

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS

Diagnóstico de los agentes causales de la muerte descendente de la teca (*Tectona grandis* L.f.) en plantaciones comerciales de Parrita y Pococí

Proyecto final de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Estudiantes:

Bach. Robin Delgado Mora

Bach. Arturo Valle Hidalgo

Tutor:

M. Sc. Alonso Calvo Araya

Asesores:

PhD. Ramón Molina Bravo

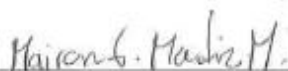
M. Sc. Allan González Herrera

Campus Omar Dengo

Heredia, Costa Rica, 2021

Proyecto final de graduación presentado como requisito para optar por el grado de
Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Miembros del Tribunal Examinador



M.Sc. Mairon Madriz Martínez
Representante del Decanato FCTM



Dr. Evelio Granados Carvajal
Director Escuela Ciencias Agrarias



M. Sc. Alonso Calvo Araya
Tutor del proyecto



M. Sc. Allan González Herrera
Asesor



PhD. Ramón Molina Bravo
Asesor



Bach. Robin Delgado Mora
Sustentante



Bach. Arturo Valle Hidalgo
Sustentante

DEDICATORIA

A Dios por brindarme la vida y la fortaleza para llegar a este momento de mi formación profesional.

A mi madre María y mi padre Robin, por su apoyo incondicional y sin los cuales no sería la persona que soy ahora.

A mi hermano Andrés por todo el apoyo que me brindó.

A mis amigos y amigas que me brindaron sus palabras de ánimo para seguir superándome cada día.

Robin A. Delgado Mora

Dedico el presente trabajo a Dios, ya que gracias a Él he logrado concluir el presente proyecto.

A mi madre María Flora Hidalgo Mora por tenerme presente en sus oraciones, por su apoyo, paciencia, esfuerzo y consejos para hacer de mí una mejor persona.

A mis amigos por los consejos que he recibido de cada uno de ellos y a todas las personas que de una u otra forma siempre me han brindado su ayuda.

Arturo Valle Hidalgo

AGRADECIMIENTOS

A nuestros profesores asesores M. Sc. Alonso Calvo Araya, PhD. Ramón Molina Bravo y M. Sc. Allan González Herrera, por sus valiosas contribuciones en el desarrollo de esta investigación.

Al personal del laboratorio de fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias, especialmente al Ing. Xavier Díaz Salazar por toda la ayuda brindada.

A la empresa Diamond Teak S.A. y al señor Marvin por su colaboración y permitirnos llevar a cabo esta investigación en sus plantaciones de teca.

Al Ing. Ricardo Luján de la empresa BARCA S.A. por la donación de los árboles de teca utilizados en esta investigación.

RESUMEN

La teca (*Tectona grandis* L.f.) es una de las especies maderables más cultivadas alrededor del mundo. Conforme la producción de cultivo maderable ha aumentado, también ha tomado relevancia una enfermedad conocida como muerte descendente de la teca, de la cual se informan niveles de incidencia del 13% en las plantaciones de teca en Costa Rica. Esta investigación se realizó en plantaciones comerciales de teca de las zonas de Parrita y Pococí, en donde se realizaron inspecciones fitosanitarias y la recolección de muestras de tejido vascular de ramas de árboles con la sintomatología de la muerte descendente. El diagnóstico de los agentes causales de la enfermedad se llevó a cabo basado en análisis morfológicos y moleculares. Asimismo, se determinó la patogenicidad de los hongos mediante los postulados de Koch y la severidad de las lesiones en árboles inoculados con los potenciales patógenos. Luego de realizar las inspecciones fitosanitarias en las plantaciones de teca, se determinaron niveles de incidencia de la enfermedad de 15.18% y 14.29% en plantaciones de Parrita. Para las plantaciones de Pococí, se encontraron niveles de incidencia de 6.63%, 9.64% y 7.83%. A partir de los aislamientos de hongos obtenidos de muestras de tejido vascular de ramas de teca, se identificaron morfológicamente hongos de la familia Botryosphaeriaceae y el análisis molecular de la región del espaciador transcrito interno (ITS) permitió identificar a *Neofusicoccum parvum* en una de las plantaciones de Parrita y varios hongos del género *Lasiodiplodia* en ambas zonas del estudio. Los aislamientos de *Lasiodiplodia* (Pc2 y Pc3) provenientes de Pococí, produjeron síntomas severos de necrosis y sus características fueron las mismas que las observadas en los primeros aislamientos. Para estos aislamientos el análisis molecular reportó dos posibles especies, las cuales fueron *L. theobromae* y *L. brasiliensis*. Estos permiten concluir que ambas especies son candidatas a ser los agentes causales de la muerte descendente en árboles de teca.

ABSTRACT

The teak (*Tectona grandis* L.f.) is one of the most widely cultivated timber species around the world. As timber crop production has increased, a disease known as "teak dieback" has also gained prominence, with reported incidence levels of 13% in teak plantations in Costa Rica. This research was carried out in commercial teak plantations in the Parrita and Pococí areas, where the diagnosis of the disease was based on morphological and molecular analysis of the pathogens. The pathogenicity and severity of the lesions caused by these organisms were also determined using Koch's postulates. From phytosanitary inspections in teak plantations, disease incidence levels of 15.18% and 14.29% were determined in plantations in Parrita. For the Pococí plantations, incidence levels of 6.63%, 9.64% and 7.83% were found. Of all the isolates obtained from samples of vascular tissue of teak branches with symptoms of downward death, fungi of the Botryosphaeriaceae family were morphologically identified. This was corroborated by molecular analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of the fungal DNA, from which *Neofusicoccum parvum* was identified in one of the Parrita plantations and several fungi of the genus *Lasiodiplodia* sp. in both study areas. The *Lasiodiplodia* isolates (Pc2 and Pc3) from Pococí produced severe symptoms of necrosis and their characteristics were the same as those observed in the first isolates. For these isolates, molecular analysis reported two possible species, which were *L. theobromae* and *L. brasiliensis*. These allow us to conclude that both species are candidates to be the causal agents of downward death in teak trees.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE ANEXOS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. El cultivo de la teca y su origen.....	4
2.2. Clasificación taxonómica y descripción botánica de la teca.....	4
2.3. Descripción botánica.....	4
2.4. Importancia económica del cultivo de la teca.....	4
2.5. Enfermedades del cultivo de la teca.....	5
2.6. La muerte descendente de la teca en Costa Rica.....	6
2.6.1. Síntomas de la muerte descendente de la teca.....	6
2.6.2. Patógenos asociados a la muerte descendente de la teca.....	6
2.7. Patogenicidad y postulados de Koch.....	7
2.8. Manejo de enfermedades en el cultivo de la teca.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Localización del estudio.....	9
3.2. Muestreo de material vegetal.....	9
3.3. Evaluación de la incidencia y sintomatología de la enfermedad en campo.....	10
3.4. Aislamiento de microorganismos fitopatógenos.....	10

3.5. Identificación taxonómica y caracterización morfológica de los microorganismos aislados	10
3.6. Identificación molecular	11
3.6.1 Extracción y purificación de ADN.....	11
3.6.2 Amplificación por PCR de la región ITS	11
3.6.3 Secuenciación.....	12
3.7. Pruebas de patogenicidad	12
3.8. Evaluación de la severidad	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1 Incidencia de la enfermedad en plantaciones de Parrita y Pococí	14
4.2 Aislamiento de microorganismos fitopatógenos	16
4.3. Identificación taxonómica y caracterización morfológica de los microorganismos aislados	16
4.4. Análisis molecular	25
4.5 Pruebas de patogenicidad y evaluación de la severidad	27
5. CONCLUSIONES.....	30
6. RECOMENDACIONES	31
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
8. ANEXOS.....	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la teca	4
Tabla 2. Principales patógenos asociados al cultivo de la teca en Centroamérica	6
Tabla 3. Localidades muestreadas en la investigación.....	9
Tabla 4. Perfil térmico utilizado para la amplificación de las regiones ITS en la PCR.....	12
Tabla 5. Nivel de incidencia de la muerte descendente de la teca en las fincas de las regiones de Pococí y Parrita.	15
Tabla 6. Aislamientos de hongos asociados a la muerte descendente en el cultivo de teca por localidad.	16
Tabla 7. Tasa de crecimiento de los de hongos fitopatógenos aislados	17
Tabla 8. Identificación molecular y análisis de similitud de los aislamientos de hongos de las plantaciones de teca de Parrita y Pococí.	26

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas de muerte descendente observados en árboles de teca. a) Clorosis y pérdida de follaje. b) Necrosis apical; c-d) Corte longitudinal y transversal de ramas con necrosis vascular. e) Pudrición en corteza.	14
Figura 2. Crecimiento diametral máximo (mm) de los aislamientos de hongos de Parrita (Pr1 y Pr2) y Pococí (Pc1, Pc2 y Pc3).	17
Figura 3. Colonias puras de los aislamientos de Parrita (Pr) y Pococí (Pc) al completar el crecimiento en el plato Petri.....	18
Figura 4. Colonias puras de los aislamientos de Parrita (Pr) y Pococí (Pc) a los 15 días de incubación.	18
Figura 5. <i>N. parvum</i> (Aislamiento Pr1). a) Colonia a los 30 días, sin picnidios. b) Hifa septada.	20
Figura 6. <i>Lasiodiplodia</i> sp. (Aislamiento Pr2). a) Colonia a los 30 días. b) Hifas septadas. c) Picnidios en acículas de pino. d) Picnidio. e) Conidios inmaduros. f) Conidio maduro.	21
Figura 7. <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (Aislamiento Pc1). a) Colonia a los 30 días. b) Hifas septadas. c) Picnidio. d) Conidio inmaduro. e) Conidio maduro.	22
Figura 8. <i>Lasiodiplodia</i> sp. (Aislamiento Pc2). a) Colonia a los 30 días. b) Hifas septadas. c) Picnidio. d) Conidio inmaduro. e) Conidios maduros.	23
Figura 9. <i>Lasiodiplodia</i> sp. (Aislamiento Pc3). a) Colonia a los 30 días. b) Hifas septadas. c) Picnidio. d) Conidio inmaduro. e) Conidios maduros.	24
Figura 10. Síntomas de muerte descendente en árboles inoculados con los aislamientos Pc2 y Pc3. a-b) Necrosis apical y marchitez. c) Necrosis en tallos.....	27

