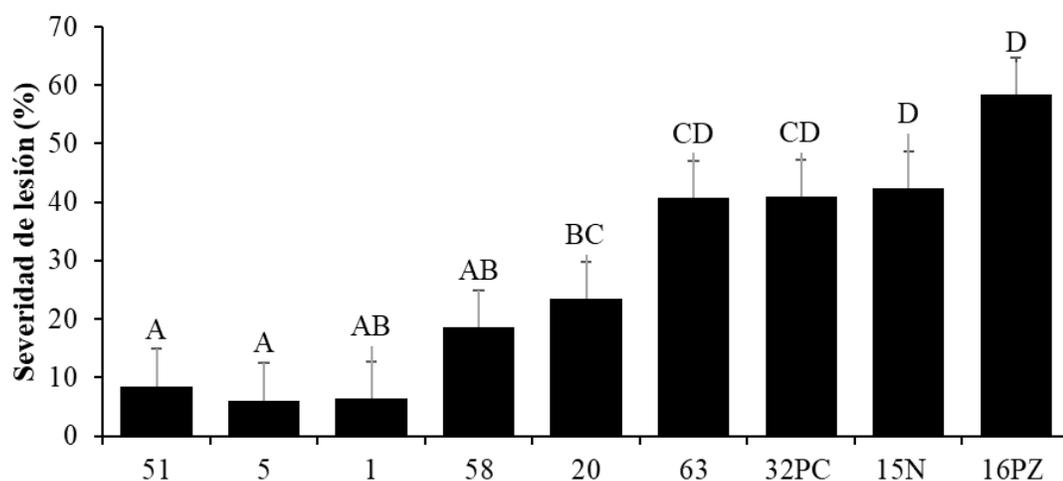


Figura 6. Severidad de lesión de *Ceratocystis fimbriata* en nueve genotipos de *Gmelina arborea*, basado en el análisis de lesión interna a los 60 días. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En cuanto a la severidad de lesión por tratamiento a los 60 días, las plantas tratadas con *T. harzianum* mostraron una disminución de hasta 18% en promedio, en comparación con las plantas tratadas únicamente con *C. fimbriata*. Sin embargo, igualmente se evidenció visualmente presencia de síntomas de la enfermedad mayoritariamente en los genotipos con algún grado de susceptibilidad como 63, 32PC, 15N y 16PZ. Hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos donde *T. harzianum* logró reducir la severidad de la lesión, pero sin diferencias significativas entre cepas de *T. harzianum* en comparación con solamente *C. fimbriata* (Cuadro 8, Figura 7).

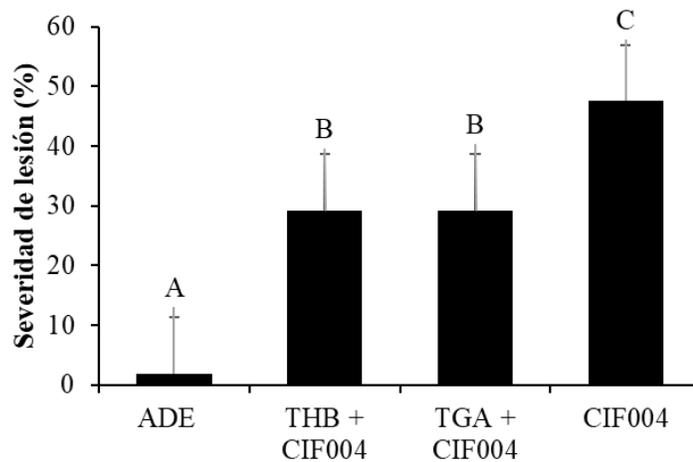


Figura 7. Severidad de lesión de *Ceratocystis fimbriata* en cuatro tratamientos, basado en el análisis de lesión interna a los 60 días. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

De los reislamientos de las plantas, se recuperaron colonias de *T. harzianum* y *C. fimbriata* cumpliendo con los postulados de Koch (Anexo 2). En caso de *T. harzianum* se observó la coloración característica verde amarilla del hongo (Figura 8).



Figura 8. Reislamientos con presencia de *Trichoderma harzianum*. Placa de Petri: izquierda cepa *Hevea brasiliensis*, derecha cepa *Gmelina arborea*.

5. DISCUSIÓN

5.1. Clasificación de tolerancia al patógeno *Ceratocystis fimbriata* en genotipos élite de *Gmelina arborea*

La evaluación de genotipos en el programa de mejoramiento genético busca determinar si su genética puede considerarse resistente a una enfermedad para su comercialización y establecimiento seguro en campo. Diversos estudios en Costa Rica han determinado que la tolerancia de la melina al *C. fimbriata* está determinada por su genotipo [11], [12], [13]. En este contexto, la lesión interna es un parámetro práctico replicable para evaluar la tolerancia a esta enfermedad a nivel de invernadero. Esto ha sido aplicado en ensayos con especies como cacao, café, eucalipto [20] y se ha utilizado de manera similar en este estudio para evaluar la respuesta de los genotipos de melina a *C. fimbriata*. La clasificación mediante un índice de selección a nivel de invernadero es una herramienta que orienta la elección de genotipos con las características deseables en los ensayos genéticos, ya que permite combinar diversas variables según su nivel de importancia, y de este modo, obtener una evaluación más completa [50], [51].

