

Informe Final

“Uso de biocontroladores y materiales tolerantes a los patógenos asociados al síndrome de la muerte descendente de la teca (*Tectona grandis*) y cancro necrotica de la melina (*Gmelina arborea*)”

Código del proyecto 5402-1401-1018

Investigadores:

Dr. Olman Murillo (investigador responsable)

Ing. Yorleny Badilla

Ing. Fabiana Rojas

Ing. Xiomara Mata

Fecha de inicio: Enero 2012

Fecha de finalización: Diciembre 2013

Agosto, 2014

Tabla de contenido

1. Código y Título del proyecto.....	3
2. Autores y direcciones	3
3. Resumen	3
4. Palabras clave	4
5. Introducción.....	5
6. Marco Teórico	7
7. Metodología.....	9
8. Resultados	26
9. Conclusiones y recomendaciones.....	48
10. Literatura citada.....	48

1. Código y Título del proyecto

Código del proyecto 5402-1401-1018

“Uso de biocontroladores y materiales tolerantes a los patógenos asociados al síndrome de la muerte descendente de la teca (*Tectona grandis*) y cancro necrotia de la melina (*Gmelina arborea*)”

2. Autores y direcciones

Nombre del (la) investigador(a) y grado académico	Cédula	Escuela	Email
Olman Murillo Gamboa, Ph. D. - Coordinador	4-121-896	Ing. Forestal	olmuga@yahoo.es
Yorleny Badilla Valverde, B.Sc.	1-875-822	Ing. Forestal	yorlenybadilla@yahoo.es
Fabiana Rojas Parajeles, B.Sc.	3-389-014	Ing. Forestal	fab83@gmail.com
Xiomara Mata Granados, Lic.	3-322-823	Ing. Agronomía	xio.matag@hotmail.com

3. Resumen

El sector productivo forestal se ha sumido en una profunda crisis en la última década. La reforestación continúa disminuyendo anualmente y aumentan las importaciones de madera. La construcción y la mueblería continúan utilizando sustitutos de la madera, alejando al país de sus metas de carbono neutro para el 2020. El recién formulado Plan Nacional de Desarrollo Forestal (2011-2020, marzo 2011) plantea dentro de sus siete ejes estratégicos, Posicionamiento del Sector Forestal, Competitividad y Sostenibilidad. Con la creación de la cooperativa de mejoramiento genético forestal (GENFORES, ITCR y un grupo de empresas), se aumentó significativamente la productividad y valor de las plantaciones forestales. Sin embargo, continúan agudizándose problemas con el síndrome de la muerte descendente, posiblemente asociados al hongo *Fusarium/Nectria* en teca (*Tectona grandis*) y melina (*Gmelina arborea*). Este proyecto contribuirá con el desarrollo de opciones de prevención mediante el uso de biocontroladores (*Trichoderma* spp) y potenciales genotipos tolerantes, en un esfuerzo transdisciplinario entre la patología y el mejoramiento genético. Se aisló, caracterizó e identificó patógenos causales de estos síndromes. Posteriormente, se inoculó la colección genética de GENFORES para determinar potenciales genotipos tolerantes. Los marcadores genéticos asociarían

alelos específicos a potenciales genotipos tolerantes. Se experimentó con inoculación de *Trichoderma* en la producción clonal comercial en invernadero y en plantaciones de teca y melina en Pérez Zeledón, Guápiles y Osa. Como productos esperados se obtuvieron: patógenos asociados aislados, protocolos de evaluación de tolerancia genotípica, potenciales genotipos de melina tolerantes, publicaciones científicas, tesis e incorporación de temas en cursos de Agronomía y Forestal.

Palabras clave: Mejoramiento genético, patología, biocontroladores, teca, melina

Abstract

Forest productive sector has been under a deep crisis in last decade. Annual reforestation rate continues its negative tendency, meanwhile lumber imports continue growing. Housing and furniture industries continue utilizing wood substitutes, pushing away the country from its neutral carbon goals for year 2020. In recently published (march, 2011) National Forest Development Plan 2011-2020 has been established among seven strategical lines, Forest Sector Positioning, Competitivity and Sustainability. After GENFORES creation (national tree improvement cooperative, ITCR and a group of local companies), forest plantation productivity and economical value has risen significantly. However, teak (*Tectona grandis*) and melina (*Gmelina arborea*)'s dieback syndrome (associated presumably to *Fusarium/Nectria*) in commercial plantations become worst year by year. This project will contribute with the development of prevention options through biocontrols (*Trichoderma* spp) and putative tolerant genotypes utilization, as a transdisciplinary approach between pathology and tree breeding. Syndromes causal agents were isolated, characterized and identified. Later on, GENFORES teak and melina genotypes were inoculated in order to screen out potential tolerant clones. Gene markers would try to match specific alleles with potential tolerant genotypes. *Trichoderma*'s inoculation will be experimented in teak and melina commercial clonal production, as well as in commercial plantations in Pérez Zeledón, Guápiles and Osa. Thereafter, as expected research products were: isolates from causal pathogens, Genotypic Tolerance Assessment Protocols, potential tolerant melina genotypes, scientific publications, thesis and the inclusion of topics in Agronomy and Forestry regular courses.

Key words: tree breeding, forest pathology, biocontrolators, teak, melina

4. Palabras clave

Mejoramiento genético, patología, biocontroladores, teca, melina

5. Introducción

En los últimos años se reporta la muerte descendente de la teca en árboles mayores a 6 años de edad, en las regiones Huetar Norte, Caribe y Pacífico Central de Costa Rica (Arguedas et al., 2006). Su aparición ha causado alarma en los inversionistas de teca, cuyas exportaciones de madera al Asia superan ya los US \$50 millones anuales (Oficina Nacional Forestal, 2013). La teca es quizá la especie más valiosa y extensamente cultivada en el mundo tropical, debido a su madera de gran calidad y altos precios (Chaves y Fonseca, 1991; Weaver, 1993; Sage et al, 2013; Vallejo et al, 2013; Oficina Nacional Forestal, 2013). En Centroamérica se informa de aproximadamente 76000 ha plantadas con esta especie (FAO, 2002), en su mayoría establecidas en Costa Rica. En el caso de la melina, se ha reportado en el país la *Nectria* spp. como probable causante de su principal problema fitosanitario (Arguedas et al., 1995; Arguedas et al., 1997; Arguedas et al, 2004). Se tiene registros de la enfermedad desde los 7 meses de edad, que causan la pudrición total del tronco en pocas semanas (Arguedas et al., 1997. Su actividad ha sido tan virulenta que se ha convertido ya en una alarma nacional en esta especie, que es la de mayor cultivo anual en el país (Murillo y Guevara, 2013) y cuya madera representa más del 60% de la industria nacional en Costa Rica (Oficina Nacional Forestal, 2013). Sin madera de melina, las importaciones de pino chileno continuarían incrementando la balanza comercial negativa; alejando al país de sus metas de carbono neutral, promoviendo el enriquecimiento de los dos grandes importadores de madera y posiblemente eliminando buena parte del encadenamiento de producción de tarimas asociado a muchos pequeños industriales de la madera, casi todos ubicados en zonas deprimidas socio-económicamente del país. Su actividad económica está hoy día en alto riesgo.

Desde principios de los años 90 se reporta el inicio de programas de mejoramiento genético de la teca y la melina en la región (Murillo, 1992; Zeaser, 1998). En el 2001 se gestó desde el ITCR, un modelo cooperativo de mejoramiento genético forestal en vinculación con empresas reforestadoras (denominado GENFORES), que retomó estos programas en Costa Rica, basado en una estrategia clonal y en directa vinculación con las empresas reforestadoras (Murillo, et al., 2003; Badilla, et al., 2003; Chacón y Murillo, 2005; Salas, 2012). Los resultados de esta alianza han permitido aumentar significativamente la productividad y valor de las plantaciones forestales del país (Murillo y Guevara, 2013). Como parte del Plan Estratégico de Desarrollo de GENFORES (Murillo, 2011) y su Hoja de Ruta, se propusieron dos grandes líneas de trabajo: a) desarrollo de la productividad dentro de cada empresa; b) desarrollo colectivo de material genéticamente resistente a las enfermedades principales.

El proyecto involucró dos elementos innovadores, la investigación en el uso de *Trichoderma* spp y, el desarrollo inicial de una capacidad para obtener material genéticamente resistente a ambas enfermedades. Con el uso de *Trichoderma*, la hipótesis fue que este tipo de hongos se podrían inocular en la planta, establecerse en una especie de simbiosis en su sistema vascular, desde donde se

lograría un mayor modo de acción-protección a la planta huésped. En relación con el mejoramiento genético, se trabajó directamente con las empresas reforestadoras asociadas a GENFORES en la determinación de posibles genotipos resistentes a los patógenos de ambas enfermedades. Para esto fue necesario desarrollar protocolos de infección de patógenos en plantas y una posterior valoración y determinación de resistencia genética. Ambos elementos de innovación no fueron posibles sin un esfuerzo transdisciplinario entre expertos en patología y mejoramiento genético. De manera complementaria, se exploró también la posible relación entre los genotipos resistentes a las patologías investigadas, versus su información molecular, basado en 8 microsatélites en teca y más de 5 en melina. De modo que en un futuro cercano se pueda irrumpir en la denominada selección genómica con estas especies.

Sin embargo, el verdadero impacto a la reforestación nacional con teca y melina, sus dos especies prioritarias, se alcanzará cuando se logre identificar una colección suficiente de genotipos de ambas especies genéticamente resistentes a estas enfermedades. Para mantener este liderazgo alcanzado en la región latinoamericana, es esencial continuar con los esfuerzos preliminares iniciados que han dado luz y guía hacia donde concentrar los esfuerzos.

El proyecto tuvo como objetivo general contribuir a la prevención y manejo del síndrome de la muerte descendente de la teca (*Tectona grandis*) y la pudrición del tronco de la melina (*Gmelina arborea*) mediante el uso de biocontroladores y la detección de genotipos tolerantes o resistentes de ambas especies.

Objetivos Específicos

1. Aislar e identificar patógenos asociados al síndrome de la muerte descendente de la teca y a la pudrición del tronco de la melina.
2. Determinar la patogenicidad de los agentes causales aislados y el desarrollo de un protocolo para la determinación de la tolerancia genética en clones de teca y melina.
3. Explorar la existencia de marcadores genéticos asociados a la tolerancia de genotipos de teca y melina a los patógenos aislados.
4. Evaluar el uso de biocontroladores en la prevención y manejo de los patógenos asociados al síndrome de la muerte descendente de la teca y melina.

6. Marco Teórico

En los últimos años se reporta la muerte descendente de la teca en árboles mayores a 6 años de edad, en las regiones Huetar Norte, Caribe y Pacífico Central de Costa Rica (Arguedas *et al.*, 2006). Su aparición ha causado alarma en los inversionistas de teca, cuyas exportaciones de madera al Asia superan ya los US \$50 millones anuales (Oficina Nacional Forestal, 2013). Se especula que la causalidad del denominado síndrome del decaimiento de la teca, estaría relacionada con suelos pesados, niveles freáticos altos, elevados niveles de lixiviación de bases, alta acidez, baja fertilidad, mal drenaje y densidad alta en plantación. Análisis fitopatológicos preliminares han determinado la presencia de *Nectria* spp, sin embargo no se reporta evidencia suficiente sobre su identificación (Arguedas *et al.*, 2006). Se especula una posible relación con *N. nauriticola*, ya que especies de *Fusarium* son el estado imperfecto de *Nectria*. Arguedas *et al.* (2004) mencionan a *Fusarium oxysporum* como uno de los patógenos que afecta las raíces de teca. Hocking (1968) reportó *Fusarium solani* provocando canchales anuales en los tallos y ramas de árboles de teca en Tanzania. En Malasia se ha reportado en teca la pudrición radical basal (BRR, por sus siglas en inglés) causada por el hongo *Phellinus noxius* (Mohd Farid *et al.* 2005), cuya diseminación puede ocurrir por el contacto de raíces entre árboles vecinos. Dados los pocos estudios de esta enfermedad, permanece la discusión sobre los verdaderos actores patológicos. En Mato Grosso, Brasil, se reporta este año la presencia de *Ceratocystes* spp como agente causal de la muerte de la teca, con una sintomatología muy similar a la descrita en Costa Rica (Alfenas, 2014¹).

En el caso de la melina, se ha reportado en el país la *Nectria* spp. como posible causante de su principal problema fitosanitario (Arguedas *et al.*, 1995; Arguedas *et al.*, 1997; Arguedas *et al.*, 2004). Específicamente, se tiene registros de la enfermedad desde los 7 meses de edad, que causan la pudrición total del tronco en pocas semanas (Arguedas *et al.*, 1997). Esta sintomatología en melina se especula que está influenciada por factores climáticos y edáficos que logran afectar el sistema radical, de donde provocan condiciones severas de estrés en los árboles. Esta patología está creando un gran factor de riesgo para el inversionista y productores de melina en general. Situación que ya se vislumbra, afecte el abastecimiento de madera de plantación para tarima en el país (Francesco y Ruilova 2011). Sin embargo, la evidencia no permite aún determinar con claridad el verdadero agente causal de la pudrición del tronco y muerte de la melina (Arguedas *et al.*, 2004).

Méndez (2011) evaluó, en plantaciones de diferentes edades, el efecto de un tratamiento preventivo contra la pudrición del tronco de melina; basado en una poda y la aplicación de una mezcla del regulador de pH Kaytar®, fungicida Butrol® y cal 56® líquida como sellador de la herida. Otro tratamiento correctivo evaluado se basó en una inyección intraleño de Nutriphite® en diferentes dosis y concentraciones, que se evaluó con base en una escala de severidad basada en el grado de

¹ Alfenas, A. Patólogo forestal de la Univ. Federal de Viçosa, Brasil, comunicación personal, junio 2014

amarillamiento foliar. El estudio reveló que la mayor incidencia ocurre a los dos años de edad y que el tratamiento correctivo no fue efectivo.

Desde principios de los años 90, se reporta el inicio de programas de mejoramiento genético de la teca y la melina en la región (Murillo, 1992; Zeaser, 1998). En los últimos años, GENFORES (cooperativa de mejoramiento genético creada y dirigida desde el ITCR) volvió a retomar estos programas en Costa Rica, basado en una estrategia clonal y en directa vinculación con las empresas reforestadoras (Murillo, *et al.*, 2003; Badilla, *et al.*, 2003; Chacón y Murillo, 2005; Murillo, 2011; Salas, 2012). En el campo del mejoramiento genético, recién se logró la identificación de genotipos de melina con potencial de tolerancia o resistencia genética a la pudrición del tronco (Salas, 2013). Sin embargo, el verdadero impacto a la reforestación nacional con teca y melina, sus dos especies prioritarias, se logrará cuando se logre identificar una colección suficiente de genotipos de ambas especies genéticamente resistentes a estas enfermedades.

Hoja de Ruta de GENFORES

Desarrollo y promoción del mejor material genético existente de reforestación para las especies <i>Tectona grandis</i>, <i>Gmelina arborea</i> y de 6 especies nativas de alto valor de la región tropical americana			
I Fase	II Fase	III Fase	IV Fase
Gestión desde la EIFO (ITCR) de investigación como base para la creación posterior de la cooperativa de conservación y mejoramiento genético forestal (GENFORES) bajo un modelo asociativo.	Consolidación de GENFORES a nivel nacional	Proyección de GENFORES a nivel latinoamericano y avances hacia su sostenibilidad	Creación de un modelo sostenible para GENFORES dirigido desde el ITCR, con proyección científica y comercial a nivel internacional.
Período 1998-2001	Período 2001-2005	Período 2005-2014	Período 2014-2020
Productos 1. Desarrollo de tecnología clonal a escala operativa.	Productos 1. Creación de GENFORES con un grupo de 4 empresas nacionales. 2. Desarrollo propio de tecnologías de propagación clonal a escala comercial (diseño de invernaderos), diseños propios de selección y evaluación genética; y consolidación de GENFORES en Costa Rica.	Productos 1. Consolidación de GENFORES a nivel nacional y latinoamericano con 10 miembros en 5 países. 2. Definición de estrategia de mejoramiento genético; Inicia la F2 y el mejoramiento genético hacia Resistencia a	Productos 1. Desarrollo basado en Plan Estratégico de GENFORES: a) hacia generaciones avanzadas de mejora; b) resistencia a enfermedades; c) genómica de teca, melina y spp nativas; d) nuevo modelo de cooperación y funcionamiento (ITCR y empresarial); e) liderazgo

	<p>3. Constitución de primeras colecciones genéticas de alto valor de las especies teca, melina y Acacia mangium.</p> <p>4. Publicación de numerosos artículos científicos, manuales, ponencias en congresos internacionales.</p>	<p>enfermedades; definición de grupo de spp nativas estratégicas.</p> <p>3. Definición de estrategia comercial con la propuesta de creación del CONSORCIO.</p>	<p>internacional en mejoramiento genético y formación de recurso humano.</p> <p>2. Consolidación del CONSORCIO, como vía de gestión empresarial/usufructo de los productos de GENFORES.</p>
--	---	--	---

7. Metodología

Objetivo específico 1: Aislar e identificar patógenos asociados al síndrome de la muerte descendente de la teca y a la pudrición del tronco de la melina.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biocontroladores de la Escuela de Agronomía y en los invernaderos de la Escuela de Ing. Forestal y del laboratorio de Biocontroladores, localizados en la sede del Instituto Tecnológico de Costa Rica en Santa Clara, San Carlos.