INDICE DE ANEXOS

Anexo A. Preparación de medio de cultivo PDA	41
Anexo B. Preparación de muestras para los aislamientos de tejido vascular de ramas de teca con síntomas de muerte descendente	42
Anexo C. Protocolo de extracción de ADN del Laboratorio de Técnicas Moleculares del CIPROC	43
Anexo D. Procedimiento para la inoculación de árboles de teca, en los Postulados de Koch.....	44
Anexo E. Análisis estadístico de ANOVA y comparación múltiple de Tukey de las tasas de crecimiento de los aislamientos de Parrita y Pococí.	45
Anexo F. Datos de crecimiento diametral y tasa de crecimiento de las cepas de hongos de Parrita y Pococí	46
Anexo G. Secuencias reportadas de la amplificación de las regiones ITS 4 e ITS 5 del aislamiento Pr1 de Parrita	47
Anexo H. Secuencias reportadas de la amplificación de las regiones ITS 4 e ITS 5 del aislamiento Pr2 de Parrita	48
Anexo I. Secuencias reportadas de la amplificación de las regiones ITS 4 e ITS 5 del aislamiento Pc1 de Pococí	49
Anexo J. Secuencias reportadas de la amplificación de las regiones ITS 4 e ITS 5 del aislamiento Pc2 de Pococí	50
Anexo K. Secuencias reportadas de la amplificación de las regiones ITS 4 e ITS 5 del aislamiento Pc3 de Pococí	51

INTRODUCCIÓN

El cultivo de teca (*Tectona grandis* L.f.) es una de las principales especies maderables utilizadas para la reforestación en zonas tropicales debido a sus características de excelente rendimiento, alta calidad y durabilidad (Baltodano, 2007). De acuerdo con Fernández (2014) esta especie forestal ha sido ampliamente distribuida en América Central principalmente por empresas multinacionales y pequeños productores, esto se debe a que las plantaciones de teca representan una actividad económica muy rentable en comparación con otras actividades del sector pecuario o agrícola.

En Costa Rica, el cultivo de la teca cuenta con una extensión de 47.167 ha (INEC, 2015), las cuales se encuentran establecidas mayormente en las provincias de Puntarenas, Guanacaste y en algunas partes de la zona norte del país (Martínez, 2015).

Conforme la producción de la teca se ha incrementado, una serie de plagas y enfermedades han ido tomando importancia, las cuales inciden directa e indirectamente en las plantaciones afectando los rendimientos productivos. Según Arguedas et al. (2019) a nivel nacional se han identificado 53 especies de insectos, 34 patógenos, 2 vertebrados y 4 muérdagos, como los principales problemas fitosanitarios asociados a este cultivo. Sin embargo, uno de los principales problemas que afectan al cultivo de la teca es la enfermedad conocida como “muerte descendente o decaimiento lento de la teca”, la cual se caracteriza por clorosis, pérdida del follaje y necrosis de la copa en un patrón descendente hasta provocar la muerte del árbol (Arias et al., 2005).

En Costa Rica, la enfermedad de la muerte descendente de la teca se ha observado en plantaciones con edades entre los 7 a 12 años, presentando niveles de incidencia de hasta un 13% anualmente. Dicha enfermedad se ha reportado principalmente en zonas con precipitaciones de alrededor de los 4000 mm anuales y con niveles freáticos elevados (Arias et al., 2005). Varios autores mencionan que esta enfermedad podría estar asociada a diferentes factores edafoclimáticos que favorecen el desarrollo de complejos fitopatológicos, los cuales ingresan a través del sistema radical del árbol y se translocan al tejido vascular provocando obstrucción e impidiendo el libre flujo de agua y nutrientes inorgánicos, causando la muerte del árbol (Arias et al., 2005; Arguedas et al., 2004).

La muerte descendente es una de las enfermedades más importantes que afectan a las plantaciones de teca a nivel nacional. Estudios fitopatológicos han reportado a diferentes especies de *Fusarium* Link ex Grey (Murillo et al., 2014; Arguedas et al., 2004; Balasundaran y Sankaran, 1991)

y *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst (Belezaca et al., 2018; Solano et al., 2019) en árboles con la sintomatología de la enfermedad. Asimismo, otras investigaciones también asociaron esta patología a hongos de la familia Botryosphaeriaceae como potenciales agentes causales de la enfermedad (INIAP, 2017; Doilom et al, 2015).

A pesar de todos los reportes de posibles agentes causales de la muerte descendente en la teca, existe incertidumbre sobre la patogenicidad de estos organismos y su relación con los síntomas de la enfermedad (Borges et al., 2015; Doilom et al., 2015). De acuerdo con Agrios (2005) y Rivera (2018) no todos los organismos presentes en un tejido enfermo son considerados fitopatógenos, ya que estos podrían estar aprovechando lesiones originadas por los principales agentes causales.

De lo anterior es necesario determinar cuál o cuáles de estos microorganismos son las causantes de la sintomatología. Uno de los métodos más utilizados para realizar este proceso de diagnóstico es a través de los Postulados de Koch, el cual es un procedimiento que permite la comprobación patogénica de la mayoría de los microorganismos y que resulta de gran utilidad cuando se investigan los agentes causales de una enfermedad (Rivera, 2018).

En este contexto, surge la necesidad de determinar los agentes causales de la enfermedad conocida como muerte descendente en el cultivo de la teca en Costa Rica, para reducir o disminuir los problemas ocasionados por esta patología en este cultivo. Este diagnóstico debe iniciarse con la búsqueda de microorganismos fitopatógenos asociados a la enfermedad, para luego seleccionarlos y comprobar su patogenicidad y demostrar de esta forma la relación directa con la sintomatología observada en campo.

Conocer la etiología de una enfermedad es crucial para estudios epidemiológicos y para un mejor entendimiento de la distribución e importancia del patógeno, así como para poder establecer estrategias de manejo acorde a las necesidades del sistema de producción (Picos et al., 2015).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Diagnosticar los agentes causales de la muerte descendente de la teca en plantaciones comerciales de Parrita y Pococí de Costa Rica.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar la incidencia de la muerte descendente de la teca en plantaciones comerciales de Parrita y Pococí.
- Identificar morfológica y molecularmente los patógenos asociados a la sintomatología de la muerte descendente en árboles de teca.
- Demostrar la patogenicidad de los microorganismos aislados mediante los postulados de Koch.
- Evaluar la severidad de los síntomas de la muerte descendente en árboles inoculados con los patógenos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El cultivo de la teca y su origen

El cultivo de teca es una especie forestal originaria de las regiones tropicales del sudoeste asiático de la India, Myanmar, Laos y Tailandia (Hernández, 2017). Esta especie fue introducida por primera vez en el continente americano en Trinidad y Tobago, y posteriormente su cultivo se extendió a otras regiones de Centro y Suramérica. Las primeras plantaciones en Costa Rica fueron establecidas entre 1926 y 1929 (Fonseca, 2003).

2.2. Clasificación taxonómica y descripción botánica de la teca

Según NCBI (2018), el cultivo de la teca se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la teca

Taxones	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Tectona</i>
Especie	<i>Tectona grandis</i> L.f.

2.3. Descripción botánica

Según Chávez y Fonseca (1991) la teca es un árbol grande, deciduo, puede alcanzar más de 50 m y 2 m de diámetro. Es de fuste recto, con corteza áspera y fisurada de 1.2 mm de espesor y de color café claro. Las hojas son simples, opuestas, de 11 a 85 cm de largo y de 6.0 a 50 cm de ancho. Las inflorescencias son panículas terminales, con flores de cáliz campanulado y de color amarillo verdoso. El fruto es subgloboso, tetrágono, aplanado, algo carnososo, con exocarpo delgado y endocarpo grueso; con cuatro celdas que encierran de una a dos semillas de 5.0 mm de largo.

2.4. Importancia económica del cultivo de la teca

La teca es una de las especies maderables más cultivadas alrededor del mundo, según Kollert y Cherubini (2012) se estima en alrededor de 4.346 millones de ha distribuidas en 43 países productores, de las cuales el 83% se encuentran en Asia, 11% en África y un 6% en América tropical.

Esta especie maderable se ha establecido ampliamente por su fácil propagación, manejo y por poseer una madera de excelente calidad, la cual se caracteriza por su dureza, durabilidad, resistencia y buena trabajabilidad. Además de estas características, la teca es una especie exótica que no es invasiva (no afecta a los ecosistemas locales) y si se cultiva mediante buenas prácticas de silvicultura el impacto de erosión es mínimo, lo cual la convierte en una excelente opción para programas de reforestación (Camino y Pierre, 2013).