Los resultados de este estudio muestran que hay variaciones entre los 92 genotipos evaluados en incidencia y magnitud de la lesión. Méndez-Álvarez *et al.* [11] evaluaron en campo 26 de esta misma población de genotipos aunque el método de agrupación difiere con el utilizado en este estudio porque se utilizó un índice de patogenicidad y se dividió en tercios, contrario a este estudio que se utilizó un índice de selección agrupado en quintiles. A pesar de la diferencia, se obtiene resultados similares como en el caso de los genotipos 1 y 51 que se ubican dentro del grupo de tolerancia al patógeno.

Sin embargo, se obtuvo una calificación diferente para algunos genotipos en este estudio. Los genotipos 57 y 58 se registran ahora como levemente susceptibles, mientras los genotipos 27 y 24 son catalogados como tolerantes. Además, los genotipos 4, 19, 20CA, 35PC, 5N, 33PC, 26PC, 12PC, 18PC, 32PC, T y 59 se encuentran entre leve y altamente susceptibles.

Por otro lado, los genotipos 1N, 19CA y 24CA son catalogados entre leve y medianamente susceptibles, mientras que Méndez-Álvarez *et al.* [11] los reportan susceptibilidad alta. Los genotipos 20, 4CA y 33 son considerados en esta investigación como altamente susceptibles, mientras que los genotipos 26 y 15N concuerdan en ambas evaluaciones en su registro como extremadamente susceptibles. Estas posibles diferencias se pueden deber a la forma de evaluación en invernadero, la forma de inoculación del patógeno e incluso edad de las plantas.

En otro estudio similar realizado por Méndez-Álvarez *et al.* [12] se utilizó la cepa CIF001 de *C. fimbriata* y se evaluó los genotipos 1, 20, 57, 58 y 15N. A pesar de utilizar una cepa diferente, ambos estudios coinciden en clasificar el genotipo 1 como tolerante y 15N como extremadamente susceptible. Estos resultados sugieren la necesidad de una revisión o evaluación adicional de algunos genotipos con resultados contrastantes. Con respecto a los 92 genotipos evaluados en este trabajo, es importante destacar que la mayoría se someten por primera vez a una evaluación a *C. fimbriata*, lo que permite determinar su nivel de tolerancia o susceptibilidad.

Importante mencionar, que solamente 19% de genotipos se pueden plantar de manera segura, de toda la población élite del programa de mejoramiento genético. Alrededor de 75 genotipos de alto rendimiento, calidad y productividad están siendo relegados para una posterior opción de hibridación con genotipos tolerantes. Esto sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a mejorar la resistencia genética de melina dentro los programas de mejoramiento genético para garantizar mayor tolerancia a enfermedades.

5.2. Cultivos duales de antagonismo *in vitro*

T. harzianum se utiliza en una amplia variedad de plantas para combatir enfermedades causadas por hongos patógenos [32], [52]. Estudios han evaluado a *T. harzianum* como agente de biocontrol a través de pruebas duales como Chavarría-Vega y Carmona-Solís [53] que evaluaron el antagonismo de *T. harzianum* contra *Fusarium solani* aislado de árboles de melina y observaron diferencias significativas en la acción de *T. harzianum* frente al patógeno evaluado. Por su parte, Idrees *et al.* [43] probaron el efecto antagonista de *T. harzianum* en diferentes patógenos, incluido *C. fimbriata*, donde reportaron porcentajes de inhibición radial de 85,19% y un promedio de crecimiento radial de 17,9 mm contra este patógeno. Aunque estos valores reportados son superiores al 33,7% registrado en esta investigación, el crecimiento radial observado si es coincidente con la segunda repetición del estudio actual (Cuadro 6).

En un estudio similar, Shruthi *et al.* [54] evaluaron el antagonismo del género *Trichoderma*, incluida la especie *T. harzianum* contra *C. fimbriata*. En su análisis, observaron un crecimiento radial del patógeno que varió entre 6,16 mm hasta 12,83 mm en placas duales con *T. harzianum*, mientras que el control alcanzó los 90 mm en ocho días. En comparación con este estudio, el crecimiento radial durante la primera repetición varió entre 8,63 mm a 9,69 mm en presencia de *T. harzianum*, mientras que el control alcanzó los 13,0 mm; en la segunda repetición, el crecimiento del patógeno en placas duales varió entre 14,7 mm y 15,9 mm, mientras que el control alcanzó 18,1 mm en una evaluación de cinco días (Cuadro 6). Las diferencias observadas en el crecimiento radial pueden deberse a la duración de la evaluación, ya que Shruthi *et al.* evaluaron durante tres días más.