En el año 2012 se inició con la colecta de muestras con lesiones severas en plantaciones enfermas de teca y melina en sitios de la zona sur (En la zona de la Palma de Osa, Finca Puntarenas de Osa, y en finca de Coopeagri en La Ceniza de Pérez Zeledón) y zona norte del país (Santa Rosa de Pocosal; Finca El Concho, distrito Cutris, cantón San Carlos y en la finca del Colegio Agropecuario en Santa Clara, San Carlos). En el caso de la teca, se tomaron muestras de árboles entre 7 y 12 años de edad, de los cuales se muestrearon raíces infectadas, así como también del tronco en estado evidente de pudrición. En melina, los árboles tenían entre 2 y 9 años de edad y se obtuvieron muestras del tronco en proceso de pudrición, así como de discos de madera infectados, provenientes de árboles enfermos que habían sido tumbados con este propósito. Los materiales colectados se desinfectaron con inmersiones en hipoclorito de sodio al 1% durante 60 segundos, en Alcohol etílico al 95% por 30 segundos y en agua esterilizada durante 60 segundos. De los trozos con las lesiones, se tomaron muestra menores y se colocaron en cajas de petri con sustrato de Papa-Dextrosa-Agar (PDA; Difco laboratories, Detriot). Las muestras e incubaron por un período de 8 días a 28+ 2°C, 80% de humedad relativa y oscuridad continua. De las colonias obtenidas, se tomó micelio en activo crecimiento y se puso a crecer en medio PDA; posteriormente cada aislado se purificó mediante la transferencias de puntas de hifas a cajas de petri que contenían PDA.

De aislados puros se obtuvo una suspensión madre de conidios, a la que se le realizaron diluciones sucesivas, se incubaron a 28 + 2°C, 80% de humedad relativa y oscuridad continua, durante 18 h. Posteriormente, se seleccionó conidios en proceso de germinación, se les seleccionó puntas de hifas

que se colocaron en platos Petri con 25 ml de PDA. Las muestras se incubaron a 28± 2°C, 80% de humedad relativa y oscuridad continua, durante 8 días. De estas cepas se elaboraron preparaciones fijas en portaobjetos estériles, tomando fragmentos del micelio desarrollado de los cultivos axénicos monospóricos que se pudieron observar en microscopio cada 24 horas para determinar características morfológicas. Una réplica de estas muestras se enviaron al Laboratorio de Técnicas Moleculares aplicadas a la Fitoprotección del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos de la Universidad de Costa Rica. Del reporte técnico de este centro especializado (Blanco, 2013) se resume la información a continuación. A partir de las muestras enviadas, se extrajo ADN de micelio fresco de las cepas, utilizando el método CTAB (Murray y Thompson 1980). Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores específicos EF1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') y EF2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3') (Nitschke et al. 2009), que amplifican la región TEF-1α. La presencia de una sola banda fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8%). La secuenciación se realizó al producto purificado de PCR a una concentración de 50 ng/μl. En la empresa MacroGen Inc. utilizando un secuenciador 3730XL (Applied Biosystems).

Objetivo específico 2: Determinar la patogenicidad de los agentes causales aislados y el desarrollo de un protocolo para la determinación de la tolerancia genética en clones de teca y melina.

Inoculación de los clones

En la cámara de flujo laminar del laboratorio de biocontroladores de la Escuela de Agronomía (Sta. Clara, San Carlos) se realizó una suspensión de conidios. De cada matriz se obtuvo una solución madre, de la cual se tomaron submuestras en las que se realizó el recuento de conidios. Para el cálculo de la concentración se utilizó la siguiente fórmula:

Concentración (C) = # de conidios/25 * f dilución empleada * f de cámara

Donde:

- f dilución empleada= 10²
- f de cámara= 10⁴

Una vez obtenidas las suspensiones, se evaluaron 2 métodos de inoculación de patógenos, tal y como ha sido propuesto y refinado por otros investigadores (Hodge y Dvorak, 2000; Roux *et al*, 2007; Mitchell *et al*, 2012; Mafia et al, 2011).

- a) Inyección al sistema vascular. Con aguja de 0,45 mm de diámetro.

- b) Creación de una herida (hendidura) en el tallo, dejando expuesto el sistema vascular, e inocular el patógeno en la herida, que inmediatamente se procede a sellar para evitar su exposición.

Para los ensayos de inoculación en cada especie, se estableció un diseño experimental de bloques completos al azar, con dos tratamientos y cinco clones por especie, que actuaron como efecto de repetición o bloque. De cada clon se utilizaron 5 rametos por tratamiento, que conformaron la unidad experimental o parcela.

Con base en los hongos aislados e identificados en teca (*F. solani*, *F. oxysporum* y *Xylogone sphaerospora*), se estableció un experimento de inoculación por separado para cada patógeno.

Las plantas se reprodujeron vegetativamente en el invernadero de GENFORES en Sta Clara, San Carlos. Una vez que desarrollaron suficiente masa radical se desinfectaron con enjuagues de agua con jabón, se transplantaron a una bolsa plástica más amplia, donde se desarrollaron hasta alcanzar una talla de aproximadamente 30 cm de altura. El sustrato empleado fue tierra previamente esterilizada. Las plantas se mantuvieron en un minitúnel dentro del invernadero de GENFORES. Se utilizó un minitúnel diferente para cada patógeno evaluado, con el fin de disminuir algún posible error experimental por contaminación.

Las plantas se inocularon por ambos métodos y se mantuvieron en estas condiciones controladas por al menos 60 días. A cada clon se le aplicó seis tratamientos por igual. T_1 =concentración de conidios de *Fusarium oxysporum*. T_2 = Concentración de conidios de *Fusarium solani*. T_3 = Concentración de conidios de *Xylogone sphaerospora*. T_4 = Concentración de conidios de los 3 hongos mentados anteriormente. T_5 = Testigo (cero conidios). Cada tratamiento con diez repeticiones (cuadro 1).

Se realizaron observaciones semanales donde se verificó la manifestación de síntomas de la enfermedad y se evaluaron variables asociadas al crecimiento tales como:

- Diámetro al cuello
- Altura total de la planta
- Número de hojas verdaderas al final
- Peso seco de parte aérea y de las raíces.
- Porcentaje de incidencia y de severidad en una escala de 1 a 4.

Diseño experimental

Para el análisis del efecto del patógeno en la promoción de crecimiento de raíces, los resultados se expresarán en porcentajes de crecimiento.

$$\gamma_{ijk} = \mu + \alpha_i + \xi_{ijk}$$

Donde:

Variable dependiente (γ_{ijk}): variable de respuesta asociada al crecimiento

μ : Media general.

α_i : variación causada por el factor que se investiga

ξ_{ijk} : Error general aleatorio.

Para verificar la infección correcta de cada patógeno, se tomaron muestras al azar de cada tratamiento en las plantas infectadas y se procedió a realizar de nuevo aislamientos y la identificación del agente de acuerdo a la metodología descrita.

Efecto fungistático *in vitro* de metabolitos no volátiles de aislados de *Trichoderma* spp

Con el objetivo de aislar los metabolitos secundarios, se preparó un litro de medio papa dextrosa P.D.B, el cual se inoculó con los aislados seleccionados. Las muestras se incubaron durante 31 días a 25 °C. Se filtraron al vacío a través de un papel filtro (Whatman N 4, Brentford, Reino Unido), los filtrados se almacenaron durante 24 horas a 2 °C (Vinale *et al.* 2008), finalmente, la extracción se realizó con acetato de etilo (EtOAc).

Posteriormente al medio de P.D.A contenido en placas de petri se les extrajo cuatro discos de 1 cm de diámetro, en estas perforaciones se colocó con ayuda de una micropipeta 0,5 ml del extracto crudo; y en el centro de la placa se colocó un disco de 1 cm de diámetro de micelio en activo crecimiento del agente causal. A los testigos se les aplicó acetato de etilo (EtOAc) (Vinale *et al.* 2006). Luego se procedió a incubar las muestras por un período de 3 días a una temperatura de 28 °C \pm 2 °C, donde se evaluó cada 24 horas el diámetro de crecimiento de la colonia del agente causal identificado.

Efecto fungistático *In vitro* de metabolitos volátiles de aislados de *Trichoderma* spp

En placas de petri que contenían P.D.A, se colocó en la parte central un disco de 1 cm de diámetro de micelio con 72 horas de haberse cultivado, mientras que en medio P.D.A, se colocó de igual forma en la parte central un disco de micelio en activo crecimiento del agente causal. Una vez sembrados los organismos en el plato Petri, estos se incubaron por un período de 48 horas con luz continua,

temperatura entre $28\text{ C} \pm 2\text{ C}$, 80% humedad relativa y regulación del fotoperiodo por de 96 horas, donde se evaluó cada 48 horas el diámetro de crecimiento de la colonia del agente causal.

Para determinar el potencial fungistático se evaluó el porcentaje de colonización mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Col: } \frac{DT - DC}{DT} \times 100$$

Donde: DT

DT= Diámetro de la colonia en el Testigo.

DC= Diámetro de la colonia en el tratamiento.

Diseño experimental

Para los bioensayos *in vitro* de cultivos duales, para observar el posible efecto de metabolitos volátiles y no volátiles de *Trichoderma* spp, se estableció un diseño de bloques completamente al azar; con 5 repeticiones, donde cada repetición fue un clon. Con esto se garantizó que sea el mismo genotipo el que reciba los tratamientos y por tanto, los resultados sean una respuesta al tratamiento y no a una combinación de posibles distintos genotipos x tratamientos. Como unidad experimental se utilizaron 5 plantas (rametos de un mismo clon) por tratamiento por repetición. Se incluyó un tratamiento testigo en todos los casos. Los resultados fueron analizados a través de un ANDEVA, con ayuda del procedimiento GLM (para datos no balanceados), del paquete estadístico SAS y pruebas de comparación múltiple (Tukey y Waller-Duncan).

Modelo matemático que se empleó en el análisis estadístico de los cultivos duales:

Para las pruebas de cultivos duales, producción de metabolitos y potencial fungistático los resultados se expresaron mediante las variables porcentaje de colonización (%Col) y porcentaje de inhibición del crecimiento (% IC) respectivamente.

$$\gamma_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \xi_{ijk}$$

Donde:

Variable dependiente (γ_{ijk}): variable de respuesta % de colonización (% Col), (%IC) ó (%C).

μ : Media general.

α_i : variación causada por el primer factor principal que se investiga (A= aislado ó metabolito).

β_j : variación causada por el segundo factor (B: tiempo).

$(\alpha\beta)_{ij}$: variación causada por la interacción A (aislado o metabolito) x B (tiempo)

ξ_{ijkl} : Error general aleatorio.

Para los bioensayos *in vitro* de inducción a la resistencia, se aplicó un diseño irrestricto al azar; con 8 repeticiones cada uno más los respectivos testigos. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico SPSS y una prueba de rango múltiple (Tukey).

Objetivo específico 3: Explorar la existencia de marcadores genéticos asociados a la tolerancia de genotipos de teca y melina a los patógenos aislados.

Tanto en *T. grandis* como en *G. arborea* se utilizaron brotes terminales de 5 genotipos para cada especie, pertenecientes a la colección del programa de conservación y mejoramiento genético de Instituto Tecnológico de Costa Rica (GENFORES). Todos los genotipos utilizados se mantuvieron en producción en mini jardines clonales dentro de ambiente controlado en invernadero. Los genotipos que se evaluaron en *T. grandis* fueron 8x, 22x, 32, 4 y 29e y para *G. arborea* los genotipos 47, 56, 57, 315 y 60.

Las muestras se procesaron en el laboratorio de genética molecular forestal ubicado en el Centro de Investigación e Integración Bosque-Industria (CIIBI) en la sede central del ITCR en Cartago.

Para la extracción del ADN en ambas especies se utilizó el kit DNeasy Mini Plant de la casa comercial Quiagen®.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para los marcadores moleculares SSR

Para el caso de *T. grandis* se evaluaron 8 imprimadores para microsatélites, mientras que en *G. arborea* se evaluaron 5 imprimadores (Datos no publicados), aunque se continúa trabajando en la validación de la amplificación con esta especie, de la cual se tiene un grupo de 18 imprimadores en total. En el Cuadro 1 se indica el **perfil térmico utilizado para la Reacción en Cadena de la Polimerasa en ambas especies.**

Cuadro 1. Perfil térmico para los imprimadores de marcadores microsátélites de *T. grandis* y *G. arborea*.

Programa	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94	4'	1
	Desnaturalización	94	30''	
2	Apareamiento	*	45''	32
	Extensión	72	45''	
3	Extensión final	72	5'	1
4	Enfriamiento	4	10'	1
5	Almacenamiento	10	∞	-

*Según imprimador utilizado.

Evaluación de imprimadores

Los genotipos de *G. arborea* estudiados fueron evaluados con los imprimadores Meldi1, Meldi2, Meldi4, Meldi5 y Meldi6. Mientras que los genotipos de *T. grandis* se evaluaron con 8 imprimadores para microsátélites (AC28-AC01-A06-C03-F05-F01-A11 y B02) (Verhaegen *et al.*, 2005; Volkaert, datos no publicados). En el Cuadro 2 se indica la temperatura de apareamiento utilizada para cada uno de los imprimadores.

Cuadro 2. Temperatura de apareamiento para los locus evaluados en ambas especies.

Especie	Locus	Temperatura de apareamiento (°C)
<i>G. arborea</i>	MELDI 1	56
	MELDI 2	55
	MELDI 4	58
	MELDI 5	53
	MELDI 6	56
	<i>T. grandis</i>	AC28
AC01		55
A06		51,2
C03		51
F05		51
F01		51
A11		51
B02		51

Objetivo específico 4: Evaluar el uso de biocontroladores en la prevención y manejo de los patógenos asociados al síndrome de la muerte descendente de la teca y melina.

A) Evaluación del efecto de dos aislados de *Trichoderma* spp., sobre la estimulación de la emisión de raíces en clones de teca y melina por el método de aeroponía

El ensayo se realizó bajo condiciones de invernadero y casa de sombra de en las instalaciones de GENFORES, de la Escuela de Ingeniería Forestal, situado en Finca La Esmeralda, en el campus del Instituto Tecnológico de Costa Rica sede San Carlos, a una altitud de 172 m.s.n.m. Los experimentos se realizaron con base en cinco clones de teca y otros cinco de melina, de las colecciones genéticas en el mini-jardín clonal que mantiene GENFORES en su invernadero.

Un primer experimento consistió en propagar y desarrollar miniestaquillas de ambas especies, bajo el estímulo de aislados de *Trichoderma* spp. Se seleccionaron brotes nuevos suculentos (brotes meristémicos) que fueron cosechados y posteriormente, se les sumergió la base por un período de 5 minutos en cada uno de los tratamientos descritos en el Cuadro 3.

El diseño experimental fue de Bloques Completos al Azar, con 5 clones que actuaron como efecto de Bloque. La unidad experimental estuvo conformada por 6 plantas o rametos por clon. Por tanto, cada bloque (clon) recibió 7 tratamientos x 6 plantas = 42 plantas/clon en total (ver Figura 1).