A nivel mundial, el comercio de este cultivo se encuentra dominado principalmente por países asiáticos, cuyo mayor importador es la India (70%), seguido por China, Alemania, Italia, Suiza y Estados Unidos. Por otra parte, dentro los principales exportadores se encuentran países de América Latina como Ecuador, El Salvador, Costa Rica, Panamá y Brasil (Kollert y Cherubini, 2012).

En Costa Rica, se registran alrededor de 3.239 fincas productoras, lo que representa un área cultivada de 47.167 ha de teca (INEC, 2015). En el país la comercialización de la madera está dirigida principalmente a la exportación de la madera en bruto (31,9%), aserrada (29,4%), paletas, cajones y similares (33,1%) y otros usos (1,9%), para los mercados de Estados Unidos, India, Singapur y China. En el caso de las importaciones, estas son mayoritariamente de madera aserrada (47,71%) provenientes de Chile, China, Estados Unidos, Brasil, Colombia y Guatemala (ONF, 2017).

2.5. Enfermedades del cultivo de la teca

En el área de la protección forestal se ha observado un incremento considerable en la cantidad de problemas fitosanitarios, los cuales se han visto aumentados tanto en su frecuencia como en la severidad de los daños causados a las plantaciones. Existe gran diversidad de patógenos que afectan al cultivo de la teca, pero dentro de ellos los que provocan mayores daños son los que se alojan en el fuste (tronco) y las raíces de los árboles, causando pérdidas económicas importantes por los daños producidos a la madera. En la Tabla 2, se muestra una lista de los principales patógenos que afectan el fuste y las raíces de la teca reportados a nivel de Centroamérica.

Tabla 2. Principales patógenos asociados al cultivo de la teca en Centroamérica

Parte afectada	Patógenos
Fuste	^a <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , ^a <i>Botryodiplodia</i> sp., ^a <i>Erythricium salmonicolor</i> (Berk. & Broome) Burds, ^a <i>Nectria nelumbicola</i> Henn, ^a <i>Fusarium</i> sp., ^b <i>Scytalidium sphaerosporum</i> Sigler & Kang
Raíz	^b <i>Fusarium oxysporum</i> Schldt, ^b <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc., ^a <i>Phytophthora</i> spp.

^aArguedas (2003). ^bMurillo et al. (2014).

2.6. La muerte descendente de la teca en Costa Rica

En Costa Rica durante los últimos años se ha reportado la incidencia de una enfermedad conocida como muerte descendente o decaimiento lento de la teca, en las principales regiones productoras del país, tales como Huetar Norte, Atlántico y Chorotega (Arguedas et al., 2004). Esta enfermedad es considerada la de mayor importancia en el cultivo de la teca, debido a la alta incidencia de mortalidad (13%) (Arias et al., 2005). Los síntomas externos de esta enfermedad se han observado en plantaciones con edades de 7 a 12 años (Murillo et al., 2014), coincidiendo con los primeros raleos comerciales, los cuales se realizan normalmente en plantaciones de 8 y 12 años (González, 2014). Debido a lo anterior, los productores han optado por hacer cosechas tempranas para evitar un mayor deterioro en la calidad de la madera, sin embargo, esto ha llevado a una disminución en los rendimientos productivos y pérdidas económicas.

2.6.1. Síntomas de la muerte descendente de la teca

Esta enfermedad se caracteriza por la clorosis generalizada de hojas, retraso en el crecimiento, marchitez generalizada, pérdida de follaje, copas pequeñas y muerte descendente de partes aéreas. Estos síntomas comienzan a evidenciarse desde la parte apical hacia la parte baja del árbol, provocando la muerte del árbol en patrón descendente (Belezaca et al., 2018).

2.6.2. Patógenos asociados a la muerte descendente de la teca

Estudios fitopatológicos sobre la muerte descendente de la teca en Costa Rica han reportado la presencia de hongos como *Fusarium* sp. en árboles con la sintomatología de la enfermedad (Arguedas et al., 2004). Este mismo género de hongo fue reportado por Murillo et al. (2014), los cuales identificaron a *F. oxysporum*, *F. solani*, y *S. sphaerosporum* en muestras de raíces y ramas de árboles. Sin embargo, Murillo et al. (2014) mencionan que dichos hongos podrían no ser los

principales agentes causales de dicha enfermedad y que esta patología podría estar siendo ocasionada por otros hongos fitopatógenos de mayor relevancia y peligrosidad aún no identificados.

En investigaciones realizadas en zonas productoras de la India, el hongo *F. solani* fue reportado como un posible patógeno asociado a la producción de canchales y muerte descendente en teca (Balasunduran y Sankaran, 1991).

En Ecuador, una de las principales zonas productoras de teca, se ha reportado el hongo *C. fimbriata* en árboles de teca con síntomas de muerte descendente, causando necrosis y obstrucción de haces vasculares (Solano et al., 2019).

Además de los anteriores patógenos mencionados, se cree que la enfermedad de la muerte descendente de la teca también podría estar asociada a un grupo de hongos fitopatógenos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae (Doilom et al., 2015). Los hongos patógenos de esta familia son organismos oportunistas y se aprovechan de condiciones de estrés causadas por el clima, deficiencias nutricionales y heridas para infectar a los árboles (Suárez, 2016). Varias especies de hongos de esta familia han sido reportadas afectando la teca, entre ellos hongos del género *Lasiodyplodia* (Doilom et al., 2015). El género *Lasiodyplodia* Ellis & Everh. ha sido reportado causando muerte descendente en otras especies leñosas y frutales, tales como el aguacate (Alama et al., 2006), cítricos (Fischer et al., 2009), mango (Khazada et al., 2005), papaya (DaSilva et al., 2012), y uva (Batista et al., 2010).

2.7. Patogenicidad y postulados de Koch

Una de las problemáticas relacionadas a la enfermedad de la muerte descendente de la teca, ha sido la identificación de los fitopatógenos. Diversos estudios reportan diferentes microorganismos como los posibles agentes causales de la enfermedad, sin embargo, gran parte de estos carecen de estudios que demuestren su patogenicidad. Según Rocha et al. (2004) la patogenicidad es la capacidad intrínseca que tienen algunos organismos para producir una enfermedad en un hospedero susceptible. Por lo que resulta de gran importancia identificar cuáles de estos organismos son los responsables de producir la enfermedad, ya que como lo menciona Rivera (2018), cuando hay lesiones de una enfermedad generalmente se encuentran varios organismos y no todos de ellos resultan ser los patógenos.

Para determinar cuáles de estos organismos son patogénicos, existe un procedimiento sencillo, el cual fue propuesto por Robert Koch (1843-1910) y se conoce como los postulados de Koch. Este

consiste en una serie de cuatro pasos que permiten comprobar la patogenicidad de la mayoría de los microorganismos (Rivera, 2018). Estos pasos son:

- I. El organismo sospechoso debe estar en todos los individuos que presentan la enfermedad.
- II. El organismo debe ser aislado en un medio de cultivo y obtenerse en forma pura, para registrar sus características morfológicas, bioquímicas o moleculares.
- III. El organismo debe ser inoculado en plantas sanas de la misma especie de donde se obtuvo y producir los mismos síntomas observados al inicio.
- IV. El organismo debe ser reaislado a partir de las plantas inoculadas y las características de este deben ser las mismas que las observadas en el segundo postulado.

2.8. Manejo de enfermedades en el cultivo de la teca

Como parte del manejo de las enfermedades fungosas que afectan a la teca, se menciona el manejo cultural, químico y biológico.

Dentro de las medidas de manejo cultural, se encuentra el uso de árboles sanos (micropropagación) y libres de enfermedades, buenas prácticas fitosanitarias en labores como las podas, raleos o deshijas, y el monitoreo de enfermedades (Batista et al., 2010; Fonseca, 2003).

En relación con el manejo químico, se menciona el uso de productos como el benomil, carbendazim, metil tiofanato, propiconazol, metalaxyl y mancozeb para el manejo de los principales patógenos asociados a enfermedades fungosas que afectan a la teca (Khanzada et al., 2005; El-Habba et al., 2016, Picos et al. 2015).

Con respecto al combate biológico, este es considerado como una de las técnicas preferibles para el manejo de enfermedades, principalmente por el reducido impacto que produce en el ambiente. Este consiste en el uso de organismos vivos que funcionan como antagonistas de organismos patógenos, permitiendo reducir las poblaciones o el impacto de estos a niveles menos perjudiciales para las plantas (Jacas et al., 2005; Valdés, 2014). En el cultivo de la teca se reporta el uso de microorganismos antagonistas como *Trichoderma* spp., *Bacillus* sp. y *Enterobacter* para el manejo preventivo de enfermedades fungosas que afectan a cultivos forestales (Borges et al., 2018).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del estudio

El área de estudio se ubicó en el cantón de Parrita de la provincia de Puntarenas y en el cantón de Pococí de la provincia de Limón (Tabla 3).

El cantón de Parrita se caracteriza por tener un clima húmedo muy caliente, con periodo seco definido, temperatura media anual de 25 a 27 °C y una precipitación media anual entre 3080 a 3420 mm (Corrales, 2012; Solano y Villalobos, 2000). El territorio de Pococí presenta un clima tropical húmedo y abundantes lluvias durante la mayor parte del año. La temperatura promedio anual es de 26.5 °C y con una precipitación media anual de 4500 mm (Bogantes y Mora, 2017; INDER, 2014; Solano y Villalobos, 2000).