Además, los porcentajes de inhibición de crecimiento del patógeno también variaron en ambos estudios. Shruthi *et al.* reportan una inhibición máxima de 93,10%, en contraste en este estudio la inhibición alcanzó un máximo de 33,7% en la primera repetición y un 18,8% en la segunda réplica, que podría explicarse con las diferencias en el crecimiento radial del control de ambos estudios. Idrees *et al.* [43] reportan también porcentajes de inhibición de hasta 83,09% en una evaluación de cinco días, aunque con un crecimiento radial de *C. fimbriata* de tan solo 1,79 mm.

En solo cuatro días, *T. harzianum* establece contacto con *C. fimbriata* y para el día cinco ya es posible observar coloraciones intensas en la zona de interacción, lo cual sugiere la presencia de sustancias producidas por los hongos. Puede observarse en la Figura 5 que *T. harzianum* continúa su crecimiento sobre el micelio de *C. fimbriata*. Esta característica permite clasificar las cepas en la Clase 1 según la escala de Bell [46], como también lo reportan Brito *et al.* [55]. Los resultados muestran así el potencial de *T. harzianum* como agente de biocontrol eficaz contra *C. fimbriata*, debido a su rápida acción colonizadora e inhibidora principalmente por el mecanismo que ejerce de competencia por espacio y nutrientes [43].

La mejor cepa evaluada en esta investigación fue aislada de *H. brasiliensis*, lo que resalta la importancia de encontrar especies de biocontrol endófitas a otras especies forestales distintas de los hospederos afectados porque podría tener respuestas igualmente efectivas. Saranya *et al.* [42] antes de evaluar el potencial biocontrol contra *C. fimbriata*, aislaron cepas de *Trichoderma* y otros biocontroladores de la granada (*Punica granatum* L.). Evaluaron las cepas en ensayos duales donde obtuvieron una inhibición micelial de hasta 100% contra *C. fimbriata*, resultados muy superiores a lo obtenido en este estudio con cepas aisladas de diversas especies forestales, incluida melina.

5.3. Evaluación de biocontrol de *Trichoderma harzianum* contra *Ceratocystis fimbriata*

Los síntomas observados en este estudio a los 60 días, como pérdida de turgencia, marchitez y leves signos de clorosis coinciden con los síntomas reportados por Belezaca-Pinargote *et al.* [56] y Méndez-Álvarez *et al.* [11] en un ensayo en invernadero, quienes incluso reportan la presencia de rebrotes. El progreso de la enfermedad puede evaluarse mediante la medición de lesión o mediante el cálculo de porcentaje de lesión en relación con la altura total, como se ha hecho en clones de eucalipto en Brasil, empleando el mismo procedimiento que en este estudio [24], [48], [57].

De manera similar, *C. fimbriata* muestra distintos niveles de agresividad en un mismo clon, lo que sugiere que la tolerancia a la enfermedad varía en función del genotipo. A pesar de que el material utilizado en el ensayo era homogéneo, se observan diferencias iniciales en el establecimiento en relación con la altura, esto podría explicar ligeras diferencias en el crecimiento como lo mencionan Méndez-Álvarez *et al.*[11]. En el estudio de Oliveira *et al.* [48] también consideran que la agresividad del patógeno puede estar influida por su propia variación genética; por lo tanto, no todas las cepas de *C. fimbriata* podrían resultar igualmente agresivas en los mismos genotipos. Esto abre la posibilidad de explorar distintas combinaciones de cepas y genotipos según las zonas en las que el patógeno está presente.

Por otro lado, *T. harzianum* muestra un potencial como agente de biocontrol al reducir, en cierta medida, la severidad de la lesión causada por *C. fimbriata* como evidencian los resultados de este estudio en el Cuadro 8 y Figura 7. Sin embargo, su eficacia puede variar según la capacidad de resistencia del genotipo frente al patógeno, ya que los individuos más susceptibles pueden no lograr resistir la infección, incluso después de la inoculación preventiva con *T. harzianum*, tal y como se observó en los genotipos 63, 32PC, 16PZ y 15N. Es importante recalcar que el uso de un agente de biocontrol no tiene como fin eliminar la enfermedad, sino que es una técnica preventiva que permite inhibir el avance del patógeno [58], tal y como se evidencia en los resultados obtenidos.

Estos resultados sugieren la necesidad de desarrollar estrategias que permitan a los genotipos más susceptibles mejorar su respuesta defensiva al ataque de *C. fimbriata*. Como a través del apoyo de un biocontrolador que participe en la inducción a la resistencia [59]. El control biológico no se limita solo a la producción de metabolitos, sino que depende de factores adicionales, como la competencia dentro la planta y variables externas, incluyendo temperatura, humedad, estado de salud, edad, desarrollo y estrés de la planta [52].