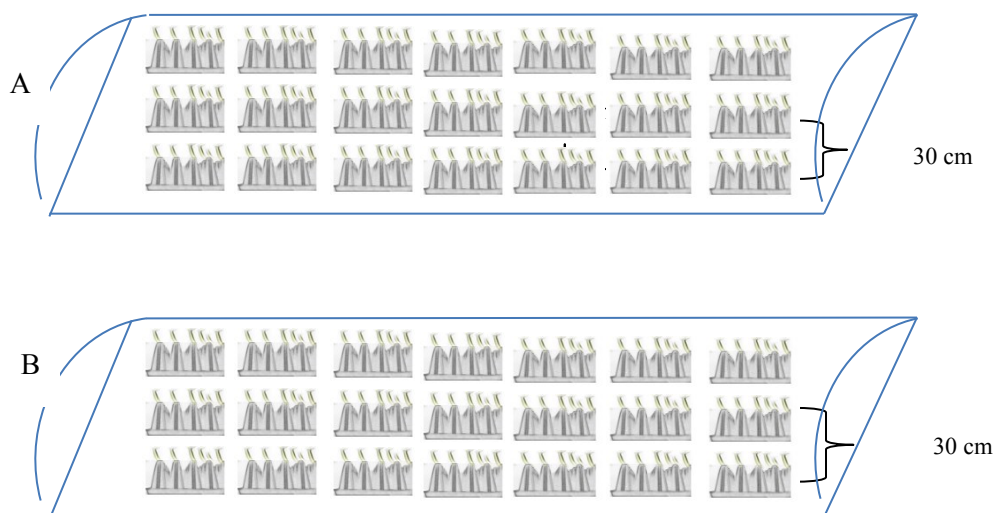


Figura 1. Distribución de los tratamientos y disposición en el minitúnel de las bandejas durante los ensayos de estimulación del enraizamiento a partir de *Trichoderma* spp. A) Ensayo para teca; B) Ensayo para melina.

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ij} = B_i + T_j + B_i \times T_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = observación correspondiente a la i -ésima unidad experimental que recibió el j -ésimo efecto bloque y del j -ésimo tratamiento.

\bar{X} = media general

β_i = efecto del i -ésimo bloque.

T_j = efecto del j -ésimo tratamiento

BT_{ij} = efecto de la interacción del i –ésimo Bloque con el j –ésimo Tratamiento (parcela o unidad experimental ij).

$ijkle$ = efecto del e -ésimo error experimental aleatorio.

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos aplicados a las miniestaquillas de clones de teca y melina en condiciones de minitúnel

Tratamiento	Descripción	Ingrediente Activo	Concentración
T1	Enraizante: MagicRoot®Ever Green	Ácido-4-Indol-3- Butírico	Comercial (0,30% p/p)
T2	Conidios + extracto de metabolitos	<i>Trichoderma</i> spp. Aislado LabBio TD ₃₇	1x10 ⁹ conidios/ml
T3	Conidios + extracto de metabolitos	<i>Trichoderma</i> spp. Aislado LabBio TD ₅	1x10 ⁹ conidios/ml
T4	Conidios + extracto de metabolitos	<i>Trichoderma</i> spp. Aislados LabBio TD ₃₇ y LabBio TD ₅	1x10 ⁹ conidios/ml
T5	Enraizante + conidios + extracto de metabolitos	Ácido-4-Indol-3- Butírico <i>Trichoderma</i> spp Aislados LabBio TD ₃₇	Comercial (0,30% p/p)+ 1x10 ⁹ conidios/ml
T6	Enraizante + conidios + extracto de metabolitos	Ácido-4-Indol-3- Butírico <i>Trichoderma</i> spp Aislado LabBio TD ₅	Comercial (0,30% p/p)+ 1x10 ⁹ conidios/ml
T7	Enraizante + conidios + extracto de metabolitos	Ácido-4-Indol-3- Butírico <i>Trichoderma</i> spp Aislados LabBio TD ₃₇ y LabBio TD ₅	Comercial (0,30% p/p)+ 1x10 ⁹ conidios/ml

Las miniestaquillas fueron revisadas cada tres días en términos de si habían logrado enraizar, número de raíces y al cabo de 15 días, longitud de raíces. De cada genotipo se reprodujo suficiente cantidad de miniestaquillas enraizadas (rametos), como material experimental a utilizar en los ensayos. Las plantas se transplantaron a bolsas plásticas y otras se sembraron en bancales de arena, siguiendo los procedimientos estándar de minijardín clonal (Murillo y Badilla, 2004).

Como variables de respuesta se evaluó, en las miniestaquillas, la sobrevivencia, tasa de enraizamiento, número de raíces, longitud de raíces (en mm a los 12 días en melina y a los 15 días en teca), diámetro al cuello (mm con ayuda de un vernier), peso fresco y peso seco de la parte aérea y de la sección de raíces (con balanza analítica al tercer dígito). El peso seco se obtuvo después de colocar las muestras a 72 horas continuas en horno a 65 °C.

B) Efecto de la inoculación del sustrato con dos aislados de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento y desarrollo radicular de teca y melina en etapa de aclimatización

Para el experimento de inoculación de *Trichoderma* spp, se hidrataron pastillas Jiffy de 18 mm de diámetro con agua destilada, por un período de inmersión en agua de tres a cinco minutos. Posteriormente fueron sometidos a un proceso de esterilización escalonada con temperatura (121°C) y presión (1,5 Kg/cm²) por periodos de 15 minutos, tres veces cada 24 horas en una autoclave vertical. Los Jiffy ya inflados, fueron sumergidas en una solución con cada uno de los dos aislados de *Trichoderma* spp, obtenidos de la micoteca del Laboratorio de Bicontroladores de la Escuela de Agronomía, sede ITCR en San Carlos. El diseño de este ensayo correspondió con el de Bloques Completos al Azar. Se evaluaron cuatro tratamientos con tres réplicas (Cuadro 4), cada unidad experimental conformada por 20 rametos, para un total de 480 rametos.

Cuadro 4. Tratamientos evaluados durante la medición del efecto de dos aislados de *Trichoderma* sobre el crecimiento radicular de miniestaquillas de teca y melina

Tratamiento	Descripción	Ingrediente activo	Concentración
T1	Testigo Absoluto	Agua destilada	
T2	Conidios	<i>Trichoderma</i> spp. Aislado LabBio TD37	1x10 ⁹ conidios/ml
T3	Conidios	<i>Trichoderma</i> spp. Aislado LabBio TD5	1x10 ⁹ conidios/ml
T4	Conidios	<i>Trichoderma</i> spp. LabBio TD37 + LabBio TD5	1x10 ⁹ conidios/ml

En la figura 2 se muestra la distribución espacial de los tratamientos utilizados en este experimento.

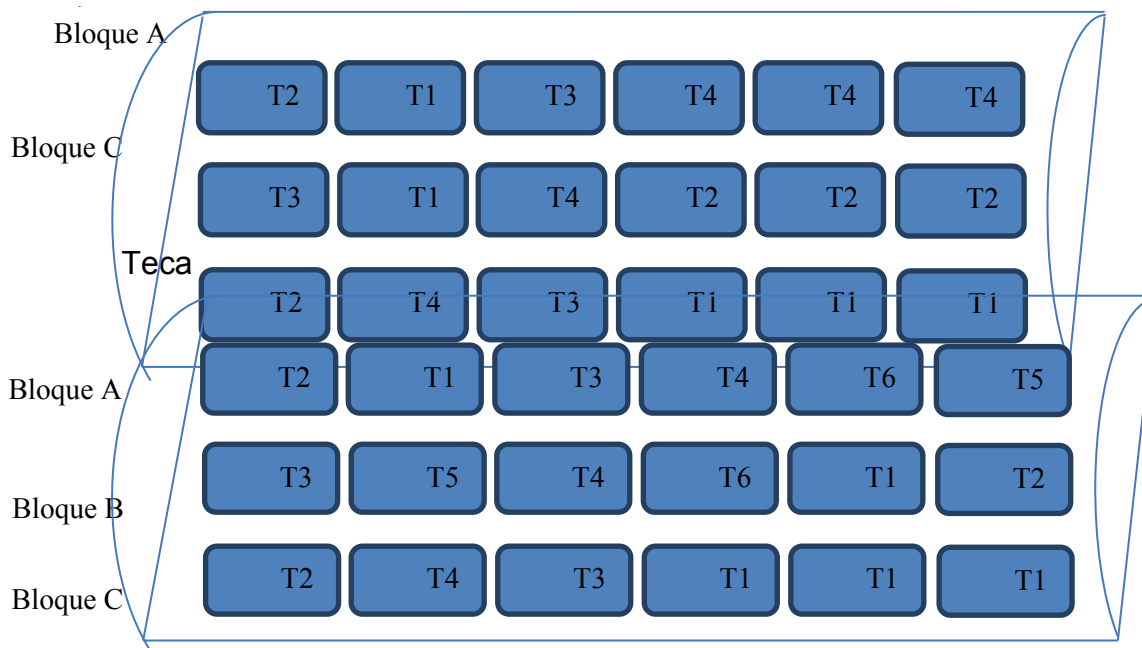


Figura 2. Distribución espacial de los tratamientos para evaluar el efecto de dos aislados de *Trichoderma* sobre el crecimiento radicular de miniestaquillas de teca y melina.

Como variables de respuesta se evaluó en las miniestaquillas número de raíces, longitud de raíces (a los 8 días), altura total (mm), diámetro al cuello (mm con ayuda de un vernier), área foliar (mediante imagen digital y medida con un escáner), peso fresco y peso seco de la parte aérea y de la sección de raíces (con balanza analítica al tercer dígito). El peso seco se obtuvo después de colocar las muestras a 72 horas continuas en horno a 65 °C.

C) Efecto de la aplicación de dos aislados de *Trichoderma* spp. sobre la acumulación de biomasa en teca y melina en etapa de vivero.

Se evaluó el efecto de la aplicación de fertilizante foliar Bayfolan Forte® (5cc por litro), de dos aislados de *Trichoderma* (LabBio TD₃₇ y LabBio TD₅) y la combinación de ambos factores (cuadro 5). La aplicación de la fertilización, así como la de los aislados de *Trichoderma*, se realizó de forma dirigida hacia el follaje y sustrato de la plántula, mediante una bomba manual de ocho litros de capacidad y una boquilla tipo cónica de 1,2 l/min de caudal de emisión.

Cuadro 5. Tratamientos aplicados a miniestaquillas de teca y melina para evaluar su efecto en el desarrollo en etapa de vivero.

Tratamiento	Descripción	Ingrediente activo	Concentración
T1	Testigo Absoluto	Agua destilada	
T2	Conidios	<i>Trichoderma</i> spp. Aislado LabBio TD ₃₇	1x10 ⁹ conidios/ml
T3	Conidios	<i>Trichoderma</i> spp. Aislado LabBio TD ₅	1x10 ⁹ conidios/ml
T4	Conidios	<i>Trichoderma</i> spp. Aislados LabBio TD ₃₇ + LabBio TD ₅	1x10 ⁹ conidios/ml
T5	Conidios	Testigo de promisorio 1	1x10 ⁹ conidios/ml
T6	Conidios	Testigo de promisorio 2	1x10 ⁹ conidios/ml
T7	Conidios	Promisorio 1	1x10 ⁹ conidios/ml
T8	Conidios	Promisorio 2	1x10 ⁹ conidios/ml

En este ensayo se utilizó un diseño de parcelas divididas con tres bloques como repeticiones y ocho tratamientos. La parcela mayor (A y B en la figura 3) consistió en el uso del fertilizante, mientras que la parcela menor los dos aislados de *Trichoderma*. Cada unidad experimental estuvo compuesta por 20 plantas, para un total de 480 plantas por especie.

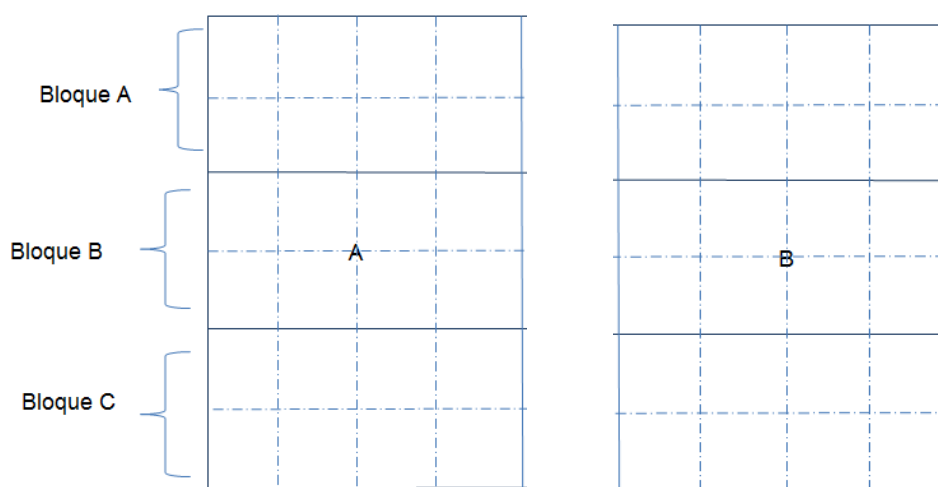


Figura 3. Representación del ensayo de uso de fertilizante foliar y dos aislados de *Trichoderma* para evaluar su efecto en el desarrollo de las plantas de teca y melina en etapa de vivero.

El modelo utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk}: \mu + \beta_i + G_j + (\beta_i G)_{ij} + P_k + (G+P)_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

Donde,

Y_{ijk} = observación correspondiente a la i -ésima unidad experimental que recibió el i -ésimo efecto de bloque, el j -ésimo efecto de parcela principal, más el efecto de la k -ésima subparcela, más la interacción entre parcela principal y subparcela.

\bar{X} Media general.

β_i = efecto del i -ésimo bloque.

G_j = efecto del j -ésima parcela principal

$(\beta_i G)_{ij}$ = error de la parcela principal

P_k = efecto del k -ésima subparcela

$(G+P)_{jk}$ = jk -ésima interacción entre parcela principal y subparcela

ϵ_{ijk} = efecto del e -ésimo error experimental aleatorio

Las plantas fueron evaluadas a los 15 días de iniciado el experimento. Como variables de respuesta se evaluó longitud de raíces (a los 8 días), altura total (mm), diámetro al cuello (mm con ayuda de un vernier), área foliar (mediante imagen digital y medida con un escáner), peso fresco y peso seco de la parte aérea y de la sección de raíces (con balanza analítica al tercer dígito). El peso seco se obtuvo después de colocar las muestras a 72 horas continuas en horno a 65 °C.

D) Evaluación de la severidad de la pudrición del tronco de *Gmelina arborea* Roxb.

Con base en una serie de ensayos clonales de melina establecidos en el cantón de Osa, Puntarenas, se establecieron ensayos de manejo de la enfermedad de la melina mediante la evaluación del uso de *Trichoderma* spp junto con la aplicación de un raleo. Los ensayos clonales se establecieron en octubre del 2008, y julio y octubre del 2010 en finca La Amapola, Finca Puntarenas (coordenadas latitud norte 8,5646° y longitud oeste 83,3104°), Yadira y Susana (coordenadas latitud norte 8,6090° y longitud sur 83,4407°). La zona de vida correspondiente es la de Bosque Muy Húmedo Premontano transición a Basal, con precipitaciones media anual entre 3000 a 6000 (mm/año), temperaturas promedio anuales de 22 a 28 C°, un brillo solar entre 5 a 7 horas, y el orden de los suelos es una mezcla entre inceptisoles y entisoles (Rojas 2011). En la preparación de los terrenos se utilizó dos veces una rastra y así generar camellones; mientras que los drenajes se elaboraron manualmente por medio de palín y pala, así como la preparación de la siembra. Las plantas se establecieron a 4 x 4 m de distanciamiento.

Determinación de las categorías de severidad.

Se realizaron visitas a campo para determinar mediante la observación y discusión *in situ*, los síntomas expresados en los árboles de melina. Bajo criterio técnico de expertos en manejo de plantaciones forestales y en fitopatología, así como de productores de melina en el Pacífico sur de Costa Rica, se discutió el comportamiento y las características más evidentes de los síntomas iniciales, intermedio y finales que expresan los árboles enfermos.

Derivado de la discusión y análisis, se determinó la importancia que cada categoría debe estar acompañada de acciones de manejo silvicultural para el control y minimización de los efectos negativos del agente causal en las plantaciones de melina. Estas acciones se fundamentaron en la densidad de árboles afectados por área plantada en función a la severidad de ataque presentada por cada individuo.