Tabla 3. Localidades muestreadas en la investigación

Finca	Localidad	Cantón	Altitud (msnm)	Coordenadas
Pr1	Guapinol	Parrita	133	9°33'22"N 84°23'59"W
Pr2	Guapinol	Parrita	161	9°33'29.35"N 84°24'24.28"W
Pc1	El Humo, Roxana	Pococí	95	10°16'34"N 83°43'20"W
Pc2	El Humo, Roxana	Pococí	99	10°16'23"N 83°43'05"W
Pc3	Floritas, Jiménez	Pococí	114	10°15'53"N 83°44'17"W

3.2. Muestreo de material vegetal

En cada zona de estudio se seleccionaron tres fincas con plantaciones de teca con edades de 7 a 12 años, con características de manejo, densidades de siembra y topografía similar. En cada finca se establecieron dos parcelas de 500 m² para la recolección de datos y muestras, de acuerdo con la metodología utilizada por Belezaca et al. (2018). Por cada parcela se muestrearon tres árboles con síntomas externos de clorosis, necrosis apical, marchitez generalizada y ramas muertas. Se tomaron ramas de 20.0 cm de largo y 5.0 cm de diámetro de las partes apicales, para hacer una muestra completa de cuatro ramas por árbol (Rodríguez et al, 2015). El material obtenido fue transportado en bolsas plásticas debidamente identificado y fue depositado dentro de una hielera para evitar la deshidratación de las muestras.

Posteriormente el material fue trasladado al Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la UNA, para su análisis. El procesamiento del material se realizó posterior a la

llegada; sin embargo, aquel que no pudo ser procesado el mismo día se refrigeró una temperatura aproximada de 6°C hasta su respectivo análisis.

3.3. Evaluación de la incidencia y sintomatología de la enfermedad en campo

Para la evaluación de los síntomas e incidencia de la enfermedad en campo, se utilizó la metodología propuesta por Belezaca et al. (2018). Esta evaluación consistió en realizar recorridos dentro de las parcelas de 500 m², con la finalidad de determinar la totalidad de árboles sanos, árboles con síntomas de la enfermedad. Se calculó la incidencia de la enfermedad de acuerdo con el método utilizado por Valencia (2018), mediante la ecuación de **Incidencia (%) = (a/A)*100**; donde **a**: es el número de árboles con síntomas de muerte descendente y **A**: el total de árboles observados.

3.4. Aislamiento de microorganismos fitopatógenos

Las ramas traídas del campo se limpiaron con agua destilada estéril y se cortaron secciones de rama de 10.0 cm de largo con descoloración vascular. Posteriormente, se cortaron trozos de tejido vascular de aproximadamente de 1.0 cm y se colocaron dentro de una gaza, la cual se sumergió en alcohol al 75% durante 30 s, luego en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5% durante 60 s, y por último se realizaron dos lavados con agua destilada estéril por 60 s cada uno. (Olmo et al, 2016). Finalizado el proceso de desinfección, se llevaron los trozos de tejido vascular a la cámara de flujo laminar, donde se procedió a depositar porciones de tejido en el interior de platos Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) acidificado (Anexo A y B). Los platos Petri fueron sellados con papel parafilm y llevados a incubación en condiciones de oscuridad a 26°C, hasta que se observara crecimiento de micelio. Los hongos aislados fueron purificados en platos Petri con PDA + ácido láctico, hasta obtener cultivos totalmente puros.

Todos los hongos fitopatógenos aislados fueron conservados en viales de 3.7 ml de capacidad, con 2.0 ml de PDA previamente acidificado. En cada vial se colocó una sección del cultivo puro de cada uno de los aislamientos y se incubó a temperatura ambiente por 7 días. Una vez que el medio del cultivo en el vial fue colonizado, se adicionó aceite mineral estéril a los viales y se almacenaron a una temperatura de 10°C.

3.5. Identificación taxonómica y caracterización morfológica de los microorganismos aislados

Los diferentes aislamientos de hongos se identificaron taxonómicamente con base en los rasgos morfológicos y con claves dicotómicas. Para ello, se observaron las características del micelio, la formación de cuerpos fructíferos y el tipo de esporas (forma, color, estriación, septación, presencia

de paráfisis y células conidiogénicas), de acuerdo con los descrito por Phillips et al. (2013) y la clave para identificación de fases asexuales de hongos Barnett y Hunter (2006).

Se determinaron las tasas de crecimiento, mediante la fórmula utilizada por Barreto y Anaguano (2014):

$$Tc = \frac{Cf - Ci}{Tf - Ti}$$

Donde: **Tc:** Tasa de crecimiento (mm), **Cf:** crecimiento diametral final (mm); **Ci:** crecimiento diametral inicial (día uno); **Tf:** tiempo final (al finalizar el crecimiento fúngico); **Ti:** tiempo inicial (día uno).

Para la esporulación de los hongos, se cultivaron los aislamientos en medio de cultivo PDA y acículas de pino previamente autoclavadas, los cuales fueron incubados a 25 °C por 3 a 6 semanas hasta observar la presencia de cuerpos fructíferos (Berraf et al., 2020). Una vez esporulados, se fijaron en portaobjetos estériles. Para ello, se tomaron porciones de micelio de los aislamientos, los cuales se colocaron en portaobjetos y se les añadió una gota de lactofenol y fueron observados al microscopio para observar las características diagnósticas.

3.6. Identificación molecular

El proceso de extracción y purificación de ADN, así como las pruebas de PCR se realizaron por la contratación de los servicios del Laboratorio de Técnicas Moleculares del Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

3.6.1 Extracción y purificación de ADN

A partir de los aislamientos obtenidos de las fincas de estudio, se hicieron cultivos monospóricos; los cuales se incubaron por un periodo no mayor a 4 días para luego ser llevados al Laboratorio de Técnicas Moleculares del CIPROC, donde el ADN de los aislamientos se extrajo mediante el protocolo de extracción planteado por Trout et al. (1991), (Anexo C).

3.6.2 Amplificación por PCR de la región ITS

La amplificación del espaciador transcrito interno (ITS) en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue llevada a cabo usando los cebadores ITS4 [5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'] e ITS5 [5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3'] (White et al., 1990). El perfil térmico para

la prueba de PCR se detalla en la Tabla 4. Posterior a la amplificación, los productos de la PCR fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% a 90 V durante 25 min para corroborar el tamaño de banda esperado.

Tabla 4. Perfil térmico utilizado para la amplificación de las regiones ITS en la PCR

Programa	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94	2	1
	Desnaturalización	94	1	35
	Anillamiento	55	1	
	Extensión	72	1	
	Extensión final	72	10	1

Datos proporcionados por el Laboratorio de Técnicas Moleculares del CIPROC.

3.6.3 Secuenciación

Una vez obtenidos los productos de la PCR, estos fueron enviados a la empresa Macrogen Inc., en Corea para su purificación y la secuenciación del ADN e identificación de los microorganismos. Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas con el programa BioEdit (Hall, 1999).

3.7. Pruebas de patogenicidad

Para determinar la patogenicidad de los aislamientos, se utilizaron árboles de teca de 3 meses de edad según lo establecido por Rodríguez (2018), los cuales fueron cultivados en bolsas de polietileno de 30.0 cm de ancho por 38.0 cm de alto, con sustrato esterilizado. Estos árboles se colocaron bajo condiciones de ambiente semi-protégido (malla sarán) y se mantuvieron bajo estas condiciones hasta la realización de las pruebas de patogenicidad.

Para la prueba de patogenicidad, se realizaron tres repeticiones por cada aislamiento obtenido y un testigo. Una vez listos los árboles y obtenido todos los aislamientos de los hongos, se procedió a realizar la inoculación. Este proceso se realizó mediante el método utilizado por Rodríguez et al. (2015), el cual consistió en realizar una herida cerca del ápice con crecimiento vegetativo activo del árbol e inmediatamente se colocó sobre la herida un disco de agar de 5,0 mm con crecimiento activo del hongo (8 días de edad) y posteriormente se cubrió con algodón y se selló con papel parafilm (Anexo D). Finalmente, se humedeció el algodón con agua destilada estéril mediante una aguja hipodérmica. Los tratamientos control fueron inoculados con discos de agar, pero sin crecimiento del patógeno. Los árboles fueron mantenidas bajo condiciones de ambiente semi-protégido por un periodo de 3 meses para determinar la patogenicidad de los hongos aislados. De los árboles que mostraron

síntomas asociados a la muerte descendente, se tomaron muestras y se hicieron reaislamientos los cuales se incubaron por un periodo de 14 a 21 días a 25-26 °C y en total oscuridad. Para completar los postulados de Koch, las características morfológicas de los reaislamientos fueron comparadas con las observadas en los primeros aislamientos, con el objetivo de encontrar similitudes entre ellos y de esta forma comprobar la parte final de los postulados de Koch.

3.8. Evaluación de la severidad

La evaluación de la severidad en los árboles inoculados, se realizó de acuerdo con la escala planteada por Murillo et al. (2014), con algunas modificaciones basadas en el criterio de productores de teca y profesionales en el área de fitopatología.

De acuerdo con los síntomas observados, se plantearon cinco categorías para evaluar el grado de severidad en los árboles de teca (3 meses de edad) inoculados con los hongos fitopatógenos. En la **categoría 1 (0%)** los árboles se muestran sanos y no hay indicios de síntomas asociados a la enfermedad. En la **categoría 2 (25%)** comienzan a evidenciarse síntomas como marchitez y clorosis en hojas. La **categoría 3 (50%)** se caracteriza por presentar síntomas más severos de marchitez, clorosis y pérdida parcial hojas. En la **categoría 4 (75%)** se observan áreas necrosadas que comienzan desde la parte apical y se extienden hacia el tallo, así como una pérdida abundante del follaje. La **categoría 5 (100%)** son árboles que muestran una necrosis completa de sus tejidos y pérdida total del follaje.