Brito *et al.* [55] estudiaron el efecto de *Trichoderma* spp. contra *C. fimbriata* en plántulas de mango (*Mangifera indica* L.) a través de la inoculación en raíces y sustrato. En sus resultados observaron que la cepa *T. harzianum*, en ambas inoculaciones, disminuyó la incidencia de la enfermedad en comparación con el control, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, Idrees *et al.* [43] también evaluaron el efecto de *T. harzianum* contra *C. fimbriata* a nivel de invernadero, pero con inoculación a través del suelo solamente. Sin embargo, registraron una reducción de hasta 52,55% de la enfermedad comparado con el control no inoculado con el agente de biocontrol. Esto a pesar de que no evaluaron la severidad de la lesión, sino la severidad de la enfermedad observada a través de una escala. Estos estudios evidencian que *T. harzianum* ejerce una reducción significativa de la enfermedad similar a los hallazgos de esta investigación.

6. CONCLUSIONES

- a) La clasificación de la población de mejoramiento genético de melina resultó en 17 genotipos tolerantes, 27 levemente susceptibles, 15 medianamente susceptibles, 20 altamente susceptibles y 13 extremadamente susceptibles.
- b) Nueve genotipos (10%) destacaron por su bajo nivel de incidencia y lesión, lo que los hace aptos para su comercialización y establecimiento seguro en campo.
- c) Las tres cepas endófitas de *Trichoderma harzianum* evaluadas demostraron hasta una efectividad de inhibición de casi un 34% contra *Ceratocystis fimbriata*.
- d) Los mismos genotipos de melina clasificados como tolerantes, también resultaron tolerantes bajo el tratamiento con *Trichoderma harzianum*.
- e) *Trichoderma harzianum* logró reducir en un 18% la severidad de la lesión causada por *Ceratocystis fimbriata*, pero no pudo evitar la aparición de la enfermedad en los genotipos susceptibles.
- f) Es posible reducir parcialmente el avance del patógeno dentro de la planta mediante la inoculación preventiva con *Trichoderma harzianum*.

7. RECOMENDACIONES

- a) Se recomienda evaluar técnicas de inoculación preventiva de *Trichoderma harzianum* en la producción de plantas de melina en invernadero.
- b) Se recomienda estudios que evalúen las interacciones entre cepas de *Trichoderma harzianum* y genotipos de melina para identificar combinaciones efectivas en el control preventivo de *Ceratocystis fimbriata*.
- c) Se recomienda incluir la mortalidad como variable para diferenciar entre los genotipos con manifestación parcial o total de la enfermedad.
- d) Se recomienda probar otros mecanismos de inoculación de *Trichoderma harzianum* en las plantas.

8. REFERENCIAS

- [1] J. Rojas-Sandoval, “*Gmelina arborea* (candahar)”, 2016. doi: 10.1079/cabicompendium.25465.
- [2] J. C. Onyekwelu, “Above-ground biomass production and biomass equations for even-aged *Gmelina arborea* (Robx.) plantations in south-western Nigeria”, *Biomass Bioenergy*, vol. 26, núm. 1, pp. 39–46, 2004, doi: 10.1016/S0961-9534(03)00100-4.
- [3] F. Rojas Rodríguez, D. Arias Aguilar, R. Moya Roque, A. Meza Montoya, O. Murillo Gamboa, y M. Arguedas Gamboa, “Manual para productores de melina (*Gmelina arborea*) en Costa Rica”, Cartago, 2004.
- [4] B. A. Ruiz-Blandon, E. Salcedo-Pérez, R. Rodríguez-Macías, E. Hernández-Álvarez, J. Campo, y A. Merino, “Growth, biomass, carbon and nutrient pools in *Gmelina arborea* established in pure and mixed forest stand production systems in Mexico”, *New For (Dordr)*, vol. 53, núm. 4, pp. 735–757, 2022, doi: 10.1007/s11056-021-09878-7.
- [5] C. Belezaca-Pinagote, E. Solano-Apuntos, R. López-Tobar, y M. Macías-Moncayo, “Problemas forestales e incidencias en el ser humano: Experiencia de *Gmelina arborea* en Ecuador”, *Rev Cienc Soc*, vol. 27, núm. Esp. 3, pp. 309–322, 2021.
- [6] W. S. Dvorak, “World view of *Gmelina arborea*: opportunities and challenges”, *New Forest*, vol. 28, pp. 111–126, 2004.
- [7] F. F. Lega Rounda, “Estudio de la forma de *Gmelina arborea* (Robx.): Análisis de las plantaciones de Manila, Siquirres”, Tesis de Maestría, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 1988.
- [8] H. Martínez, “Melina (*Gmelina arborea* Roxb.): Condiciones para su cultivo”, Moravia, Costa Rica, 2015.
- [9] M. Arguedas, “Problemas fitosanitarios de la melina (*Gmelina arborea* (Roxb.)) en Costa Rica”, *Kurú: Revista Forestal*, vol. 1, núm. 2, 2004.
- [10] D. Méndez-Álvarez, T. de Souza Cândido, A. Couto Alfenas, O. Murillo, Y. Badilla, y R. Ferreira Alfenas, “First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt on *Gmelina arborea* in Costa Rica”, *For Pathol*, vol. 50, núm. 5, 2020, doi: 10.1111/efp.12628.