Las categorías de severidad se establecieron especialmente por características cualitativas que presentaron los árboles enfermos. En la observación de campo se identificó los síntomas iniciales hasta la muerte de los árboles. Cada árbol evaluado cuenta con valor de un 100% del cual se designaron cinco categorías, la **categoría 1** o 0% afectado se asigna cuando los árboles se observaron sanos sin presencia alguna de síntomas característicos del agente causal, la **categoría 2** expresó los primeros síntomas como marchites evidente acompañada de pérdida de hojas y aparición de pequeños "lloraderos" y rebrotes en la base o periferia de los mismos, a lo que se calificó con un 25% del árbol afectado.

El aumento en la severidad de los síntomas estableció las restantes categorías, donde un 50% correspondió a la **categoría 3** que evidenció rebrotes desarrollados, aumento de la savia liberada en los "lloraderos" y un diámetro más expuesto de las zonas necrosadas y exposición de la estructura leñosa, así como la pérdida de un 90% a total del follaje. La **categoría 4** representó a la afectación del 75% del árbol, caracterizado por la muerte descendente producto de la pudrición que sufre en general el árbol, donde la zona cancerosa (cancro) se ha podrido y así también la parte leñosa del árbol comienza a morir. Por último, el árbol muere en pie lo que correspondió a un nivel de severidad del 100% y una **categoría 5**.

Utilización de la escala de severidad en la evaluación de plantaciones comerciales.

La evaluación de las plantaciones incluyó la medición de variables dependientes tales como posición sociológica y calidad de trozas. Esto se realizó mediante la adaptación de la metodología "*Evaluación de la calidad y estimación del valor en pie de la plantación forestal*" propuesta por Murillo y Badilla (2004) donde se realizó un peritaje de la calidad de la plantación. De cada árbol evaluado se registró en detalle presencia de marchitez (de manera binomial), pérdida foliar, cancro, exudación, rebrotes, pudrición, y finalmente, la variable integradora denominada severidad del árbol, calificada en una

escala de 1 a 5. De manera adicional se registró la posición sociológica con números arábigos, donde “1” le correspondió a un árbol suprimido, mientras que un “4” a un árbol dominante. Finalmente se anotó la calidad de las cuatro primer trozas comerciales potenciales (2,5 m cada troza) que dispone el árbol, esta evaluación es de 1 a 4 donde: 1 (Excelente) la primer troza no presenta defecto alguno en forma, inserción de ramas y estado fitosanitario, 2 (Muy Buena) la troza tiene defectos leves que disminuyen pero no limitan severamente su potencial, 3 (Aceptable) tiene limitaciones severas pero permite aprovechar un 50% del fuste, con problemas fitosanitarios, 4 (Sin valor comercial) son trozas que presentan bifurcación a muy baja altura, problemas fitosanitarios, grano en espiral, útiles únicamente para leña.

El levantamiento de la información se realizó mediante un censo de cada uno de los siete ensayos. El equipo de trabajo fue conformado por tres personas, dos evaluaron datos dasométricos y una misma persona evaluó la severidad, posición sociológica y calidad. Durante este proceso se recopiló las diferentes expresiones sintomatológicas por medio de fotografías.

La digitalización de la información se realizó en una hoja de EXCEL, donde se depuró y verificó la información colectada en el campo. Esta fue adaptada al croquis de la distribución de los clones por ensayo con los datos de severidad y una distribución por color para cada categoría donde: 1=blanco, 2=beige, 3=mostaza, 4=papaya, 5=rojo.

Con la base de datos se determinó el índice de incidencia (ecuación 1) y el índice de severidad (ecuación 2) para cada uno de los clones en cada ensayo. Para efectos de facilitar el análisis e interpretación de los datos, el índice de severidad se transformó a una escala porcentual de 1 a 100 como se muestra en la ecuación 3.

$$I.I \% = \left[\frac{\Sigma enfermos}{\Sigma Total de Individuos} \right] * 100 \quad (1)$$

$$I.S = \left[\frac{\Sigma sv1*1 + \Sigma sv2*2 + \Sigma sv3*3 + \Sigma sv4*4 + \Sigma sv5*5}{\Sigma Total de Individuos} \right] \quad (2)$$

$$I.S \% = -1 * [(1 - I.S)/4] * 100 \quad (3)$$

La evaluación de cada árbol en los ensayos clonales registró las manifestaciones o síntomas de la enfermedad, calificadas de manera binomial o tipo presencia/ausencia (cuadro 6). Las evaluaciones incluyeron datos generales de los árboles como DAP, calidad de las primeras 4 trozas comerciales (de 1 a 4), posición sociológica (dominante, codominante, intermedio o suprimido) y las categoría de severidad (de 1 a 5).

Cuadro 6. Registro de las características dasométricas y de severidad.

Evaluador: _____ Fecha de Plantación: _____ Fecha Medición: _____

Árbol	Sintomatología y grado de Severidad									Otros datos del árbol						
	San	Mar	Pef	Can	Exu	Reb	Sec	Pud	Sev (1-5)	DAP (cm)	Pos Soc	Nº troza comer. (2,5m)	T1	T2	T3	T4
1						x	x		4	15,9	4	4	4	4	4	
2		x	x	x	x	x			3	21,3	2	1	3	3	3	4
3			x		x				2	14	3	3	2	1	2	
4								x	5	12,2	1	2	4	4	4	

San: Sano; **Mar:** Marchitez; **Pef:** Pérdida foliar; **Can:** Cancro; **Exu:** Exudado; **Reb:** Rebrote; **Pud:** Pudrición; **Sec:** Seco; **Sev:** Severidad; Posición sociológica (**PosSoc**): Dominante = 4; Codominante = 3; Intermedio = 2; Suprimido = 1; **T1** = calidad de la troza 1, **T2** = calidad de la troza 2; **T3** = calidad de la troza 3; **T4** = Calidad de la troza 4 (calificados en una escala de 1 a 4). **Fuente:** Elaboración propia.

E) Análisis de tolerancia genética a la pudrición del tronco

Se trabajó en una colección de ensayos establecidos entre el 2008 y el 2010 en el cantón de Osa, pacífico sur de Costa Rica donde se evalúan clones de melina (Cuadro 7). Los ensayos se instalaron en la localidad de Finca Puntarenas denominados como Finca Puntarenas norte y sur (FPN y FPS) en el cantón de Osa; La Amapola Norte y Sur (APN y APS) en localidad de La Palma de Golfito; Yadira Norte y Sur (YN y YS) en la localidad de La Palma de Golfito; Susana Sur (SS) en la localidad de Cañasa de Golfito. Los acrónimos asignados se utilizan para el resto del documento. Todos estos sitios se localizan entre las coordenadas Latitud Norte 8,56° a 8,60° y Longitud 83,31° a 83,44° (Murillo 2013). Los sitios corresponden con la Zona de Vida Bosque Muy Húmedo Premontano Transición a Basal, con precipitación media anual entre 3000 a 7000 (mm/año), temperaturas promedio anuales de 22 a 28 C°, una luminosidad entre 5 a 7 horas, y suelos inceptisoles y entisoles (Rojas 2011).

Cuadro 7. Ensayos clonales de *Gmelina arborea* establecidos en el Pacífico Sur de Costa Rica, utilizados en el análisis de tolerancia genética a la pudrición del tronco.

Características	APN	APS	FPN	FPS	YN*	YS*	SS*
Edad (años)	4,7	4,7	4,6	4,6	2,7	2,7	2,7
N árboles	292	255	213	206	621	1094	942
Cantidad de clones	11	12	12	11	19	29	27
Rametos/clon	27	21	18	19	30	35	32

Fuente: Elaboración propia con datos de ensayos

Las texturas de los suelos para Finca Puntarenas corresponden a Franco a Franco Arcilloso, y para los tres restantes ensayos el orden de suelo se encuentra entre Franco a Franco Arenoso y Franco Arcilloso (Murillo et al 2013). En la preparación de los terrenos se utilizó dos veces una rastra y se generaron camellones. Se construyeron drenajes manualmente, se fertilizó con 60 gramos por planta de 10-30-10. En Finca Puntarenas no se construyeron camellones (Murillo et al 2013).

El diseño experimental utilizado en los ensayos genéticos fue de Bloques Completos al Azar con seis bloques, cada clon fue representado por tres parejas de rametos separadas y ubicadas aleatoriamente en cada bloque (parcela). El distanciamiento de siembra fue de 4x4m. Los ensayos YN, YS y SS se instalaron con dos parejas de testigos correspondientes a material de semilla procedente de la colección del CACH y el CATIE. El modelo estadístico fue entonces:

$$Y_{ij} = B_i + T_j + B \times T + e$$

Donde:

B_i = el efecto fijo del i -ésimo Bloque

T_j = el efecto aleatorio del j -ésimo Clon

$B \times T$ = el efecto de la interacción del i -ésimo Bloque con el j -ésimo Clon

e = error experimental

La evaluación de todos los individuos de cada uno de los ensayos genéticos se realizó en función a las categorías de severidad propuestas por Salas et al. (en prensa). Como parte de la evaluación de los ensayos, se tomó en cuenta variables descriptivas de la plantación con el fin de relacionar la expresión del grado de avance de la enfermedad con criterios operativos de manejo, tales como el diámetro a la altura del pecho, la posición sociológica y la calidad del árbol en pie.

La información generada fue ordenada y analizada por el software SELEGEN (Resende, 2006) en una versión del 2010. Se utilizó el Modelo 2: $y = Xr + Zg + Wp + e$, donde “y” es el vector de datos, “r” es el vector de los efectos de la repetición sumados a la media general, “g” es el vector de los efectos genéticos, “p” es el vector de los efectos de la parcela, “e” es el vector de errores residuales. Las letras mayúsculas representan las matrices de incidencia para los efectos referidos (Resende, 2006). Con

ayuda de SELEGEN, se determinó los parámetros genéticos (heredabilidad, variación genética, etc.) y el potencial de mejoramiento genético contra esta enfermedad, para finalizar con la construcción de un ranking genético de tolerancia hacia la enfermedad.

8. Resultados

Objetivo específico 1: Aislar e identificar patógenos asociados al síndrome de la muerte descendente de la teca y a la pudrición del tronco de la melina.

1.1 Aislamientos e identificación de patógenos en *Tectona grandis*

Del trabajo de tesis de Fernández como parte del proyecto de investigación (Fernández, julio 2014, en preparación) se extrae la siguiente información. En medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) de los aislamientos se obtuvo tres colonias de hongos. A partir de los cultivos axénicos se determinó la existencia de diferencias en crecimiento aéreo del micelio. Una de las colonias obtenidas en los aislados mostró micelio con textura algodonosa, que conforme madura adquiere un color que puede variar de blanco a rosado pálido o lila, visto por la parte superior de la caja Petri; mientras que visto por la parte inferior pigmenta el medio de cultivo de color púrpura oscuro (Figura 4). La tasa de crecimiento a los 9 días de establecida la siembra fue de 7 cm de diámetro.

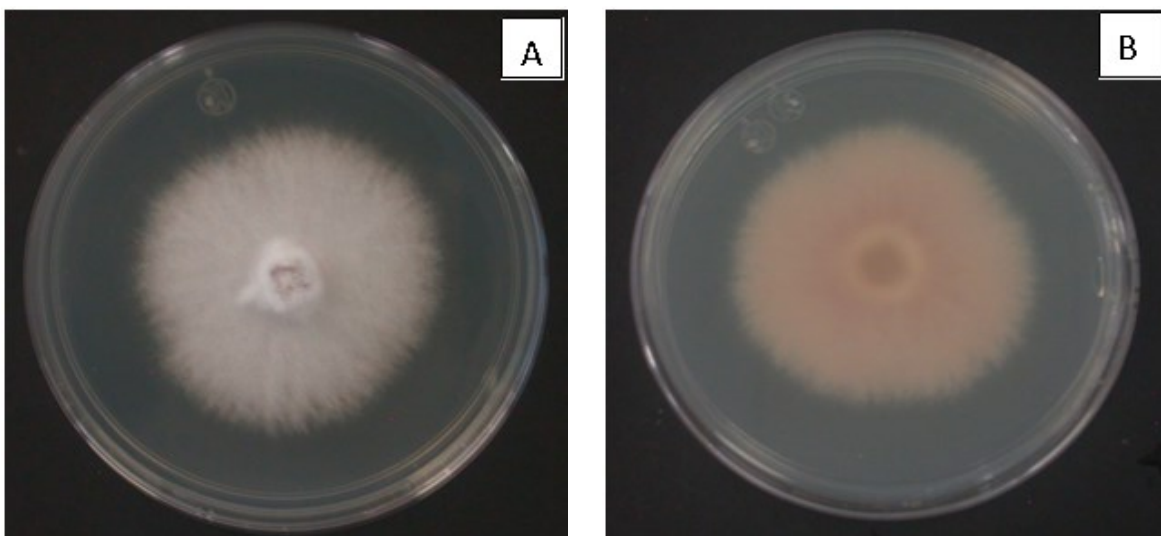


Figura 4. Cultivos axénicos en medio PDA de colonias obtenidas a partir de tejido de teca con el síndrome del decaimiento. **A:** Parte superior de la caja Petri. **B:** Parte inferior con coloración del medio color púrpura (Fernández, julio 2014, en preparación).

De esta cepa se elaboraron preparaciones fijas donde se observó hifas hialinas septadas, y estructuras especializadas con abundancia de microconidios. Estas poseen forma elipsoidal a ovalada, en fiálides laterales muy cortas. Macroconidios generalmente con tres a cinco septos, con forma de media luna ligeramente curvadas. En la mayoría de los cultivos las clamidosporas son abundantes (Figura 5A), éstas son grandes, hialinas y pueden observarse aisladas o agrupadas en parejas, intercalares o terminales.

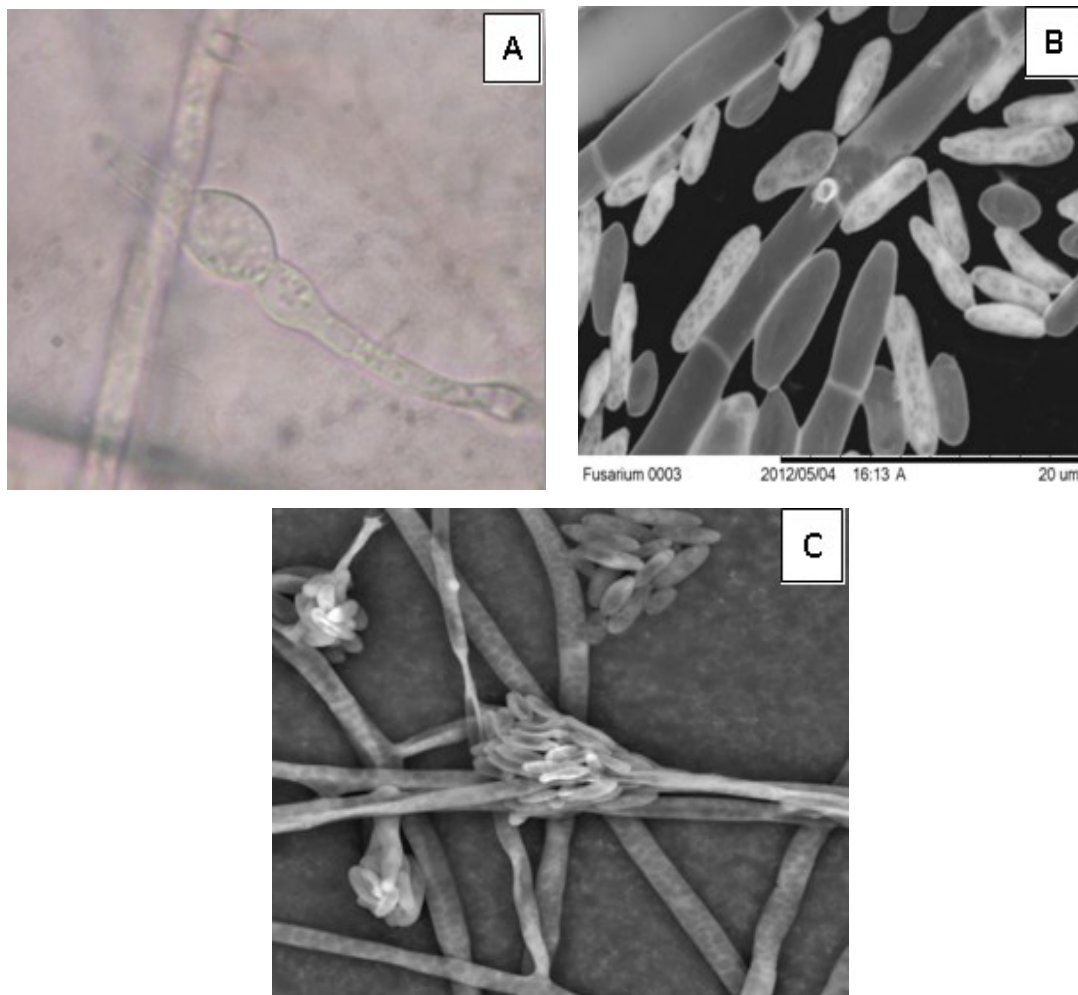


Figura 5. Estructuras morfológicas, características del género *Fusarium* spp, obtenida de aislamientos de raíces de teca con el síndrome de decaimiento. A: Clamidospora . B: Macroconidios y Microconidios.. C: Conidióforos.