Los árboles inoculados fueron evaluados por un periodo de tres meses para determinar el grado de severidad asociado a los fitopatógenos.

3.9. Análisis estadístico

Para determinar diferencias entre las tasas de crecimientos de los hongos, se realizó una prueba de ANOVA ($p < 0.05$) y la prueba de comparación múltiple Tukey, mediante el programa estadístico R

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Incidencia de la enfermedad en plantaciones de Parrita y Pococí

En las plantaciones de Parrita y Pococí se observaron los síntomas asociados a la muerte descendente de la teca, tales como clorosis, pérdida de follaje y necrosis apical en patrones descendentes (Figura 1a-b). Además, se observó necrosis vascular en las muestras de ramas recolectadas de la parte aérea de estos árboles (Figura 1c-d). Estos síntomas fueron observados mayormente en árboles aislados y en menor cantidad en pequeños grupos de dos a tres árboles.

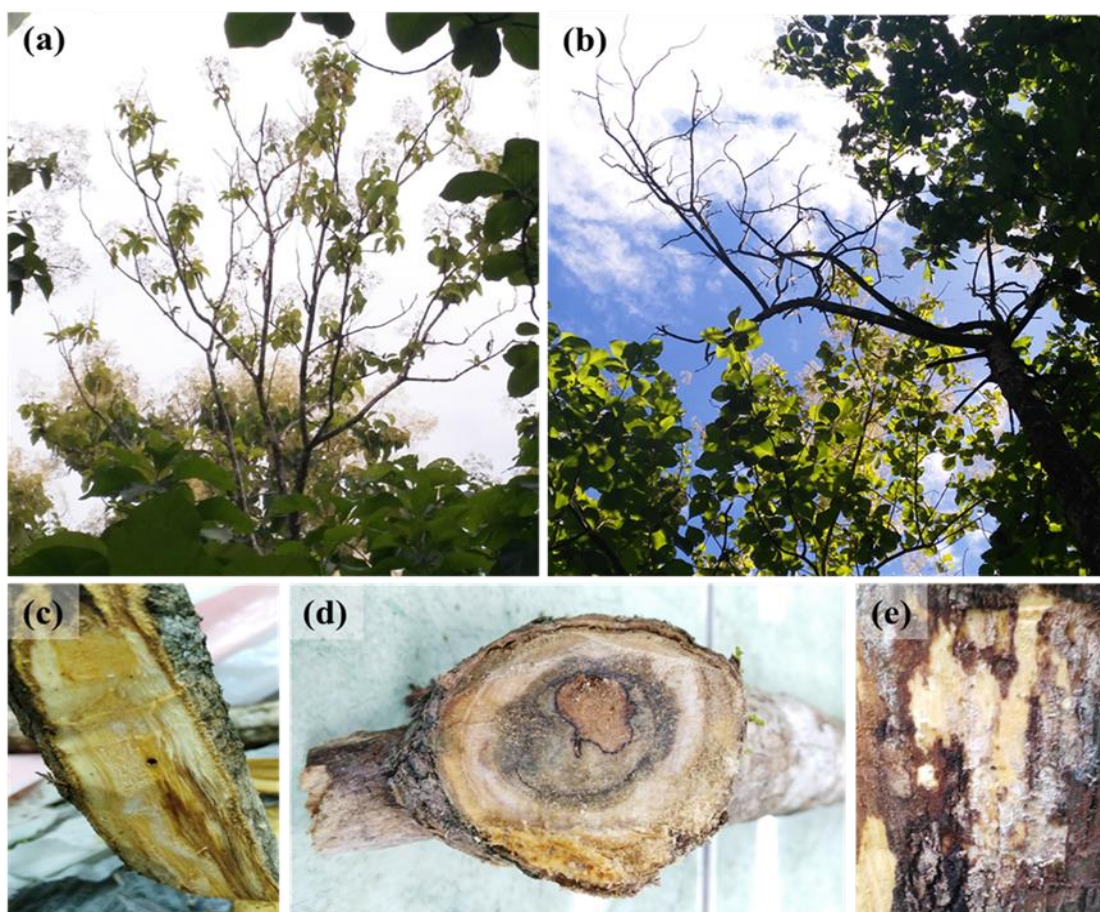


Figura 1. Síntomas de muerte descendente observados en árboles de teca. a) Clorosis y pérdida de follaje. b) Necrosis apical; c-d) Corte longitudinal y transversal de ramas con necrosis vascular. e) Pudrición en corteza.

Al determinar los niveles de incidencia de la enfermedad, se encontraron diferencias entre las plantaciones de ambas zonas. De la zona de Parrita con plantaciones de 12 años, se obtuvieron porcentajes de 15.18% y 14.29% de las fincas Pr1 y Pr2, respectivamente (Tabla 5). Dichos valores fueron numéricamente mayores que el nivel de incidencia reportado a nivel nacional del 13%, para plantaciones en un rango de edad de 7 a 12 años (Arias et al., 2005). En el caso de las plantaciones de Pococí con menor edad (7 a 8 años), la incidencia de la enfermedad fue menor al reportado en Parrita y a nivel nacional, con valores de 6.63%, 9.64% y 7.83% para las fincas Pc1, Pc2 y Pc3, respectivamente (Tabla 5). Los datos obtenidos sugieren que la elevada incidencia de la enfermedad se observa mayormente en plantaciones de más edad. No obstante, estos resultados no concuerdan con los reportes de otras regiones productoras de teca como Ecuador, en donde se han registrado niveles de incidencia de 16.6%, 15.2% y 20% en plantaciones de 2, 5 y 7 años, respectivamente (Belezaca et al., 2018; Solano et al., 2019).

Tabla 5. Nivel de incidencia de la muerte descendente de la teca en las fincas de las regiones de Pococí y Parrita.

Variables	Fincas				
	Pr1	Pr2	Pc1	Pc2	Pc3
Edad (años)	>12	>12	7 a 8	7 a 8	7 a 8
Total	112	112	166	166	166
Árboles sanos	95	96	155	150	153
Árboles enfermos	17	16	11	16	13
% de incidencia	15,18%	14,29%	6,63%	9,64%	7,83%

De lo anterior, el factor de la edad en las plantaciones podría no estar relacionado a una mayor presencia de la enfermedad, por lo que otros factores pueden estar involucrados en el nivel de incidencia. Algunos de estos podrían ser las condiciones edafoclimáticas propias de cada zona, posibles vectores de los patógenos asociados a la muerte descendente o el mismo manejo realizado dentro de las plantaciones.

En las plantaciones de Parrita y Pococí, los microorganismos aislados de los árboles con síntomas de muerte descendente fueron identificados como hongos de la familia Botryosphaericeae. De acuerdo con Suárez (2016), las enfermedades provocadas por este grupo de hongos se asocian a algún tipo de estrés o condiciones del crecimiento de los árboles no favorables. Entre estas condiciones se encuentra el estrés ambiental (sequías o excesiva humedad), nutricional, daños físicos, daños

biológicos (insectos u otros patógenos), competencia o siembra en sitios inadecuados (García et al., 2017).

Para ambas zonas del estudio las condiciones de clima son de alta humedad, temperatura media anual de alrededor de 26.5 °C y niveles altos de precipitación, pero la zona de Parrita presenta periodos secos definidos, mientras que Pococí se mantiene con abundantes lluvias durante todo el año (Solano y Villalobos, 2000). Estos periodos secos podrían tener influencia sobre el estado fisiológico de los árboles, ya que según Arcos y Jaimez (2020), el efecto del estrés hídrico aumenta la pérdida de follaje y disminuye la tasa de crecimiento de la teca. Lo anterior podría favorecer el ataque de patógenos, lo que explicaría la mayor incidencia de la enfermedad en las plantaciones de Parrita.

Otra de las posibles razones podría deberse a vectores de los patógenos, para el caso de la muerte descendente de la teca en Costa Rica no se encontraron estudios que asocien a la enfermedad con algún vector. No obstante, en investigaciones realizadas por el INIAP (2017) en Ecuador, se cree que la diseminación e ingreso de los patógenos causantes de la muerte descendente está relacionada con insectos barrenadores, específicamente a coleópteros de la subfamilia Scolytinae.

4.2 Aislamiento de microorganismos fitopatógenos

Como resultado de los muestreos de ramas de árboles con la sintomatología de la muerte descendente, se obtuvieron aislamientos de los hongos por cada localidad del estudio (Tabla 6).

Tabla 6. Aislamientos de hongos asociados a la muerte descendente en el cultivo de teca por localidad.

Provincia	Cantón	Localidad	Cantidad de aislamientos	Código asignado
Puntarenas	Parrita	Guapinol	6	Pr1
Puntarenas	Parrita	Guapinol	6	Pr2
Limón	Pococí	El Humo, Roxana	6	Pc1
Limón	Pococí	El Humo, Roxana	6	Pc2
Limón	Pococí	Floritas, Jiménez	6	Pc3

4.3. Identificación taxonómica y caracterización morfológica de los microorganismos aislados

Al observar el desarrollo de estos aislamientos se encontraron ciertas similitudes en cuanto al crecimiento, ya que los aislamientos Pr2, Pc1, Pc2 y Pc3 completaron su crecimiento en el medio de cultivo en el plato Petri (90 mm) a los tres días de incubación, mientras que el aislamiento Pr1 lo completo a los 4 días de ser cultivado (Figura 2).