- [11] D. Méndez-Álvarez, O. Murillo-Gamboa, Y. Badilla-Valverde, y W. Hernández-Castro, “Genetic tolerance to *Ceratocystis* wilt in melina (*Gmelina arborea* Roxb.)”, *Silvae Genet*, vol. 70, núm. 1, pp. 195–204, 2021, doi: 10.2478/sg-2021-0017.
- [12] D. Méndez-Álvarez, Y. Badilla-Valverde, O. Murillo-Gamboa, y R. Ferreira Alfenas, “Genetic resistance to *Ceratocystis fimbriata* in elite genotypes of *Gmelina arborea*”, *Agronomía Mesoamericana*, vol. 34, núm. 3, p. 52968, 2023, doi: 10.15517/am.2023.52968.
- [13] A. Salas-Rodríguez, O. Murillo-Gamboa, R. Murillo-Cruz, y C. Ávila-Arias, “Evidencia de tolerancia genética a la pudrición del tronco en clones de *Gmelina arborea* Roxb. en Costa Rica”, *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, vol. 13, núm. 32, pp. 30–39, 2016, doi: 10.18845/rfmk.v0i0.2550.
- [14] M. Arguedas, *Plagas y enfermedades forestales en Costa Rica*, 1a ed., núm. 11 y 12. San José, Costa Rica: Corporación Garro y Moya, 2008.
- [15] Fundación Limpiemos Nuestros Campos, *Manual: Buenas prácticas de manejo de plaguicidas para una agricultura sostenible, segura y sana*. 2010.
- [16] A. Méndez, “Evaluación de tratamientos para el manejo de *Nectria* sp. en plantaciones de *Gmelina arborea* en Santa Rosa de Pocosol, Alajuela”, Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 2011.
- [17] M. Arguedas, M. Rodríguez-Solís, R. Moya, y A. Berrocal, “*Gmelina arborea* ‘death disease’ in fast-growth plantations: Effects of soil and climatic conditions on severity and incidence and its implications for wood quality”, *For Syst*, vol. 27, núm. 1, 2018, doi: 10.5424/fs/2018271-12236.
- [18] V. Meza-Picado, K. Alfaro-Jiménez, R. Bedoya-Arrieta, M. Romero-Mora, P. Montenegro-Salas, A. Valerio-Madrigal y J. Sánchez-Alpizar, “Incidencia y severidad de la pudrición del tronco en plantaciones de *Gmelina arborea* (Melina), Costa Rica: Región Huetar Norte, Huetar Atlántica y Chorotega”, Heredia, 2020.
- [19] R. K. Webster y E. E. Butler, “A morphological and biological concept of the species *Ceratocystis fimbriata*”, *Canadian Journal of Botany*, vol. 45, núm. 9, 1967.

- [20] C. J. Baker, T. C. Harrington, U. Krauss, y A. C. Alfenas, “Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*”, *Phytopathology*, vol. 93, núm. 10, pp. 1274–1284, 2003.
- [21] C. J. Engelbrecht, T. C. Harrington, y A. Alfenas, “*Ceratocystis* wilt of cacao - A disease of increasing importance”, *Phytopathology*, 2007, pp. 1648–1649. doi: 10.1094/PHYTO-97-12-1648.
- [22] R. Reyna y C. A. Pérez, “Reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales: Marchitamiento por *Ceratocystis*”, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay, 2014.
- [23] M. Marín Montoya y M. J. Wingfield, “A review of *Ceratocystis sensu stricto* with special reference to the species complexes *C. coerulescens* and *C. fimbriata*”, *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, vol. 59, núm. 1, pp. 3045–3075, 2006.
- [24] E. A. V Zauza y A. C. Alfenas, “Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*”, *Plant Dis*, vol. 88, núm. 7, pp. 758–760, 2004.
- [25] L. M. S. Guimarães, A. S. Nunes, S. A. Santos, M. D. V. Resende, M. B. Damacena, D. L. Siqueira, R. S. Alves and A. C. Alfenas, “Resistance of mango cultivar Ubá to *Ceratocystis fimbriata* depends on the pathogen’s physiological variability”, *Crop Protection*, vol. 143, p. 105560, 2021, doi: 10.1016/j.cropro.2021.105560.
- [26] M. J. Cordero Vega, “Caracterización morfológica, patogénica y molecular de aislamientos de *Ceratocystis* spp. provenientes de seis zonas cafetaleras de Costa Rica”, Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica, 2017.
- [27] O. Murillo-Gamboa, A. Salas-Rodríguez, R. Murillo-Cruz, y C. Ávila-Arias, “Tasa de avance de la pudrición del tronco en melina *Gmelina arborea* Roxb. y posibilidades de manejo”, *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, vol. 13, núm. 32, pp. 40–50, 2016, doi: 10.18845/rfmk.v0i0.2551.
- [28] R. V. Cobbe, “Capacitación participativa en el manejo integrado de plagas – MIP: Una propuesta para América Latina”, 1998.