Otra de las colonias muestra una tasa de crecimiento más lenta que la anterior (5 cm de diámetro a los 9 días). El crecimiento aéreo del micelio, en todos los aislados es de blanco a crema claro, con textura algodonoso suave. (Figura 6A-B) Presenta abundantes microconidios cilíndricos u ovalados los cuales pueden tener una división (Figura 6C), producidos en alargadas fialides que nacen lateralmente de las hifas, a veces son ramificadas (Figura 6C). Macroconidios se observan en menor cantidad que los

microconidios, tienen forma de media luna, presentan de uno a cinco septos, nacen de conidióforos cortos. Según Agrios (2005), esta espora es característica del género *Fusarium*

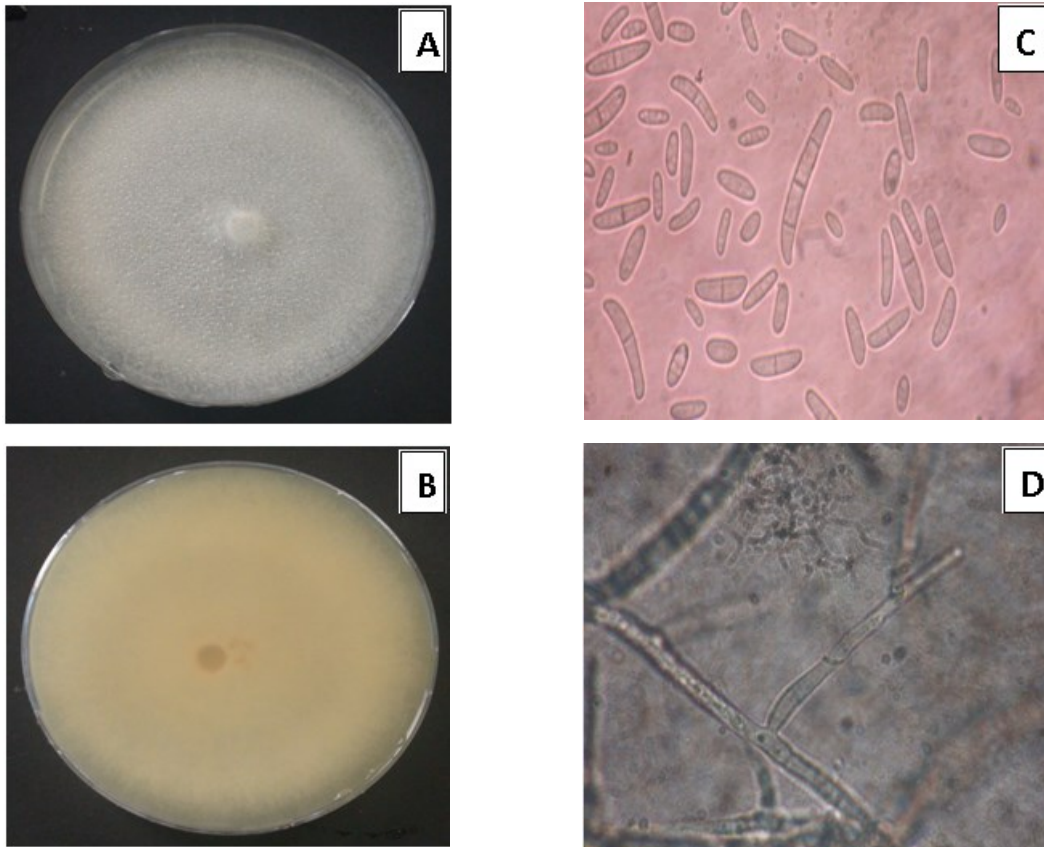


Figura 6. Cultivo axénicos de colonias obtenidas a partir de tejido lesionado de teca con el síndrome del decaimiento, cultivado en medio PDA (A–B). Estructuras morfológicas características del género *Fusarium* spp (C-D).

Se observó también colonias con micelio de textura áspero, de coloración café oscuro (figura 7), tanto en su parte inferior como en la superior del sector medio. Exhibió una tasa de crecimiento rápida, con un 100% de colonización a los 7 días de realizada la siembra. Observado en el microscopio se registró la presencia de hifas tabicadas e hialinas (Figura 8).

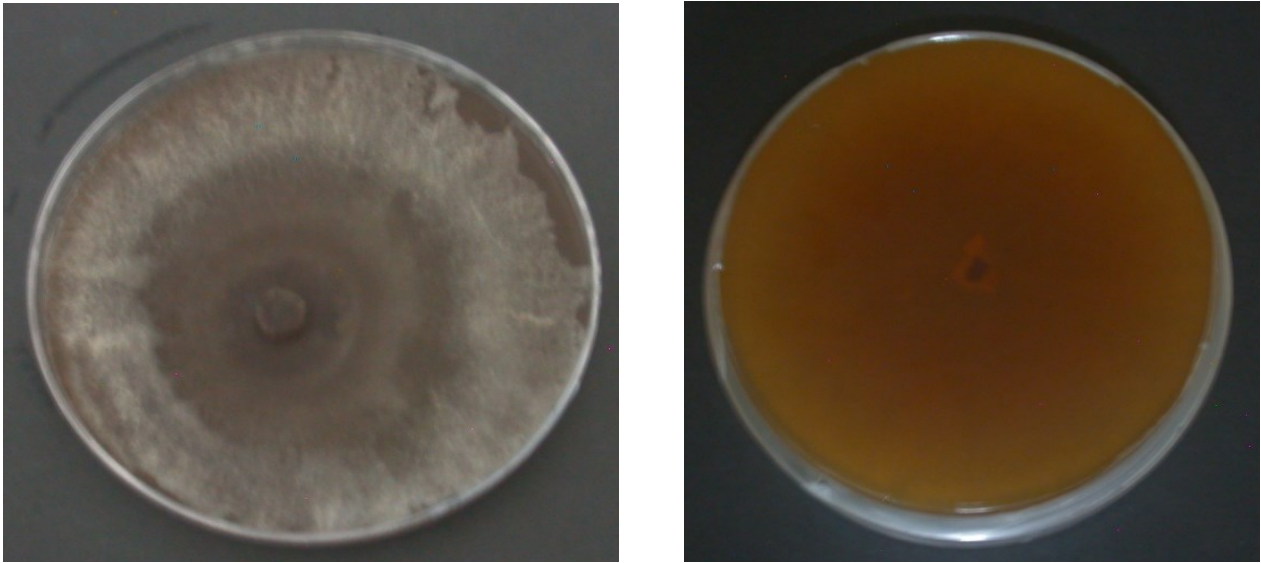


Figura 7. Cultivo axénicos de colonias obtenidas a partir del tejido de teca con síntomas de la muerte descendente, en medio PDA.

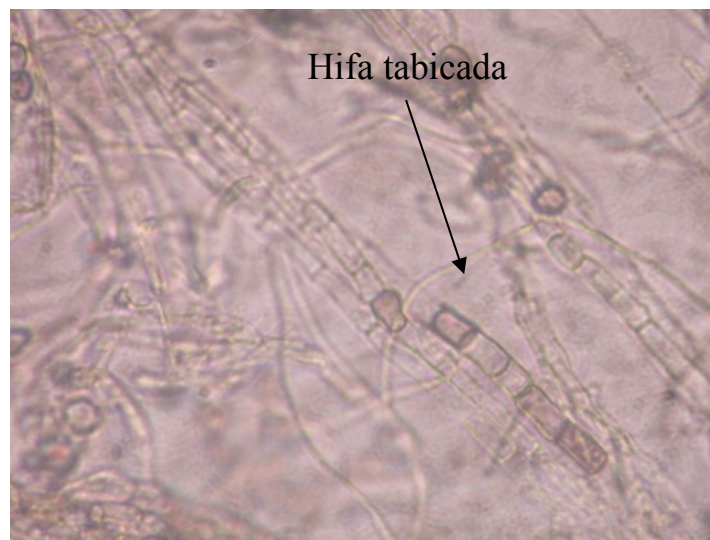


Figura 8. Estructuras morfológicas obtenida de aislamientos de raíces lesionadas de *Tectona grandis* con el síndrome del decaimiento.

Mediante la extracción de DNA, a partir de micelio fresco (Figura 9A) de cada uno de los aislados y del análisis de PCR (Figura 9B), se determinó que la cepa que pigmenta el medio color púrpura, en concordancia con los resultados según el BLAST (GenBank-NCBI), muestran que la secuencia obtenida tienen un **100% de similitud con *Fusarium oxysporum***. (Acc. No GU72513.1).

Se determinó también, que las colonias que no pigmentaban el medio muestran que la secuencia Forward corresponde a *Fusarium solani*. (Acc. No. EU912433.1) y la secuencia Reverse corresponde con *Nectria ipomoeae* (Acc. No. AB513849.1), su estadio reproductivo sexual. Por tanto ambos hongos están presentes en el cultivo. Para la cepa color café, los resultados según el BLAST muestran que la secuencia obtenida con un total de 540 nucleótidos tiene un 99% (en 502 de los nucleótidos) de similitud con muestras de *Xylogone sphaerospora* (Acc. No. GQ272626.1).

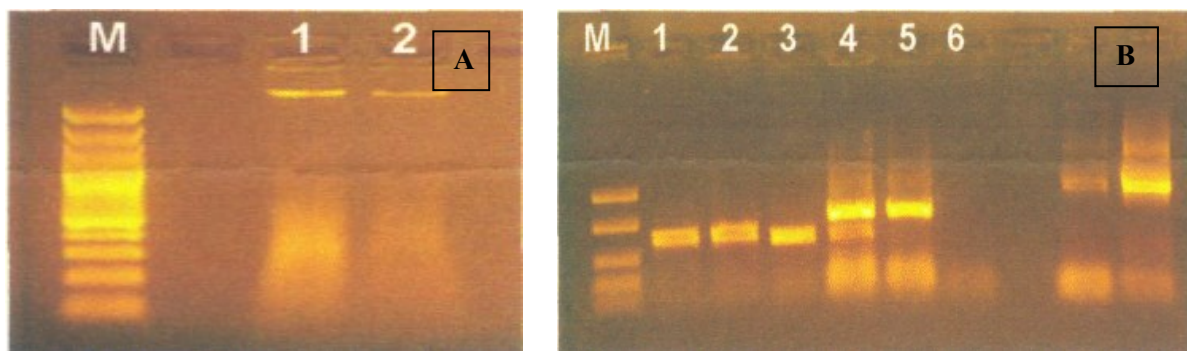


Figura 9. Panel A. Extracción del DNA, Línea1: desconocido **Panel B.** Fotografía de un gel de agarosa (0.8%) en el que se han separado diversas clases moleculares de DNA por electroforesis., 6: control negativo.

1.2 Aislamientos e identificación de patógenos en *Gmelina arborea*

En el caso de la melina, se logró coleccionar muestras de varios sitios del cantón de Osa y de Pérez Zeledón, así como plantaciones enfermas en Santa Clara, San Carlos. Al igual que con las muestras de teca y sus respectivos aislamientos, éstos fueron analizados en el Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección, del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos de la Universidad de Costa Rica, cuyo reporte se resume a continuación (Blanco, 2013).

Cuadro 8: Identificación taxonómica de aislados de lesiones en troncos y discos de madera posiblemente asociados a la pudrición del tronco de *Gmelina arborea* en Costa Rica

Identificación	Análisis de similitud
<i>Gibberella intermedia</i>	679 bases analizadas con 100% de similitud
<i>Fusarium proliferatum</i>	678 bases analizadas con 100% de similitud
<i>Fusarium solani</i>	715 bases analizadas con 98% de similitud
<i>Fusarium solani</i>	711 bases analizadas con 98% de similitud
<i>Fusarium solani</i>	711 bases analizadas con 98% de similitud

Como puede notarse, predomina el *Fusarium solani* en la mayoría de las identificaciones en ambas regiones del país.

Discusión sobre los aislamientos e identificación de los patógenos en ambas especies

De acuerdo con los reportes del Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección, del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos de la Universidad de Costa Rica, se puede resumir que en la teca se encuentran tres actores importantes:

Fusarium solani y *Nectria ipomoeae* (estadio reproductivo)

Xylogone sphaerospora

Fusarium oxysporum

Mientras que en la melina se reporta:

Gibberella intermedia

Fusarium proliferatum

Fusarium solani

En el caso de la teca, todas las muestras colectadas de lesiones en árboles en campo, provenían de raíces enfermas y de raspados del tronco o tallo, ligeramente debajo de la corteza. Ninguna de ellas provino de discos de madera con evidencia de obstrucción del sistema vascular causado por el crecimiento del patógeno. En el estado de Mato Grosso, Brasil, el Dr. Alfenas² () ha venido recolectando e identificando muestras en árboles de teca enfermos con la misma sintomatología observada en Costa Rica. Sin embargo, sus hallazgos identifican al patógeno *Ceratocystis fimbriata* como principal actor y con capacidad real de matar a árboles de tanto vigor y edad (mayores a 7 años de edad). En su argumentación, comenta que el *Fusarium* spp no suele ser tan virulento ni tan agresivo en especies forestales como si se reporta al *Ceratocystis* spp (Mafia *et al*, 2011). Tema que sin duda es materia de discusión, ya que otros autores reportan a distintos tipos de *Fusarium* spp como causantes de podredumbres, canchales de tallos, raíces y de síndrome de muerte súbita en muchos cultivos. Posiblemente, muestras tomadas de raíces enfermas y de lesiones avanzadas en tronco pudieron albergar mucho más actores patológicos, de los que verdaderamente son los causantes de la muerte acelerada de los árboles de teca. Como posible hipótesis para futuras investigaciones podría plantearse, que *Fusarium* spp es uno de los principales actores en la afectación general de los árboles de teca, en especial vía raíces debilitadas o muertas a causa de las condiciones severas de sitio (acidez del suelo, drenaje interno del suelo, entre otros, Arguedas *et al*. 2006). Su acción produce un debilitamiento general del árbol, que es aprovechada para que otros patógenos de mayor agresividad

² Patólogo forestal de la Univ. Federal de Viçosa, Brasil, comunicación personal, junio 2014

ingresen y causen su muerte en pocos meses. Para lograr su identificación, deberá obtenerse muestras de discos de madera a distintas alturas del árbol enfermo, discos que muestren claramente la obstrucción del sistema vascular y manchas causadas por el hongo. Ya que esta obstrucción es el efecto determinante en la muerte del árbol, por tanto, el o los patógenos presentes probablemente sean los verdaderos actores.

En el caso de la melina, es similar al patrón de patógenos observado en teca. Sin embargo, en melina si se tomaron muestras de discos de madera a varias alturas, de donde se aislaron muestras que fueron enviadas al laboratorio para su identificación. En melina, el patrón sintomático inicia desde el mes 7 de edad y su virulencia es mucho más agresiva, lo que provoca la pudrición total del árbol en unos pocos meses.

Conclusiones del objetivo 1

Puede concluirse, con respecto a este objetivo, que a pesar de los logros en la identificación de un buen número de actores que sin duda participan en la muerte de los árboles de teca y melina, posiblemente existan otros actores no identificados aún, que podrían ser los actores patológicos de mayor relevancia y peligrosidad. La experiencia acumulada será de enorme valor en futuros trabajos que sin duda deben continuar. La toma de muestras deberá ser mucho más focalizada, posiblemente muestras de madera a distintas alturas del árbol permitan identificar los patógenos de mayor interés, o también, corroborar los hallazgos encontrados en esta investigación a partir de la acción principal de *Fusarium* spp.

Objetivo específico 2: Determinar la patogenicidad de los agentes causales aislados y el desarrollo de un protocolo para la determinación de la tolerancia genética en clones de teca y melina.