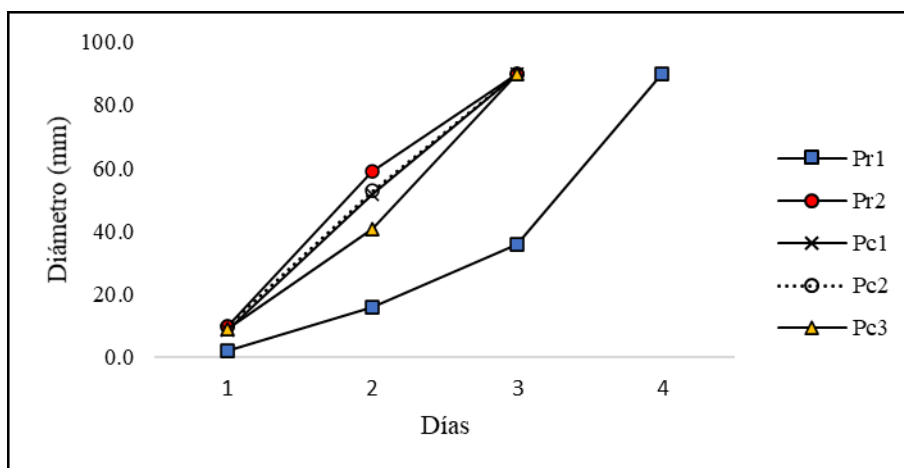


Figura 2. Crecimiento diametral máximo (mm) de los aislamientos de hongos de Parrita (Pr1 y Pr2) y Pococí (Pc1, Pc2 y Pc3).

En cuanto a la tasa de crecimiento, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre algunos de los aislamientos (Anexo E). El aislamiento Pr1 con una tasa de crecimiento de $27.72 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ fue significativamente distinto al resto de aislamientos. El aislamiento Pc1 con una tasa de crecimiento de $35.08 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ fue significativamente diferente de los aislamientos Pr1, Pr2 y Pc2, pero similar a el aislamiento Pc3 con $34.92 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$. Finalmente, los aislamientos Pr2, Pc2 y Pc3 con tasas de $34.67 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$, $34.67 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ y $34.92 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente; no presentaron diferencias significativas entre ellos (Tabla 7).

Tabla 7. Tasa de crecimiento de los de hongos fitopatógenos aislados

Aislamientos	Tasa de crecimiento
Pr1	25.72 c
Pr2	34.67 b
Pc2	34.67 b
Pc3	34.92 ab
Pc1	35.08 a

Datos completos en Anexo E-F

En cuanto a la coloración y la textura, todos los aislamientos presentaron un crecimiento inicial caracterizado por un micelio inicial aéreo de color blanquecino, que a medida que fueron madurando, estos se tornaron de un color gris claro en la parte superior e inferior del plato Petri (Figura 3). Posteriormente, el micelio cambió su coloración de gris claro a gris oscuro en la parte superior y negro

en la parte inferior del plato, entre el día 7 y 15 de incubación (Figura 4). Además de estas características, los aislamientos Pc1, Pc2 y Pc3 produjeron exudados de apariencia aceitosa sobre pequeñas masas de micelio. Estos exudados son un indicio de la formación de cuerpos fructíferos del hongo (picnidios).

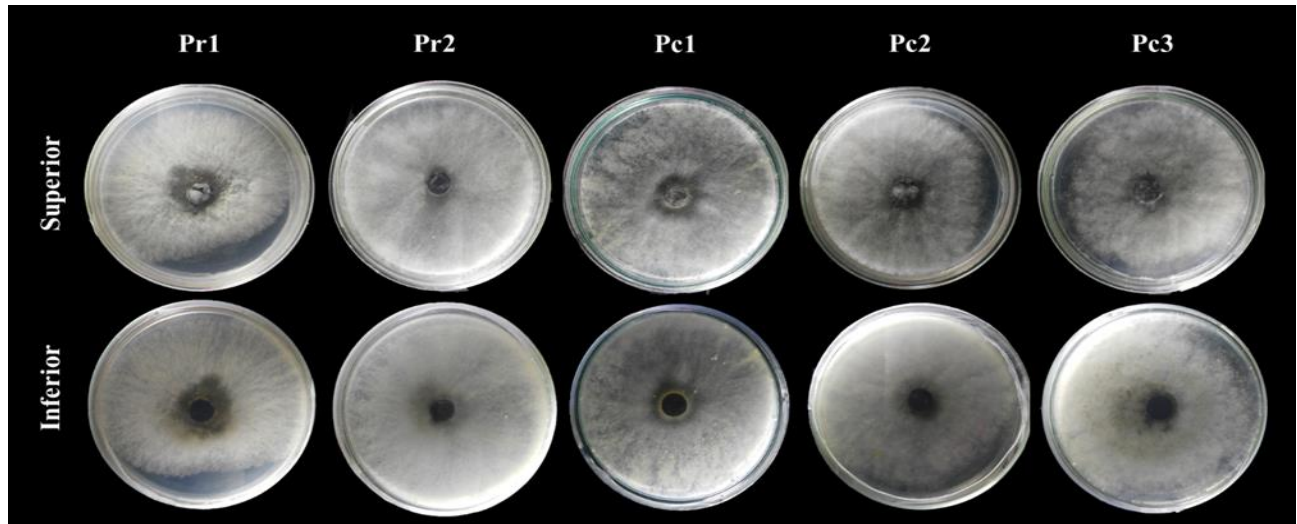


Figura 3. Colonias puras de los aislamientos de Parrita (Pr) y Pococí (Pc) al completar el crecimiento en el plato Petri.

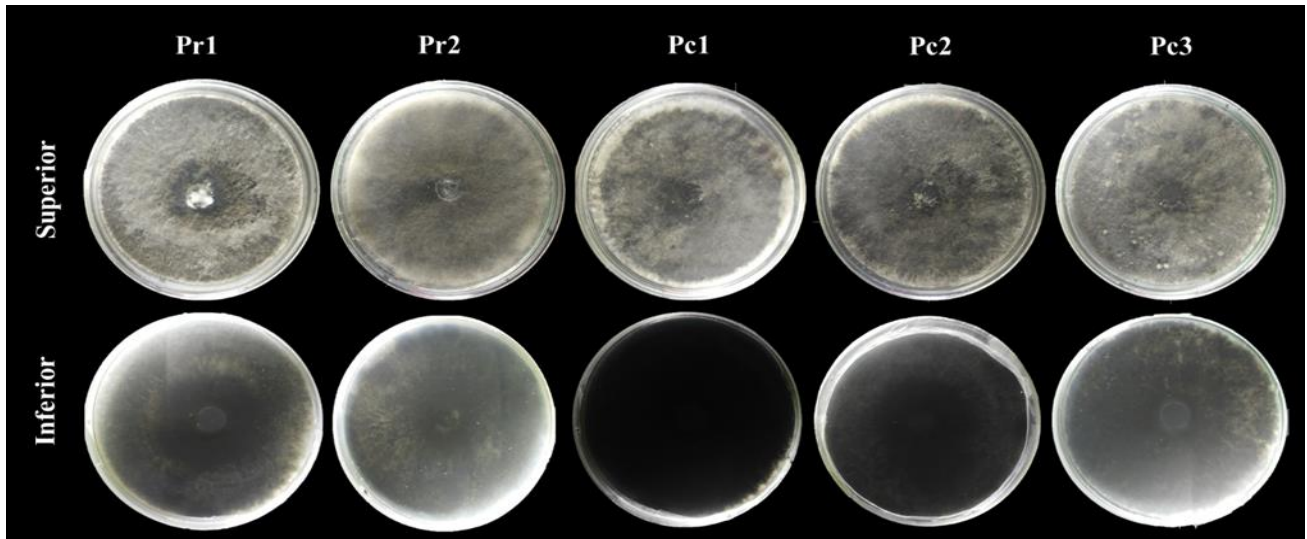


Figura 4. Colonias puras de los aislamientos de Parrita (Pr) y Pococí (Pc) a los 15 días de incubación.

Después de un periodo de crecimiento de 30 días los aislamientos Pc1, Pc2 y Pc3 formaron cuerpos fructíferos sobre la superficie del micelio, los cuales se originaron a partir de los exudados anteriormente mencionados. En el caso de los aislamientos Pr1 y Pr2 no formaron fructificaciones, por lo que se procedió a cultivarlos en PDA con acículas de pino autoclavadas con el fin de estimular el desarrollo de estas estructuras (Su et al., 2012). No obstante, el aislamiento Pr2 fue el único que formó cuerpos fructíferos del hongo.

El aislamiento Pr1 solo pudo ser identificado mediante el análisis molecular, ya que no produjo las estructuras diagnósticas (cuerpos fructíferos y esporas) necesarias para la identificación del género y la especie, por lo cual solo se registraron características relacionadas a su crecimiento micelar y tipo de hifas (Figura 5). De acuerdo con el análisis molecular este aislamiento fue identificado como *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. L. Phillips.

Al observar las características de esta especie, se encontraron similitudes con respecto a otros estudios. En este caso el crecimiento, la textura y los cambios en la coloración del micelio de *N. parvum* del aislamiento Pr1 fueron similares a los descritos por Aloi et al. (2021) e Iturrutxa et al. (2011), los cuales mencionan que *N. parvum* produce un micelio inicial aéreo de color blanquecino y con el tiempo este se va tornando gris oscuro hasta llegar a negro.