- [29] J. O. Nwogwugwu y A. A. Batcho, “Antifungal potentials of some botanicals on *Sclerotium rolfsii* schum., the causal pathogen of damping-off of *Gmelina arborea* Roxb. in Ibadan, Southwestern Nigeria”, *Journal of Plant Diseases and Protection*, vol. 126, núm. 6, pp. 543–551, 2019, doi: 10.1007/s41348-019-00267-z.
- [30] Y. Liu, P. He, P. He, S. Munir, A. Ahmed, Y. Wu, Y. Yang, J. Lu, J. Wang, J. Yang, X. Pan, Y. Tian and Y. He, “Potential biocontrol efficiency of *Trichoderma* species against oomycete pathogens”, *Front Microbiol*, vol. 13, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.974024.
- [31] M. Usman Ghazanfar, M. Raza, W. Raza, y M. I. Qamar, “*Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: A review”, *Plant Protection*, vol. 2, núm. 3, pp. 109–135, 2018.
- [32] G. Kumar, A. Maharshi, J. Patel, A. Mukherjee, H. B. Singh, y B. K. Sarma, “*Trichoderma*: A potential fungal antagonist to control plant diseases”, *SATSA Mukhapatra. Annual Technical Issue*, núm. 21, pp. 206–218, 2017.
- [33] M. Sood, D. Kapoor, V. Kumar, M. Sheteiwiy, M. Ramakrishnan, M. Landi, F. Araniti and A. Sharma, “*Trichoderma*: The ‘secrets’ of a multitalented biocontrol agent”, *Plants*, vol. 9, núm. 6, pp. 1–25, 2020, doi: 10.3390/plants9060762.
- [34] O. Fernández-Larrea Vega, “Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario”, *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, vol. 62, pp. 96–100, 2001.
- [35] B. E. López-Valenzuela, O. Tzintzun-Camacho, A. D. Armenta-Bojórquez, F. A. Valenzuela-Escoboza, G. J. Lizárraga-Sánchez, J. del R. Ruelas-Islas y D. González-Mendoza, “Microorganismos del género *Trichoderma* productores de fitohormonas y antagonistas de fitopatógenos”, *Bioagro*, vol. 34, núm. 2, pp. 163–172, 2022, doi: 10.51372/bioagro342.6.
- [36] F. Puspita, R. Saputra, y N. Hasanah, “The potential of *Trichoderma* spp. endophytes as biological control agents against *Ceratocystis* sp. causes of acacia stem rot disease *in vitro*”, *Adv Biol Sci Res*, vol. 13, pp. 18–24, 2021.
- [37] M. Schmoll y A. Schuster, “Biology and biotechnology of *Trichoderma*”, *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 87, núm. 3, pp. 787–799, 2010, doi: 10.1007/s00253-010-2632-1.

- [38] J. Rolleri, M. Stocco, P. Moya, y C. Mónaco, “Posibilidades del uso de *Trichoderma harzianum* en el biocontrol del marchitamiento y cancro bacteriano del tomate”, *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 120, núm. 2, pp. 1–12, 2021, doi: 10.24215/16699513e080.
- [39] S. E. García-Díaz, A. Aldrete, D. Alvarado-Rosales, D. Cibrián-Tovar, y J. T. Méndez-Montiel, “Biocontrol de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium circinatum* Nirenberg & O’Donnell en plántulas de *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. en tres sustratos”, *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, vol. 25, núm. 3, pp. 353–367, 2019, doi: 10.5154/r.rchscfa.2018.12.088.
- [40] S. Kannangara, R. M. G. C. S. Dharmarathna, y D. L. Jayarathna, “Isolation, identification and characterization of *Trichoderma* species as a potential biocontrol agent against *Ceratocystis paradoxa*”, *J Agric Sci (Belihuloya)*, vol. 12, núm. 1, pp. 51–62, 2017, doi: 10.4038/jas.v12i1.8206.
- [41] K. A. M. Abo-Elyousr, S. I. I. Abdel-Hafez, y I. R. Abdel-Rahim, “Isolation of *Trichoderma* and evaluation of their antagonistic potential against *Alternaria porri*”, *Journal of Phytopathology*, vol. 162, núm. 9, pp. 567–574, 2014, doi: 10.1111/jph.12228.
- [42] R. Saranya, R. H. Yashoda, K. Dinesh, y T. Basavaraj, “Isolation and evaluation of pomegranate (*Punica granatum* L.) endophytes against *Ceratocystis fimbriata* and *Fusarium oxysporum*, the causal agents of pomegranate wilt”, *Indian Phytopathol*, vol. 77, núm. 2, pp. 545–551, 2024, doi: 10.1007/s42360-024-00737-x.
- [43] S. Idrees, S. Chohan, M. Abid, R. Perveen, y M. T. Malik, “Biological potential of *Trichoderma* species in the control of some phytopathogenic fungi”, *Pakistan Journal of Phytopathology*, vol. 31, núm. 2, pp. 201–206, 2019, doi: 10.33866/phytopathol.031.02.0526.
- [44] A. Aswini, T. Sharmila, T. Raaga, R. Sri Deepthi, y M. S. R. Krishna, “*In vitro* antifungal activity of *Trichoderma* strains on pathogenic fungi inciting hot pepper (*Capsicum annum* L.)”, *J Chem Pharm Res*, vol. 8, núm. 4, pp. 425–430, 2016.
- [45] W. Rivera-Méndez, K. Meneses-Montero, C. Zúñiga-Vega, y J. A. Brenes-Madriz, “Antagonismo de *Trichoderma* sp. ante el patógeno *Stromatinia cepivora* en el cultivo de cebolla”, *Tecnología en Marcha*, núm. Edición Especial Biocontrol, pp. 22–30, 2016.