Lamentablemente, los datos compilados no están todavía disponibles al momento de presentar este reporte final por parte de los investigadores responsables, por lo que no se dispone de sus resultados y no se puede realizar una discusión exhaustiva. Sin embargo, se presenta a continuación una discusión preliminar, basada en las observaciones más importantes y discusiones obtenidas con los investigadores responsables de estos objetivos.

Discusión preliminar con base en las observaciones de los experimentos

En este proyecto se logró establecer varios experimentos para desarrollar la metodología de inoculación de los patógenos aislados en plántulas de teca y melina. En ambas especies, los

experimentos se repitieron y se cambiaron de invernadero, con el fin de lograr obtener una mejor apreciación de los resultados.

Sin embargo, sobre los experimentos desarrollados se observó en teca, que la expresión de la enfermedad no fue evidente. No se observaron diferencias evidentes a simple vista entre los cinco clones utilizados como muestra, ni aparentemente entre los dos métodos de inoculación (por inyección al floema vs vía apertura de una herida en el tallo). Algunas posibles explicaciones puedan estar relacionadas con la dosis o concentración del patógeno empleada. Mafia et al. (2011) recomiendan utilizar no menos de 5 ml de inóculo ($2,5 \times 10^4$ esporas/ml) y esperar por al menos 30 días para observar los resultados. La edad de las plantas y su vigor es también importante. Por lo general se recomienda trabajar con plantas de al menos 60 días de edad (Mafia et al. 2011) y mantenerlas en potes suficientemente grandes que permitan su pleno desarrollo, todo en condiciones de ambiente protegido (invernadero). En esta investigación se trabajó en condiciones ambientales relativamente bien controladas, dado que las plantas inoculadas se mantuvieron en minitúneles. Sin embargo, el riego no fue automatizado, por lo que pudo haber influido en el estrés de las plantas en algunos momentos del experimento. Las plantas al final del experimento fueron cosechadas, seccionadas y pesadas para determinar diferencias en crecimiento (biomasa). De todas ellas se tomó una sección de tallo para verificar la presencia del patógeno inoculado, que en todos los casos resultó positivo. Por tanto, el método de la inyección pareciera ser el de mayor facilidad y rapidez de inoculación para futuros experimentos.

Por el contrario, en melina la expresión de los patógenos inoculados fue sumamente agresiva en algunos de los cinco genotipos utilizados. Claramente, todos los rametos de clones susceptibles murieron rápidamente, mientras que los demás tuvieron manifestaciones de marchitamiento pero no de muerte total. Probablemente en melina, dado su metabolismo y ritmo de crecimiento mucho más acelerado que el de teca, plántulas de menor edad (30 ó 45 días) sean suficientes para realizar este tipo de investigaciones.

Conclusiones y recomendaciones con relación al objetivo 2

A pesar de la información limitada, si es posible concluir sobre la necesidad de continuar con estos trabajos para lograr el objetivo final, cual es desarrollar una capacidad de ITCR, para evaluar y encontrar genotipos con resistencia genética a las enfermedades principales que aquejan a la teca y la melina en Costa Rica.

Se concluye que si es posible aislar, reproducir e inocular patógenos de *Fusarium* spp en teca y melina de manera operacional. Protocolos que deben ser refinados en futuras investigaciones.

En el caso de la teca, se deberá revisar la edad de las plantas utilizadas en estos experimentos, así como la dosis de inóculo, para tratar de mejorar la expresión rápida de la enfermedad en las plantas de los materiales evaluados.

Objetivo específico 3: Explorar la existencia de marcadores genéticos asociados a la tolerancia de genotipos de teca y melina a los patógenos aislados.

Lamentablemente, no fue posible obtener de los investigadores responsables de esta investigación la información sobre cuáles genotipos de teca y melina registraron mayor o menor resistencia a los patógenos que les fueron inoculados; por lo que no se dispone de sus resultados y no se puede realizar una discusión exhaustiva.

Sin embargo, si se dispone del trabajo realizado en el genotipo de los clones de teca y melina utilizados en las investigaciones de inoculación de patógenos.

Resultados y discusión de la identificación genotípica de los clones de teca y melina involucrados en los experimentos de inoculación de patógenos

En la figura 10 se muestra las bandas de ADN obtenidas luego del proceso de extracción con el kit DNeasy en *Gmelina arborea* y *T. grandis*. Debe destacarse, que estos son los primeros microsatélites que se utilizan y reportan en esta especie en el país, y probablemente a nivel internacional. Por tanto, estos resultados con melina son pioneros y sin duda, son una gran contribución a la genética de esta especie.



Figura 10. ADN en gel de agarosa en concentración al 1%, de los genotipos utilizados de *Gmelina arborea* y *Tectona grandis* en experimentos de inoculación de patógenos posiblemente involucrados en la muerte descendente de ambas especies. Las primeras seis muestras corresponden a *T. grandis* y las últimas seis a *G. arborea*.

En los cuadros 9 y 10 se muestra el genotipo obtenido para cada una de las muestras analizadas (*Gmelina arborea* y *T. grandis*, respectivamente) con los diferentes loci. Los espacios vacíos son especímenes que no mostraron amplificación con los procedimientos estándar seguidos.

Cuadro 9. Genotipo basado en cinco loci microsatélites, de cada uno de los clones de *G. arborea* utilizados en la investigación de inoculación de patógenos causantes de la pudrición del tronco de la especie en Costa Rica.

Genotipo	Locus 1		Locus 2		Locus 4		Locus 5		Locus 6	
57	112	281	207	207	217	217	335	335	284	284
315			166	292			284	317		
60	112	162	287	287			284	317	349	349
56	104	283			204	217	284	284	284	284
47	107	116	207	207					292	292

Del cuadro 9 puede observarse, de que a pesar de que se utilizaron solamente cinco microsatélites, en todos ellos hay suficiente polimorfismo (número de alelos diferentes), como para separar con claridad la identidad de cada uno de los cinco clones utilizados. Todos los loci investigados exhiben más de 3 alelos diferentes. Sin embargo, en el locus 1 se reportan los alelos 281 y 283, así como los alelos 104 y 107, de magnitudes muy próximas entre sí, que permiten pensar que podrían pertenecer a la misma banda. En el locus 2 la misma situación con los alelos 206 y 207; en el locus 4 con los alelos 216 y 217; en el locus 5 los alelos 283, 284 y 286. Estos valores de cada banda deberán ser verificados en un trabajo más exhaustivo.

Cuadro 10. Genotipo basado en siete loci microsatélites, de cada uno de los clones de *T. grandis* utilizados en la investigación de inoculación de patógenos causantes de la muerte descendente de la especie en Costa Rica.

Genotipo	AC28	AC01	A06	C03	F01	A11	B02
8x		227 227	202 202	272 272	177 177	233 233	198 198
22x	209 209			251 251	177 177	236 236	198 198
32	209 209	287 287	209 224	255 255	177 177	248 248	204 204
4		219 219	224 247	255 255	177 177	261 261	204 204
29e	263 263	227 227					

En el cuadro 10 se observa también suficiente polimorfismo para separar la identidad de los cinco clones utilizados. El locus AC28 registra los alelos 208 y 209 como sumamente próximos; el locus A06 con los alelos 224 y 225; el locus C03 con los alelos 255 y 256 y el B02 con los alelos 198 y 200. Al igual que se mencionó con la melina, estos valores de magnitud de banda deberán ser verificados

en trabajos más extensivos. El locus F01 no mostró polimorfismo en la población de los cinco genotipos utilizados en el experimento. Por tanto, su utilización es irrelevante para esta investigación y podrían dejar en 7 los loci efectivos. Sin embargo, este microsatélite no amplificó con el ADN del clon 29e, por lo que no se puede desechar aún hasta revisar si registra los mismos alelos 177 de manera monomórfica.

Los procedimientos de análisis de asociación entre datos moleculares (categóricos) vs datos de caracteres de expresión o rasgos deseables (tolerancia a enfermedades, por ejemplo, de tipo binomial), requiere de un trabajo estadístico cuidadoso. Debe recordarse que los datos de expresión reciben ya la influencia de los efectos ambientales, por tanto, un primer paso consiste en reducirlos o eliminarlos. Para esto es necesario el uso de software especializado, que permita separar los efectos ambientales de los efectos genéticos. El programa SELEGEN, desarrollado por Resende (EMBRAPA, Brasil) en los años 90, es una de las mejores opciones disponibles en esta temática (Resende et al. en prensa). Entonces, el procedimiento analítico requerido en este objetivo, fue desarrollado recientemente en el trabajo de tesis de posgrado en biotecnología de Rojas (2014), coinvestigadora en este proyecto, donde logró desarrollar varias opciones de medición de la asociación entre ambos tipos de datos. Lamentablemente, al momento de concluir con este informe, no se cuenta con la información sobre cuáles de los cinco genotipos de melina resultaron sensibles o tolerantes a los patógenos inoculados. Sin embargo, los procedimientos analíticos si fueron desarrollados, así como la determinación de los genotipos de todos los clones empleados. En futuras investigaciones, si se podrá entonces proceder con el análisis de estos dos tipos de datos para determinar cuáles clones son resistentes genéticamente.

Sin embargo, **en el objetivo cuatro, sí se logró por un método indirecto poder determinar la existencia de clones de melina altamente tolerantes y otros altamente sensibles a la enfermedad.** Por lo que **el proyecto en su conjunto, logra alcanzar uno de sus objetivos centrales**, cual es poder determinar la existencia de genotipos con potencial de resistencia genética a los patógenos de interés. Mayores detalles se presentan a continuación en los resultados del objetivo cuatro.

Conclusiones y recomendaciones

En ambas especies, el número de loci (microsatélites) y su polimorfismo permite discriminar claramente la identidad de los clones utilizados.

A pesar de que el equipo responsable en la sede San Carlos no aportó a tiempo la información de cuáles clones resultaron sensibles o tolerantes a los patógenos, los procedimientos analíticos si fueron desarrollados, así como la determinación de los genotipos de todos los clones empleados. En futuras investigaciones, si se podrá entonces proceder con el análisis de estos dos tipos de datos para determinar cuáles clones son resistentes genéticamente.

En el proyecto si se logró por un método indirecto. poder determinar la existencia de clones de melina altamente tolerantes y otros altamente sensibles a la enfermedad. Por lo que el proyecto en su conjunto y por otra vía, si logra alcanzar uno de sus objetivos centrales, cual es poder determinar la existencia de genotipos con potencial de resistencia genética a los patógenos de interés, tal y como se muestra en detalle en el objetivo cuatro.

Objetivo específico 4: Evaluar el uso de biocontroladores en la prevención y manejo de los patógenos asociados al síndrome de la muerte descendente de la teca y melina.

D) Evaluación de la severidad de la pudrición del tronco de *Gmelina arborea* Roxb.

Como un producto adicional de gran trascendencia, se desarrolló y validó una metodología de cómo evaluar la severidad de la pudrición del tronco de la melina, la que ya se convirtió en un artículo científico que será sometido a publicación en breve. A continuación se transcribe un resumen de sus elementos más importantes.

En el cuadro 11 se muestra como el patrón de progreso de los patógenos es concordante con las categorías de severidad de la enfermedad.

Cuadro 11. Comportamiento de los síntomas y su relación con el grado de avance y severidad de la pudrición del tronco en plantaciones de 2,7 años de edad de *Gmelina arborea* en el Pacífico Sur de Costa Rica.

Severidad	Árboles Evaluados	San	Mar	Pef	Can	Exu	Reb	Pud	Sec
1	2004	100%							
2	163		29%	52%	37%	29%	17%		
3	88		9%	77%	86%	68%	70%	3%	
4	163		0,6%	17%	29%	18%	94%	94%	
5	239								100%

San: sanidad; **Mar:** marchitez; **Pef:** perdida foliar; **Can:** cancro; **Exu:** exudados; **Reb:** rebrotes; **Pud:** pudrición; **Sec:** árbol seco.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 1 aparece un conjunto de fotografías que representan el patrón de síntomas de las cinco categorías de severidad de la pudrición del tronco en melina.



Figura 11. Principales síntomas de la pudrición del tronco de melina según su categoría de severidad en ensayos clonales en el pacífico Sur de Costa Rica.

En el cuadro 12 se resume y sistematiza la sintomatología observada para cada categoría de severidad propuesta, validada con la aplicación de la metodología en varios ensayos, de edades y condiciones de sitio diferentes. La escala se definió en cinco categorías, donde la categoría “1” correspondió con un árbol completa y visiblemente sano 0% de afectación, mientras que la categoría “5” le correspondió al árbol muerto o podrido en pie; sin ramas y con un proceso de pudrición avanzado que ha degradado inclusive la madera hasta dejarla sin ningún valor comercial. Las categorías de severidad “2”, “3” y “4” se asociaron a grados crecientes de manifestación de la enfermedad.

Cuadro 12. Escala diagramática para la categorización de la severidad de la pudrición del tronco de melina.

Severidad	Síntomas
1	Árbol sano, no hay evidencia de síntomas visibles.
2	Marchitez foliar evidente; fuste puede tener pequeñas heridas necrosadas y con exudación negra en sitios diferentes a donde hubo podas; puede iniciar la aparición de rebrotes. No todos los síntomas se expresan.
3	El árbol está visiblemente enfermo. Hay lesiones tipo cancro en la corteza con indicios de pudrición, exposición y abultamiento y de la corteza, exudación prominente; pérdida de más de un 50% del área foliar en un patrón progresivo; aparición de rebrotes; la madera puede tener un menor valor de utilización en aserrío debido al inicio del proceso de manchado por el hongo.
4	Afectación total del individuo que ya prácticamente ha muerto en pie; ausencia total de follaje; hay pérdida y desprendimiento evidente de ramas; aún se observan rebrotes en algunos sectores del tronco; la pudrición alcanza un 75% del tronco, donde la zona cancerosa (cancro) se manifiesta con claridad; la madera está seca y no tiene valor comercial para aserrío, debido a la mancha del hongo, aunque puede ser aprovechada como combustible u otros.
5	Árbol completamente seco, podrido; la madera ya perdió completamente su valor comercial.

Los resultados de la estimación del Índice de Incidencia de la enfermedad reflejan que de los siete ensayos evaluados, tres registraron porcentajes de incidencia en un tercio de los árboles en pie (Amapola Sur, Yadira Sur y Susana Sur en cuadro 13). Los materiales genéticos del Sur del país registraron en promedio una incidencia levemente superior a los materiales del Norte del país. Sin embargo, la severidad de la enfermedad en los materiales del Sur duplica a la de los genotipos del Norte.

Cuadro 13. Índices de Incidencia y Severidad de los ensayos de *Gmelina arborea* evaluados en el pacífico Sur de Costa Rica.

Índices	Ensayos							Promedio Norte	Promedio Sur
	AmaN	AmaS	YN	YS	FPN	FPS	SS		
Índice de severidad	18,58	24,80	1,13	20,68	5,92	2,16	22,58	8,54	17,55
Índice de incidencia	27,40	33,87	3,38	30,44	12,80	8,74	31,74	23,54	26,20

AmaN: Amapola Norte; **AmaS:** Amapola Sur; **YN:** Yadira Norte; **YS:** Yadira Sur; **FPN:** Finca Puntarenas Norte; **FPS:** Finca Puntarenas Sur; **SS:** Susana Sur.

Estos ensayos fueron raleados para reducir el avance de la enfermedad. Al aplicar los Índices de Severidad e Incidencia se determinó que los ensayos Yadira Norte y Yadira Sur registraron una disminución significativa en ambos parámetros como resultado de un manejo integrado de la

enfermedad (Cuadro 14). La intensidad del raleo fue de 35,26% para el lote Norte y 46,43% para lote Sur.

Cuadro 14. Efecto del raleo sanitario en los índices de incidencia y severidad de la pudrición del tronco en plantaciones de *Gmelina arborea*, Pacífico Sur de Costa Rica.

Índices	Yadira Norte		Yadira Sur	
	Antes	Después	Antes	Después
Severidad	1,13	0,87	20,68	6,7
Incidencia	3,38	2,74	30,44	14,85

Discusión

La propuesta metodológica de calificación de la severidad de la enfermedad de pudrición del tronco de la melina, ha demostrado ser objetiva, funcional y de fácil utilización. Las cinco categorías propuestas se adaptan bien a la sintomatología observada sistemáticamente en todas las plantaciones investigadas.

El comportamiento de los síntomas en los árboles evaluados presentó un patrón consistente en los siete ensayos evaluados, lo que evidenció la validez de la escala de severidad propuesta. Durante la realización del estudio no se presentaron discrepancias o ambigüedades en la asignación de ninguna de las categorías de severidad.