En relación con las características microscópicas de *N. parvum*, éste desarrolló el mismo tipo de hifas septadas, hialinas y tubulares que el resto de los aislamientos de hongos en este estudio. Sin embargo, no logró producir picnidios después de 4 semanas de incubación en medio PDA a 25°C. Estos resultados difieren con lo descrito por Gezhagne et al. (2020), el cual reportó la formación de picnidios con conidios de aspecto hialino y aseptados después de 2 semanas de incubación. De acuerdo con Haenzi et al. (2021), esta diferencia se debe a que *N. parvum* requiere de un fotoperiodo entre luz y oscuridad de 12 h cada uno para producir tales estructuras.

Según Pérez et al. (2014), *Neofusicoccum* presenta una tasa de crecimiento de 25 mm·d⁻¹ después de 4 días de incubación en medio PDA a 25°C. La especie *N. parvum* del aislamiento Pr1 tuvo una tasa de crecimiento similar con 25.72 mm·d⁻¹ y un crecimiento máximo después de 4 días. Esta diferencia de menos de un 1.0 mm entre las tasas de crecimiento podría deberse a variaciones en la composición del medio de cultivo empleado o en la temperatura, ya que para Aloi et al. (2021) el crecimiento óptimo de este hongo se encuentra entre los 25 a 30°C.

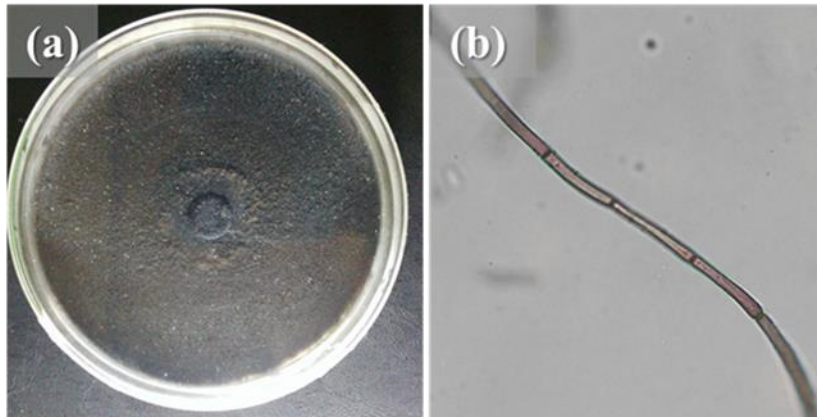


Figura 5. *N. parvum* (Aislamiento Pr1). a) Colonia a los 30 días, sin picnidios. b) Hifa septada.

Los aislamientos Pr2, Pc1, Pc2 y Pc3 fueron identificados morfológicamente como hongos del género *Lasiodiplodia*, un grupo de hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae. Lo anterior, ha sido reportado en el presente estudio y confirmado por otros autores (Doilom et al., 2015; Méndez et al., 2019).

Del aislamiento Pr2 el análisis molecular reportó dos posibles especies de *Lasiodiplodia*, las cuales fueron *L. hormozganensis* y *L. parva*. En este aislamiento se observaron hifas hialinas, tubulares y septadas; picnidios de apariencia periforme y de color negro. Los conidios inmaduros eran hialinos, cilíndricos a ovalados, aseptados y con doble pared. Los conidios maduros eran de color café oscuro, septados y con estriaciones longitudinales (Figura 6). Las características morfológicas observadas en este aislamiento coinciden con lo descrito por otros autores para las especies *L. hormozganensis* y *L. parva* (Abdollahzadeh et al., 2010; Honger et al., 2017 y Phillips et al., 2013).

Para este aislamiento la tasa de crecimiento fue $34.67 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ después de 3 días de cultivo, dicho valor es menor al reportado por Netto et al. (2014) para *L. hormozganensis*, con $35.7 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ después de 2 días de incubación en medio PDA. Con respecto a *L. parva*, Honger et al. (2017) observó un crecimiento completo en el plato Petri (90 mm) después de 4 días de incubación en PDA a 25-27°C, lo cual es un crecimiento menor en comparación al obtenido en el aislamiento Pr2.

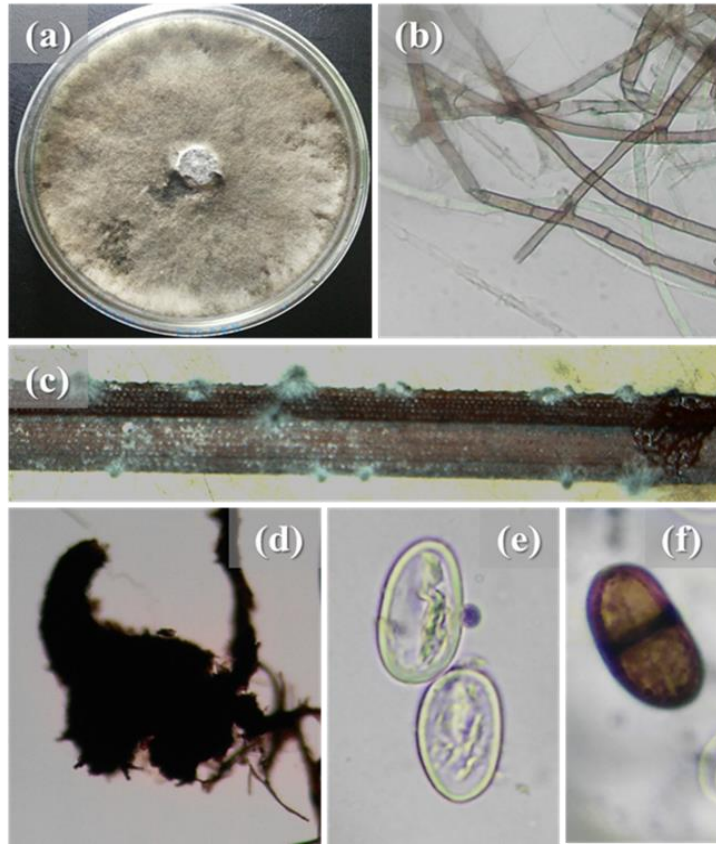


Figura 6. *Lasiodiplodia* sp. (Aislamiento Pr2). a) Colonia a los 30 días. b) Hifas septadas. c) Picnidios en acículas de pino. d) Picnidio. e) Conidios inmaduros. f) Conidio maduro.

En el aislamiento Pc1, el análisis molecular reportó una única especie, la cual fue *L. pseudotheobromae*. Al igual que en el anterior aislamiento, se observaron hifas tubulares y septadas; picnidios negros y conidios maduros de color café oscuro, septados y con estriaciones longitudinales (Figura 7). Estas características también han sido observadas por otros autores en la especie *L. pseudotheobromae* (Liang et al. (2020).

En relación con la tasa de crecimiento, este aislamiento obtuvo $35.08 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ después de 3 días de cultivo, lo cual es mayor a lo indicado por Coutinho et al. (2017) de $27.93 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ para esta especie, pero en ambos casos su crecimiento máximo fue a los 3 días de incubación en medio PDA a 25°C .

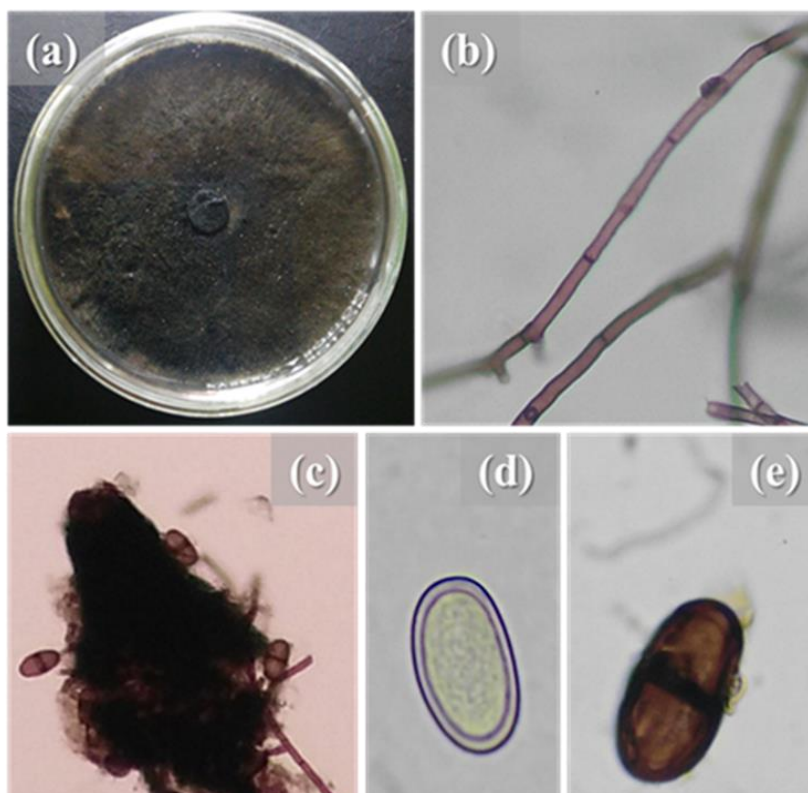


Figura 7. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Aislamiento Pc1). a) Colonia a los 30 días. b) Hifas septadas. c) Picnidio. d) Conidio inmaduro. e) Conidio maduro.