- [46] D. K. Bell, H. D. Wells, y C. R. Markham, “*In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens”, *Phytopathology*, vol. 72, núm. 4, pp. 379–382, 1982.
- [47] J. Amaral, G. Pinto, J. A. Flores-Pachecho, J. J. Díez-Casero, A. Cerqueira, P. Monteiro, A. Gómez-Cadenas, A. Alves and J. Martín-García, “Effect of *Trichoderma viride* pre-inoculation in pine species with different levels of susceptibility to *Fusarium circinatum*: physiological and hormonal responses”, *Plant Pathol*, vol. 68, núm. 9, pp. 1645–1653, dic. 2019, doi: 10.1111/ppa.13080.
- [48] L. S. S. Oliveira, L. M. S. Guimarães, M. A. Ferreira, A. S. Nunes, L. V. A. Pimenta, y A. C. Alfenas, “Aggressiveness, cultural characteristics and genetic variation of *Ceratocystis fimbriata* on *Eucalyptus* spp.”, *For Pathol*, vol. 45, núm. 6, pp. 505–514, 2015, doi: 10.1111/efp.12200.
- [49] L. S. S. Oliveira, “Aggressividade de isolados de *Ceratocystis fimbriata* em clones de *Eucalyptus* spp.”, Dissertação de Magister Scientiae, Universidade Federal de Viçosa, 2010.
- [50] M. Espitia, O. Murillo, y C. Castillo, “Ganancia genética esperada en melina (*Gmelina arborea* roxb.) en córdoba (Colombia)”, *Revista Arvore*, vol. 40, núm. 1, pp. 71–80, 2016, doi: 10.1590/0100-67622016000100008.
- [51] J. J. Cerón-Rojas y J. Sahagún-Castellanos, “Un índice de selección basado en componentes principales”, *Agrociencia*, vol. 39, núm. 6, pp. 667–677, 2005.
- [52] N. H. Martinez Blanco, C. Gonçalves de Mendonça, y F. A. Sganzerla Graichen, “Efficiency and delivery methods of *Trichoderma harzianum* on biological control against southern blight in sweet pepper”, *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, vol. 17, núm. 2, p. e1184, 2022, doi: 10.5039/AGRARIA.V17I2A1884.
- [53] M. Chavarría-Vega y R. Carmona-Solís, “Efecto de microorganismos antagonistas en el control de la enfermedad denominada ‘Nectria’ en la melina *Gmelina arborea* Roxb.”, *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, vol. 13, núm. 32, pp. 21–29, 2016, doi: 10.18845/rfmk.v0i0.2549.

- [54] T. Shruthi, G. Sunkad, S. Mallesh, S. Yenjerappa, y Mahadesvswamy, “Isolation and bio-efficacy screening of native *Trichoderma* species as a potential biocontrol agents against pomegranate wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* Ellis and Halst”, *J Pharmacogn Phytochem*, vol. 8, núm. 5, pp. 1581–1585, 2019.
- [55] R. A. S. Brito, G. P. Cavalcante, V. M. Stock, A. A. Colman, D. P. dos Santos, R. A. Sermarini and L. A. Maffia, “*Trichoderma* species show biocontrol potential against *Ceratocystis* wilt in mango plants”, *Eur J Plant Pathol*, vol. 158, pp. 781–788, 2020, doi: 10.1007/s10658-020-02095-6.
- [56] C. E. Belezaca-Pinargote, E. H. Solano-Apunte, y P. E. Díaz-Navarrete, “*Ceratocystis fimbriata*: A risk for the *Gmelina arborea* Roxb. (Melina) forests in Ecuador”, *Int J Health Sci (Qassim)*, vol. 6, núm. S3, pp. 11695–11710, 2022, doi: 10.53730/ijhs.v6nS3.8811.
- [57] D. A. Alvarenga Arriel, L. M. da Silva Guimarães, M. D. Vilela de Resende, F. P. Lima Neto, D. F. S. H. Schettini Silva, D. L. de Siquiera and A. C. Alfenas, “Genetic control of resistance on *Mangifera indica* to *Ceratocystis* wilt”, *Sci Hortic*, vol. 211, pp. 312–318, 2016, doi: 10.1016/j.scienta.2016.09.001.
- [58] M. E. López-López, C. L. Del-Toro-Sánchez, S. Ochoa-Ascencio, J. A. Aguilar-López, O. Martínez-Cruz, J. A. Madrigal-Pulido, M. A. Robles-García, A. T. Bernal-Mercado, M. G. Ávila-Novoa, P. J. Guerrero-Medina y M. Gutiérrez-Lomelí, “Antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas en Tanaxuri, Michoacán, México contra patógenos del aguacate (*Persea americana* Mill)”, *Biotecnia*, vol. 25, núm. 1, pp. 24–33, 2022, doi: 10.18633/biotecnia.v25i1.1726.
- [59] R. Silva Brandão, T. Fernandes Qualhato, P. A. M. Ribeiro Valdisser, M. V. de C. B. Côrtes, P. Marinho Vierira, R. Nascimento Silva, M. Lobo Junior and C. J. Ulhoa, “Evaluation of *Trichoderma harzianum* mutant lines in the resistance induction against white mold and growth promotion of common bean”, *bioRxiv*, 2019, doi: 10.1101/713776.