En el trabajo de Méndez (2011) se propuso una metodología de valoración de la enfermedad, la cual se enfocó en el comportamiento del follaje y en la aparición de rebrotes en el fuste en cuatro categorías. Sin embargo no se incluyó varios síntomas relevantes como la aparición de canchales, exudaciones en el fuste y pudrición del tronco, posiblemente por tratarse de una metodología asociada al uso de un sellador para cubrir las heridas generadas con las podas.

Si se analiza en el ensayo de 2,7 años de edad, la población de 163 árboles calificados como de severidad “2” registró el 29% con marchites y un 52% con pérdida foliar. Lo que evidencia la relevancia de utilizar la marchites y la pérdida foliar como los primeros signos de aparición de esta enfermedad en *Gmelina arborea*. Es importante destacar que esto puede variar en árboles de mayor edad, ya que se pudo observar en árboles de 4,7 años follaje completamente sano y presencia de rebrotes en el fuste, o pequeñas zonas con exudación y formación inicial del cancro.

En la aplicación de esta escala debe enfatizarse que con mayor seguridad de síntoma, la aparición de los "lloraderos" o zonas de exudación debe manifestarse en sectores del fuste distintas a los sitios donde se realizó una poda. Ya que en los sitios donde se realizó una poda, pueden ocurrir otros

procesos de cicatrización o de infección diferentes a la presencia de esta enfermedad y podrían confundir la calificación de la severidad.

Tal y como lo describe Arguedas et al (2004) los rebrotes emergen en la parte inferior del fuste donde se generó la zona de exudación y desarrollo del cancro. En el momento que los rebrotes obtengan un desarrollo considerable acompañado de una pérdida foliar mayor al 75% y la estructura cancerosa cubra la circunferencia del tronco se califica en severidad "3" ya que el proceso de pudrición es inminente.

En la categoría de severidad "4" la pudrición del tronco es tan avanzada que ha perdido totalmente su valor comercial para aserrío debido al manchado de la madera. Los rebrotes son una manifestación evidente del estrés severo que sufre el árbol. El árbol intenta sobrevivir y genera los rebrotes como un mecanismo de supervivencia. El patógeno actúa bloqueando el sistema vascular, lo que provoca que los fluidos internos busquen una salida que se manifiesta por medio de los exudados o lloraderos en el fuste, en un sector inmediatamente debajo de donde ocurre la interrupción o bloqueo del sistema vascular. Finalmente el árbol muere en su totalidad, la pudrición alcanza la máxima categoría de severidad "5" y se califica con un 100% de daño. Hay exposición y apertura de la corteza a lo largo de todo el fuste y un proceso generalizado de colonización de hongos xilófagos.

Aplicar esta escala diagramática de valoración de la severidad es relativamente sencilla, sin embargo el conocimiento y comprensión en la identificación de los síntomas es fundamental para su aplicación. La capacitación es esencial para reducir el grado de subjetividad y error humano en su aplicación. El error humano siempre va estar presente por el hecho de ser una evaluación visual, tal y como lo estipula la ley de Weber-Fechner (1860) ajustada por Horsfall & Barratt (1945) (Castaño 2002), de lo que se interpreta que la subestimación o sobreestimación va estar siempre presente en ejercicios de esta naturaleza.

Por medio del registro espacial de los árboles enfermos y su grado de severidad, se pudo visualizar patrones de avance de la enfermedad. Así como poder determinar posibles árboles con potencial de tolerancia genética al o los patógenos de interés. El análisis espacial permitió también apoyar la hipótesis de genotipos tolerantes al relacionarlos con el grado de severidad de sus vecinos inmediatos.

El uso de los índices de severidad e incidencia permitió valorar y calificar las plantaciones evaluadas de manera objetiva y cuantitativa, lo cual facilita la toma de decisiones en relación con su posible manejo. Estos parámetros permiten estimar el grado de avance de la enfermedad. En evaluaciones sucesivas en el tiempo, permite determinar el progreso de la patología o su valor epidemiológico. Los ensayos Amapola Norte y Yadira Norte se encuentran separados por una distancia de 150 m, y registraron valores de severidad e incidencia muy distintos, a pesar de compartir genotipos. Sin embargo, es importante mencionar que Yadira Norte es menor en edad con respecto a Amapola Norte (2,7 años vs 4,7 años) y con una densidad de 621 para Yadira Norte y 292 Amapola Norte, lo cual conforma el medio perfecto para que ocurra una epifitias a mayor densidad. Sin embargo Yadira Norte

presentó el índice de severidad e incidencia más bajo 1,13% y 3,38% respectivamente, a diferencia de Amapola Norte que registró un 18,58% de severidad y un 27,40% de incidencia.

El ensayo Yadira Sur reportó índices de severidad y incidencia de 20,68% y 30,44% respectivamente y se localiza contiguo al ensayo Yadira Norte. Posiblemente la procedencia Sur y Norte del país de ambas colecciones de clones (Yadira Sur y Norte respectivamente), pudo ser influenciada por las condiciones de suelo debido a que anteriormente se cultivó arroz, actividad que empobreció el terreno donde se plantaron los árboles. Yadira Sur tiene una densidad de 1094 árboles y Yadira Norte de 621 árboles, situación que expone de estrés a los árboles. Estos resultados son promisorios para la búsqueda de genotipos resistentes o tolerantes a estos patógenos. De manera similar, los ensayos Amapola Sur y Amapola Norte se establecieron de forma continua, pero registraron valores diferentes en los parámetros severidad e incidencia en suelos con las mismas condiciones a los anteriores, pero con una densidad menor (AmaN 292 y AmaS 255 árboles al momento de la evaluación), lo que quiere decir que la densidad no es una limitante para que el patógeno infecte los árboles.

En los ensayos Finca Puntarenas Norte y Sur se registró una severidad para el Norte de 5,9% y de 2,2 para el Sur, mientras que la incidencia en el lote Norte registró un 12,8% y un 8,7% en el Sur. Lo que muestra un patrón de mayor tolerancia a la enfermedad en el grupo de clones procedente de la zona Sur del país. A diferencia de los demás ensayos, Finca Puntarenas Norte y Sur fueron los únicos que se establecieron sin el uso de camellones o eras, sin embargo el sitio ya disponía de drenajes. Es importante también observar el uso anterior del suelo al establecimiento de estas plantaciones. Un uso anterior del suelo muy intensivo puede explicar un bajo rendimiento, así como posible contaminación con patógenos del suelo. Otros aspectos como, la competencia que se genera entre árboles por una alta densidad y la no aplicación de raleos oportunos, así como un mal manejo de la acidez y nutrición, son factores inminentes de estrés que pueden ser decisivos en el desarrollo de la enfermedad.

La utilización de la escala de severidad y los índices de severidad e incidencia, fueron de gran relevancia en la determinación del efecto de la aplicación de un raleo en las plantaciones investigadas. Los resultados permitieron determinar el impacto directo y positivo del raleo en la reducción de la severidad e incidencia de ambos ensayos. Para el lote Yadira Norte, la severidad se redujo en un 23% y la incidencia en un 18,9%, mientras que para Yadira Sur la severidad disminuyó en un 67,6% y la incidencia en un 51,2%.

Conclusiones y Recomendaciones

La validación de la escala permitió identificar que la marchitez y pérdida foliar son los primeros síntomas que expresan los árboles en un primer estadio de avance de esta enfermedad. En un nivel de mayor progreso de la patología, se debe observar la aparición de exudaciones de savia y formación de cancro.

Para considerar la marchitez como síntoma se debe tomar en cuenta si la evaluación se realiza en época seca, ya que esta puede deberse a deshidratación. La pérdida foliar también tiene sus excepciones, de manera que es importante que el evaluador sea minucioso al momento de valorar la severidad en los árboles enfermos.

Los árboles de mayor edad tienden a tolerar más los efectos del patógeno ya que logran conservar por más tiempo su follaje, aún en un estado avanzado de severidad por lo tanto, el comportamiento de los síntomas entre ensayos varía en cuanto a la intensidad de frecuencia de un síntoma y otro, de manera que es importante tener en cuenta la edad de la plantación que se evalúe.

Las evaluaciones de tipo cualitativo siempre van a tener un grado de error humano, por lo tanto la capacitación es fundamental. El técnico o empleado forestal debe identificar claramente los síntomas que expresen los árboles evaluados, la evaluación fitosanitaria de carácter periódico es el principal indicador y ejercicio para reconocer y calificar los distintos síntomas.

El uso de los índices es un análisis sencillo y preciso para dar a conocer el diagnóstico de la plantación.

El sitio donde se establecieron las plantaciones tiene un efecto sobre los árboles con respecto al nivel de incidencia y severidad.

La evaluación periódica de las plantaciones es fundamental para determinar de manera temprana, posibles acciones silviculturales que permitan contener el avance de la infección en la plantación.

El uso de esta escala de severidad propuesta en distintas condiciones de sitio, así como la de los Índices de severidad e incidencia, permitirán su refinamiento metodológico.

La metodología propuesta mostró su facilidad de uso y capacidad de registrar de manera objetiva, los estadios del progreso de la pudrición del tronco de la melina. El uso de estos índices permitirá un manejo oportuno de la enfermedad y una disminución de pérdidas para los productores de melina.

E) Análisis de tolerancia genética a la pudrición del tronco

Los parámetros genéticos derivados de los ensayos analizados se puede observar en el cuadro 15 que existe una heredabilidad del genotipo promedio (h^2_{mc}) en severidad para los ensayos de FPN, YS y SS, donde YS refleja un nivel medio de heredabilidad, sin embargo FPN y SS obtuvieron un nivel alto de heredabilidad ($>0,6$). Los mismos ensayos son respaldados por la precisión de la selección de los genotipos (Acclon) con resultados mayores a 0,7. El coeficiente de variación genotípica para la severidad de los siete ensayos evaluados reflejó datos de interés en los ensayos FPN, YN, YS y SS, superando el 5% establecido para este parámetro para ser significativo.

Cuadro 15. Parámetros genéticos para la severidad en la pudrición del tronco de la melina en ensayos clonados en el pacífico sur de Costa Rica.

Parámetros	APN	APS	FPN	FPS	YN	YS	SS
Vg	0,005	0,0009	0,03	0,001	0,0001	0,093	0,121
Vparc	0,131	0,0130	0,07	0,129	0,0002	0,117	0,158
Ve	1,647	1,9228	0,37	0,236	0,0714	1,744	1,865
Vf	1,784	1,9367	0,48	0,367	0,0717	1,954	2,144
h2g	0,003	0,0005	0,07	0,003	0,0008	0,047	0,057
h2aj	0,003	0,0005	0,09	0,004	0,0008	0,050	0,061
c2parc	0,074	0,0067	0,16	0,352	0,0034	0,060	0,073
h2mc	0,029	0,0186	0,60	0,033	0,0361	0,577	0,632
Acclon	0,172	0,1365	0,78	0,183	0,1901	0,760	0,795
CVgi%	3,964	1,5832	15,10	2,649	0,7244	16,723	18,33
CVe%	55,70	28,135	29,87	34,84	9,166	35,068	34,257
CVr	0,071	0,0563	0,50	0,076	0,0790	0,477	0,535
PEV	0,005	0,0009	0,01	0,001	0,0001	0,039	0,045
SEP	0,068	0,0299	0,12	0,030	0,0074	0,198	0,211
Media	1,754	1,906	1,24	1,178	1,0449	1,821	1,901

Fuente: Elaboración propia.

Para los parámetros genéticos en la incidencia de los ensayos clonales el resultado muestra heredabilidad del genotipo promedio en los ensayos FPN, YS y SS, de los cuales SS presentó el nivel de heredabilidad más alto, los otros dos presentaron un nivel medio de heredabilidad. Nuevamente la heredabilidad es respaldada por la precisión de la selección de los genotipos, con la excepción del ensayo YS que dio como resultado 0,673 (cuadro 4), en el caso de FPN y SS si superan el nivel de significancia establecido. Con respecto al coeficiente de variación genotípica, este reflejo valores muy significativos para los ensayos FPN, YN, YS y SS, sin embargo este parámetro también reflejo en la variable de incidencia una alta variabilidad del ensayo FPS con un de 8,73% a diferencia del valor obtenido en severidad para este ensayo.

Cuadro 16. Parámetros genéticos para la incidencia en la pudrición del tronco de la melina en ensayos clonales en el pacífico sur de Costa Rica.

Parámetros	AmaN	AmaS	FPN	FPS	YN	YS	SS
Vg	0,0002	0,0001	0,0054	0,0001	0,0002	0,0058	0,0107
Vparc	0,0103	0,0043	0,0139	0,0046	0,0001	0,0111	0,0098
Ve	0,1798	0,1758	0,0935	0,0754	0,0323	0,1867	0,1926
Vf	0,1903	0,1802	0,1128	0,0801	0,0326	0,2036	0,2131
h ² g	0,0009	0,0007	0,0477	0,0008	0,0066	0,0286	0,0501
h ² aj	0,0010	0,0007	0,0543	0,0009	0,0067	0,0303	0,0525
c ² parc	0,0542	0,0239	0,1228	0,0571	0,0029	0,0545	0,0461
h ² mc	0,0104	0,0243	0,5227	0,0225	0,2389	0,4529	0,6316
Acclon	0,1021	0,1559	0,7230	0,1501	0,4888	0,6730	0,7947
CVgi%	4,8071	3,5213	57,2420	8,7357	43,388	25,247	32,542
CVe%	114,707	54,635	133,974	140,939	189,688	67,965	60,876
CVr	0,0419	0,0645	0,4273	0,0620	0,2287	0,3715	0,5346
PEV	0,0002	0,0001	0,0026	0,0001	0,0002	0,0032	0,0039
SEP	0,0132	0,0109	0,0506	0,0080	0,0128	0,0565	0,0627
Media	0,2760	0,3139	0,1281	0,0929	0,0339	0,3023	0,3174

El cuadro 17 presenta la correlación genética de severidad con: diámetro, altura total y posición sociológica para todos los ensayos. Reflejó una correlación inversa de posición sociológica con la severidad para todos los ensayos a excepción de FPS, además los ensayos FPN y SS obtuvieron correlación inversa con la variable de altura, en ambos casos valores significativos ($r = 0,8$ y $r = 0,67$) respectivamente indicando a menor altura mayor severidad. Sin embargo para los ensayos de FPS y YS se presentó una correlación positiva siendo significativa únicamente para YS.

Cuadro 17. Correlaciones genéticas para la variable de severidad relacionada con diámetro, altura total y posición sociológica para todos los ensayos clonales de melina en el pacífico sur de Costa Rica.

Caracteres	APN	APS	FPN	FPS	Prom Edad	YN	YS	SS
DAP	-0,053	-0,299	-0,159	0,143		-0,055	0,614	-0,02
Altura total	-0,057	-0,218	-0,804	-0,166		-0,377	-0,332	-0,67
PosSoc	-0,614	-0,453	-0,679	-0,226		-0,481	-0,553	-0,83

Fuente: Elaboración propia.

El ranking genético para todos los clones dio como resultado los genotipos de baja susceptibilidad, media y alta, los cuales son enumerados del 1 al 29 más dos testigos (T1 y T2). Para el caso de la procedencia sur y norte se seleccionó los cinco mejores y cinco peores como los más representativos de este resultado (cuadro 18). Estos fueron seleccionados a partir del valor obtenido del ranking genético derivado del análisis con SELEGEN, los clones fueron incidentes en su resultado en más de un ensayo, lo cual les concedió el valor de importancia para ser identificados como bajos o altos en susceptibilidad a la pudrición del tronco de la melina.

Los clones seleccionados para la procedencia del sur de baja susceptibilidad, el que mejor representatividad tuvo fue el 19 ya que fue evaluado en los cuatro ensayos establecidos con esta procedencia. El menos representativo fue el 25 que se reportó solamente en un ensayo, los tres clones restantes se evaluaron en dos ensayos. Los clones 11, 12, y 13 identificados de alta susceptibilidad identificados para la procedencia sur se evaluaron en los cuatro ensayos, el 15 y 18 solamente en dos de los ensayos.

Cuadro 18. Mejor y peor susceptibilidad a partir del Ranking genético de cinco clones de cada procedencia de los ensayos clonales en el Pacífico Sur de Costa Rica.

Susceptibilidad	Procedencia Sur	Procedencia Norte
Baja Susceptibilidad	4	1
	8	4
	19	5
	25	11
	28	15
Alta Susceptibilidad	11	2
	12	3
	13	16
	15	19
	18	T1

Con respecto a la procedencia norte, los clones de baja susceptibilidad determinados por el ranking genético se evaluaron todos en los tres ensayos instalados con esta procedencia. Los identificados altamente susceptibles para la procedencia norte solamente el clon 2 y el 16 se evaluaron en los tres ensayos, los clones restantes se evaluaron solamente en un ensayo incluyendo el testigo.

En la figura 12 se muestra el comportamiento porcentual que tuvo cada clon en los ensayos de procedencia sur con respecto a la incidencia y severidad para todos los ensayos a partir de la aplicación de la escala de severidad. El comportamiento de estos resultados refleja que los clones 4,

19, 22 y 25 son los menos afectados por la pudrición del tronco de la melina. Se registró cinco clones (1, 6, 9, 15, 18) de alta incidencia y severidad sobrepasando el 30% de ambos valores.

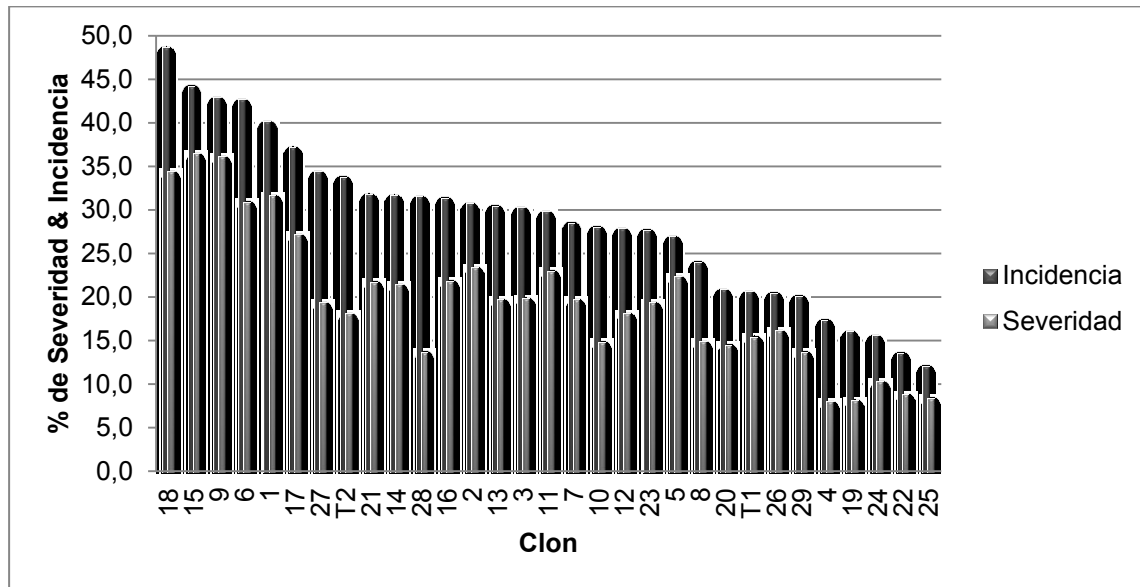


Figura 12. Porcentaje promedio de incidencia y severidad para los clones de procedencia sur de los ensayos genéticos en el Pacífico sur de Costa Rica.

A partir de la búsqueda de la procedencia más y menos susceptibles en el caso de los clones norte con respecto a la incidencia y severidad dio como resultado tres clones sin afectación alguna, así como tres clones que no reportaron porcentajes mayores al 5%. De manera inversa los clones 2 y 16 fueron los más afectados por la pudrición del tronco de la melina (figura 13) con resultados mayores al 15% tanto en incidencia como severidad. Los demás clones evaluados se comportaron en promedio a un 11,4% de incidencia y un 5,7% de severidad.

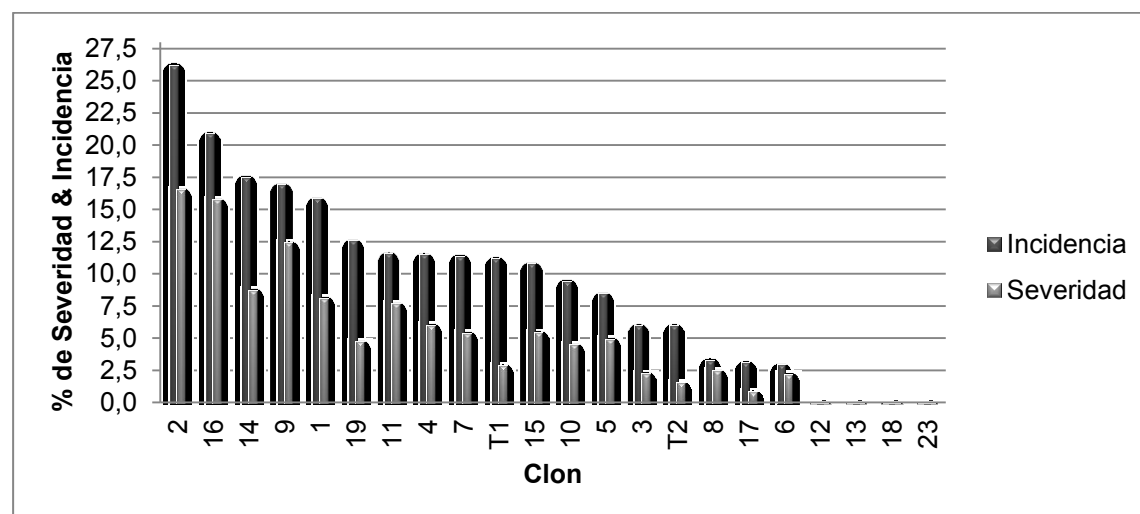


Figura 13. Porcentaje promedio de incidencia y severidad para los clones de procedencia norte de los ensayos genéticos en el pacífico sur de Costa Rica.

9. Conclusiones y recomendaciones

Como se demuestra en este trabajo, el método indirecto utilizado para la determinación de la sensibilidad genética a la enfermedad de la pudrición del tronco de la melina, es viable, funcional y de fácil aplicación. Más importante aún, los resultados muestran la evidencia de que si es posible encontrar genotipos con un alto grado de tolerancia a los patógenos investigados.

Estos resultados son sumamente promisorios, ya que permiten determinar, que con el uso de material genético tolerante, junto con acciones como la del uso preventivo de la *Trichoderma* spp y la aplicación de raleos oportunos, el grave problema de la pudrición del tronco de la melina puede ser manejado en una proporción adecuada, por debajo del umbral económico de la enfermedad.

10. Literatura citada

- Arguedas, M; Chaverri, P; Verjans, JM. 2004. Problemas fitosanitarios en teca (*Tectona grandis* L.f.) en Costa Rica. Revista Forestal Centroamericana 41: 131-136.
- Arguedas, M; Mata, R; Herrera, W; Arias, D; Calvo, J; Salas, B. 2006. Síndrome de Decaimiento Lento de la Teca en Costa Rica. Segunda Etapa. Cartago, CR, Escuela de Ingeniería Forestal, Centro de Investigación en Integración Bosque-Industria. 186 p.
- Arguedas, M; Quirós, L. 1997. Experiencias y perspectivas del manejo de plagas forestales en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas 45: 34-42.
- Arguedas, M; Chaverri, P; Miller, C. 1995. Cancro Nectria en especies forestales. Cartago, Costa Rica, ITCR-CIT. 8 p. (Serie Plagas y Enfermedades Forestales N°18).
- Badilla, Y.; Murillo, O.; Azofeifa, M.; Obando, G. 2003. Avances en Reforestación Clonal en Costa Rica. En: V Congreso Forestal Nacional. 17-19 de setiembre del 2003. San José, Costa Rica.
- Castaño, J. 2002. Principios básicos de Fitoepidemiología. Ed. LF Escobar Velásquez. Manizales, CO. Universidad de Caldas. 389p.
- Chacón, P; Murillo, O. 2005. Análisis comparativo de la producción de minijardines clonales hidropónicos y jardines clonales en tierra de melina (*Gmelina arborea* Roxb.). Kurú: Revista Forestal 2(6):7 p.
- Chaves, E; Fonseca, W. 1991. Teca, *Tectona grandis* L.f., especie de árbol de uso múltiple en América Central. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 47 p. (179).
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación IT). 2002. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2002: Informe principal. Roma. 468 p.
- Francesco A., Ruilova S. 2011. Experiencias de control biológico y cultural de plagas forestales en Chile, con énfasis en *Sirex noctilio*. En: Chavarriaga D. M. (ed) Protección Fitosanitaria Forestal. Instituto Colombiano Agropecuario, Colombia.

- Hocking, D. 1968. Stem canker and pink stain of Teak in Tanzania associated with *Fusarium solani*. Plant Disease Reporter 52:628–629.
- Hodgge, G.R.; W.S. Dvorak. 2000. Differential responses of Central American and Mexican pine species and *Pinus radiata* to infection by the pitch canker fungus. New Forests 19: 241–258.
- Mafia, R.G.; Alfnas, A.C.; Ferreira, E.M. e Binoti, D.H.D. 2011. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à Murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. Revista Árvore v.35, n.4, p.817-824. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Ingeniería Forestal. Cartago, Costa Rica. 49 p.
- Mafia, R.G.; Alfnas, A.C.; Ferreira, E.M. e Binoti, D.H.D. 2011. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à Murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. Revista Árvore v.35, n.4, p.817-824.
- Méndez, A. 2011. Evaluación de Tratamientos para el Manejo de *Nectriasp*. En Plantaciones de *Gmelina arborea* en Santa Rosa de Pocosol, Alajuela. Tesis Lic. Cartago, CR: TEC. Escuela de Ingeniería Forestal. 39 p.
- Mitchell, R.G.; Wingfield, M.J.; Hodge, G.R.; Steenkamp, E.T. and Coutinho, T.A. 2012. Selection of *Pinus* spp in South Africa for tolerance to infection by the pitch canker fungus. New Forests (2012) 43:473–489.
- Mohd, A; Lee, S; Maziah, Z; Rosli, H; Norwati, M. 2005 Basal Root Rot, a new Disease of Teak (*Tectona grandis*) in Malaysia caused by *Phellinus noxius*. Malaysian Journal of Microbiology .1(2):.40-45.
- Murillo, O y Badilla, Y. 2004. Breeding teak in Costa Rica. In: IUFRO Meeting. Forest Genetics and Genomics. 1 – 5 de noviembre. Charleston, South Carolina, USA. Li B. and McKeand S.: Forest genetics and tree breeding in the age of genomics-progress and future. Raleigh, North Carolina State University. 2004. P 105-110.
- Murillo, O. 1992. Diseño de un huerto semillero de *Gmelina arborea* para la producción de semilla certificada en la zona norte de Costa Rica. Tecnología en Marcha. Vol 11 (3): 51-58 p.
- Murillo, O. 2011. Estrategia de mejoramiento genético para la cooperativa GENFORES. Ponencia magistral. En: XII Congreso Nacional Colombiano de Mejoramiento Genético de Cultivos. Montería, Córdoba, Colombia. 22-24 de junio, 2011.
- Murillo, O. Badilla, Y. 2004. Evaluación de la calidad y estimación del valor en pie de la plantación forestal. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 51 p.
- Murillo, O.; Badilla, Y. 2012. Estado del mejoramiento genético de teca. En: II Simposio OLAT, 12-13 noviembre, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.
- Murillo, O.; Espitia, M. y Castillo, C. 2012. Fuentes Semilleras para la Producción Forestal. 1ª ed. Editorial Domar S.A.S. Bogotá, Colombia. 184 p.

- Murillo, O.; Guevara, V. 2013. Estado de los recursos genéticos forestales de Costa Rica. MINAET/FAO/CONAGEBIO, San José, Costa Rica. 159 pp.
- Murillo, O.; Wright, J.; Monteuis, O.; Montenegro, F. 2013. Capítulo 6: Mejoramiento genético de la teca en América Latina. En: De Camino, R.; Morales, J.P. (eds). Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades. Boletín Técnico 397. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 86-111 p.
- Murillo, O; Rojas, JL; Badilla, Y. 2003. Reforestación clonal. Cartago, CR, ITCR, Escuela de Ingeniería Forestal. 36 p.
- Murillo, R. 2013. Documentos de estudios de suelo de cada ensayo clonal (correo electrónico). Heredia, CR. Instituto de Investigación y Servicios Forestales. (E-mail: murillorafael5454@yahoo.com).
- Murray M.G; .Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Carnegie Institution of Washington, Department of Plant Biology, Stanford, CA 94305, USA. Volume 8 Number 19.
- Nitschke, E., Nihlgard, M., Varrelmann, M. 2009. Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, applying restriction fragment analysis of polymerase chain reaction–amplified translation elongation factor 1 α gene fragment. *Phytopathology* 99:921-929.
- Oficina Nacional Forestal. 2013. Usos y aportes de la madera en Costa Rica. Estadísticas 2012. Heredia, Costa Rica. 31 pp.
- Resende, M.D.V.; Murillo, O.; Badilla, Y. En prensa. Genética Cuantitativa y Selección en el Mejoramiento Genético Forestal. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 239 pp.
- Rojas, F. 2014. Uso de microsatélites para el análisis genético en una población de mejoramiento genético de *Tectona grandis* en Costa Rica. Tesis M.Sc. SEP, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica. San Pedro, Costa Rica. 79 pp.
- Rojas, N. 2011. Cuenca: ríos Península de Osa. (en línea). Puntarenas, CR. Instituto Meteorológico Nacional (IMN). 19p. Consultado 15 may 2013. Disponible en http://cglobal.imn.ac.cr/sites/default/files/documentos/cuenca_rios_peninsula_de_osa_1.pdf
- Roux, J.; Eisenberg, B.; Kanzler, A.; Nel, A.; Coetzee, V.; Kietzka, E.; Wingfield, M.J. 2007. Testing of selected South African *Pinus* hybrids and families for tolerance to the pitch canker pathogen, *Fusarium circinatum*. *New Forests* (2007) 33:109–123.
- Sage, L.F.; Kent, J.; Morales, J.P. 2013. Rentabilidad de las inversiones de teca. In: De Camino, R. y Morales, J.P. (eds.). Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades. CATIE Serie Técnica. Boletín Técnico No. 397. Turrialba, Costa Rica. Chapter 11, 202-225 pp.
- Salas, A. 2013. Evaluación y cuantificación del efecto de la *Nectria* sp. y la aplicación de métodos preventivos para su control en plantaciones clonales de melina en la zona sur de Costa Rica. Tesis Lic. Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Ambientales. Heredia, Costa Rica.

- Salas, R. 2012. Evaluación de un ensayo genético de *Gmelina arborea* en Siquirres, Limón. Tesis Lic. Ins
- Verhaegen, D; Ofori, D; Fofana, I; Poitel, M; Vaillant, A. 2005. Development and characterization of microsatellite markers in *Tectona grandis* (Linn.f). *Molecular Ecology Notes* 5: 945-947.
- Vallejo, A.; Castaño, C.J.; Zapata, F. 2013. Capítulo 13. Esquemas de manejo y productividad de inversiones en plantaciones de teca. En: de Camino, R; Morales, J.P. 2013 (eds). *Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades*. Capítulo 13 págs 246-263.
- Verhaegen, D; Ofori, D; Fofana, I; Poitel, M; Vaillant, A. 2005. Development and characterization of microsatellite markers in *Tectona grandis* (Linn.f). *Molecular Ecology Notes* 5: 945-947.
- Vinale F, Marra R., Sivasithamparam K., Ghisalberti EL., Marra, R., Woo, S., Lorito M. 2008. Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1-10.
- Vinale, F., Marra, r., Scala, F., Ghisalvert, E.L., Lorito, M.; Sivasthamparam, K. 2006. Major secondary metabolites produced by two comercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letter in Applied Microbiology* 43: 143-148.
- Volkaert, H.A. (Centre for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University Kampaengsaen Campus, Kampaengsaen, Nakorn Pathom, 73140, THAILAND) Unpublished Data.
- Volkaert, H.A. (Centre for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University Kampaengsaen Campus, Kampaengsaen, NakornPathom, 73140, THAILAND) Unpublished Data.
- Weaver, PL. 1993. *Tectona grandis* L.f. Teak. New Orleans, US, Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 18 p.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22:837-845.
- Zeaser, D. 1998. Programa de mejoramiento genético de la Ston Forestal en la zona sur de Costa Rica. En: Seminario. Aumento de la rentabilidad de las plantaciones forestales: un reto ligado al uso de semilla de alta calidad. San José, Costa Rica. 19 de mayo de 1998. sp.