9. ANEXOS

Anexo 1. Clasificación por quintiles de susceptibilidad para clones de *Gmelina arborea*.

Quintil	Genotipo	IS	%Incidencia	Lesión (cm)
I	1	0,06	0,00	3,56
I	43	0,06	0,00	3,70
I	46	0,06	0,00	3,80
I	27	0,08	0,00	4,91
I	5	0,08	0,00	5,26
I	51	0,11	0,00	7,03
I	16	0,12	0,00	7,25
I	24	0,17	12,50	4,90
I	12	0,17	0,00	10,73
I	7	0,21	22,22	3,05
I	22	0,23	25,00	3,51
I	15	0,24	22,22	5,02
I	47	0,28	0,00	17,68
I	11	0,31	33,33	4,90
I	28	0,38	10,00	19,12
I	21	0,40	25,00	13,98
I	8	0,53	28,57	20,83
II	1N	0,58	20,00	27,39
II	19PZ	0,62	30,00	25,78
II	58	0,69	66,67	13,63
II	45	0,79	30,00	36,47
II	8PZ	0,80	87,50	11,53
II	4	0,82	88,89	11,99
II	26PZ	0,82	87,50	12,69
II	63	0,83	62,50	24,28
II	2	0,84	88,89	13,39
II	57	0,91	100,00	12,86
II	19	0,92	100,00	13,44
II	17	0,92	100,00	13,52
II	20CA	0,93	100,00	14,02
II	60	0,94	100,00	14,56
II	24PZ	0,95	100,00	14,92
II	19CA	0,95	100,00	15,22
II	20PZ	0,95	100,00	15,31

Quintil	Genotipo	IS	%Incidencia	Lesión (cm)
II	34	0,96	100,00	15,79
II	14PZ	0,97	100,00	16,65
II	28PZ	0,98	100,00	17,22
II	37	0,99	100,00	17,63
II	35PC	1,03	100,00	20,01
II	21PZ	1,03	100,00	20,04
II	13PZ	1,03	100,00	20,05
II	61	1,04	100,00	20,74
II	23PZ	1,05	100,00	21,40
II	35	1,06	100,00	21,86
III	1PZ	1,11	100,00	25,24
III	15PZ	1,17	100,00	28,93
III	10PZ	1,18	100,00	29,70
III	55	1,23	62,50	49,29
III	11PZ	1,23	100,00	32,65
III	24CA	1,23	100,00	32,85
III	22PZ	1,28	90,00	40,30
III	16PZ	1,32	100,00	38,63
III	5N	1,42	75,00	55,62
III	25	1,45	71,43	59,32
III	33PC	1,46	88,89	52,43
III	7VPZ	1,49	100,00	48,89
III	26PC	1,49	88,89	54,00
III	27PZ	1,58	100,00	54,57
III	12PC	1,63	100,00	57,67
IV	49	1,64	66,67	73,72
IV	100	1,66	100,00	59,89
IV	18PC	1,67	100,00	60,50
IV	25PZ	1,68	90,00	65,60
IV	20	1,71	80,00	72,20
IV	32PC	1,72	100,00	63,63
IV	9	1,74	85,71	71,43
IV	48	1,78	100,00	67,16
IV	54	1,80	100,00	68,69
IV	39	1,81	100,00	69,30
IV	5PZ	1,85	100,00	72,11
IV	62	1,86	100,00	72,44
IV	7PZ	1,87	100,00	72,89

Quintil	Genotipo	IS	%Incidencia	Lesión (cm)
IV	T	1,91	70,00	89,00
IV	4CA	1,91	100,00	75,80
IV	14	1,96	100,00	78,90
IV	42	2,01	100,00	82,00
IV	41	2,03	100,00	83,00
IV	33	2,08	100,00	86,25
IV	59	2,16	90,00	95,80
V	3PZ	2,22	100,00	95,13
V	4PZ	2,28	90,00	103,10
V	6	2,30	100,00	100,00
V	56	2,41	90,00	111,45
V	32	2,46	100,00	110,30
V	38	2,52	100,00	113,85
V	13	2,55	100,00	116,00
V	40	2,56	100,00	116,30
V	44	2,63	100,00	121,10
V	26	2,67	100,00	123,40
V	15N	2,68	100,00	124,10
V	29	2,76	90,00	133,42
V	30	2,77	100,00	129,56