Para los aislamientos Pc2 y Pc3 en ambos casos, las secuencias ITS coincidieron con dos posibles especies de *Lasiodiplodia*, las cuales fueron *L. theobromae* y *L. brasiliensis*. Estos hongos mostraron características similares al de los anteriores aislamientos de *Lasiodiplodia*, observándose hifas septadas, picnidios periformes de color negro y conidios maduros de color café oscuro, septados y con estriaciones (Figura 8-9). En ambos casos las características mencionadas también han sido reportadas en estudios previos realizados sobre las especies *L. theobromae* y *L. brasiliensis* (Alves et al., 2008; Rangel, 2021)

Estos aislamientos no presentaron diferencias entre sus tasas de crecimiento, sin embargo, estos fueron distintos con respecto a lo reportado por otros estudios. De la especie *L. theobromae*, Coutinho et al. (2017) estimaron una tasa de $30.41 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ después de 3 días de cultivo, lo cual es menor en comparación al reportado en los aislamientos Pc2 y Pc 3 con $34.67 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ y $34.92 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente. A pesar de esta diferencia con los aislamientos Pc2 y Pc3, estos sí coinciden en su crecimiento máximo a los 3 días de cultivo. En el caso de *L. brasiliensis*, Rangel (2021) y Netto et al. (2014) estimaron tasas de $23.1 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$. y $31.9 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente. Los anteriores valores difieren

de lo obtenido para los aislamientos Pc2 y Pc3, sin embargo, el crecimiento máximo de estos aislamientos es el mismo que el reportado por Netto et al. (2014) después de 3 días de cultivo.

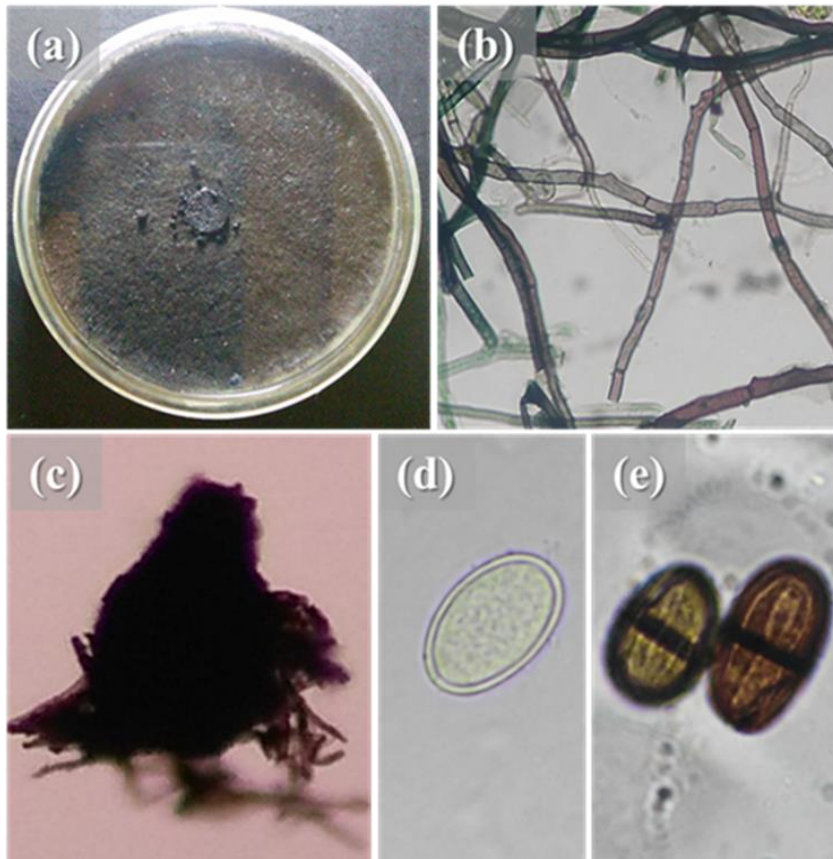


Figura 8. *Lasiodiplodia* sp. (Aislamiento Pc2). a) Colonia a los 30 días. b) Hifas septadas. c) Picnidio. d) Conidio inmaduro. e) Conidios maduros.

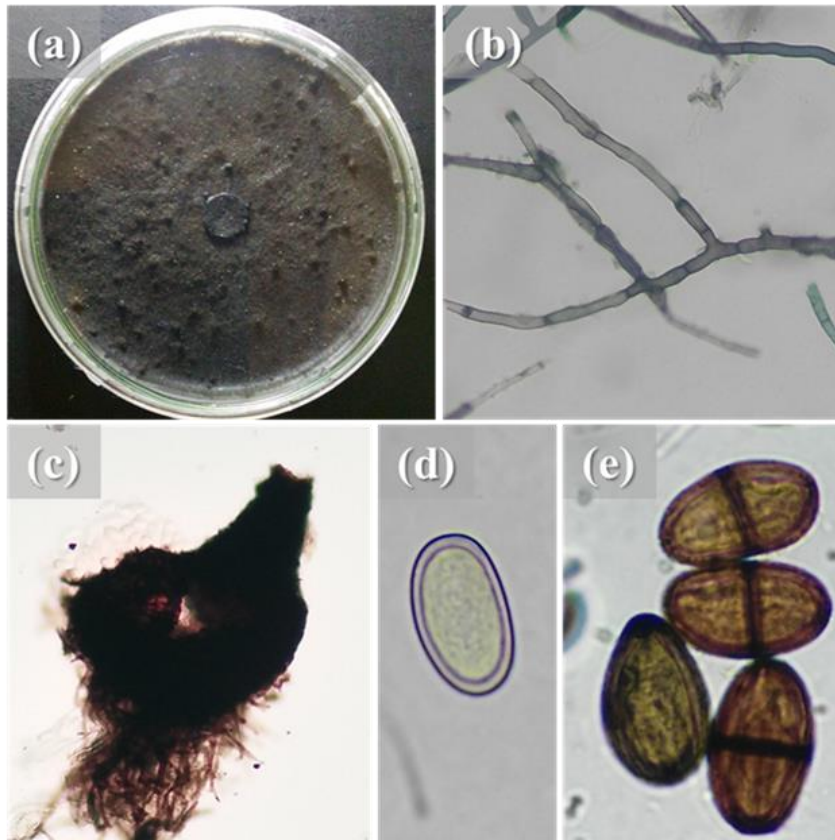


Figura 9. *Lasiodiplodia* sp. (Aislamiento Pc3). a) Colonia a los 30 días. b) Hifas septadas. c) Picnidio. d) Conidio inmaduro. e) Conidios maduros.

De las características morfológicas de las especies de *Lasiodiplodia* en los aislamientos Pr2, Pc1, Pc2 y Pc3 no se observaron diferencias que permitieran determinar las especies de este género. Este mismo comportamiento también ha sido descrito en otros estudios, en donde se observa que este género de hongos presenta poca diferenciación en la morfología y crecimiento entre algunas de las especies (Abdollahzadeh et al., 2010; Alama et al., 2006; Alves et al., 2008; Custódio et al., 2018; Marques et al., 2013 y Netto et al., 2014).

De acuerdo con Alves et al. (2008) esta similitud de la morfología observada entre los aislamientos de *Lasiodiplodia*, se debe a que este género de hongos es considerado como un complejo de especies crípticas, es decir, especies que son similares en su morfología, fisiología y comportamiento (Sáenz, 2009).

Algunos estudios informan sobre algunas diferencias encontradas entre las especies de *Lasiodiplodia*. Alves et al. (2008) reportaron diferencias al evaluar la forma y tamaño de los conidios maduros de las especies *L. parva*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*; estos autores mencionaron

que los conidios de *L. pseudotheobromae* son más largos ($28 \times 16 \mu\text{m}$) y elipsoidales que los de *Lasiodiplodia theobromae* ($26.2 \times 14.2 \mu\text{m}$), mientras que los de *L. parva* son más pequeños ($20.2 \times 11.5 \mu\text{m}$ de la m). Asimismo, Abdollahzadeh et al. (2010) indicó que los conidios de *L. hormozganensis* son más largos ($21.5 \times 12.5 \mu\text{m}$) que en *L. parva*.

Además de la forma y tamaño de los conidios, se ha reportado que algunas de las especies de *Lasiodiplodia* producen pigmentos cuando se cultivan en PDA a 35°C . En el caso de *L. parva* y *L. pseudotheobromae*, Alves et al. (2008) menciona que estas especies producen pigmentos rosados. Igualmente, Ismail et al. (2012) observó que *L. theobromae* produce pigmentos rosados a 35°C . Por lo contrario de *L. hormozganensis* se informa que no los produce (Abdollahzadeh et al. 2010).

A pesar de los reportes que informan diferencias entre las especies de este género, varios estudios sobre *Lasiodiplodia* mencionan que la identificación por métodos morfológicos no es determinante para diferenciar entre las especies de este género y que esta solo es posible mediante el análisis de regiones genómicas como las del espaciador transcrito interno (ITS), el factor de elongación alfa (TEF1- α) y β -tubulina (BT2) (Bautista et al., 2019; Coutinho et al., 2017; Pavlic et al., 2009; Phillips et al., 2013; Picos et al., 2015).

4.4. Análisis molecular

Las secuencias de los productos de PCR identificaron, en todos los casos, a hongos fitopatógenos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, lo cual confirma los resultados obtenidos en la identificación morfológica. De acuerdo con Phillips et al. (2013), este grupo de hongos han sido reportados en casi todas las áreas geográficas del mundo, principalmente como patógenos endófitos y saprofitos en una amplia diversidad de hospederos. Esto demuestra que dichos organismos tienen una alta capacidad de colonización y adaptación a diferentes condiciones ambientales.

En relación con el análisis de similitud, según el BLAST (Genbank- NCBI) el aislamiento Pr1 de Parrita tuvo un 100 % de similitud con *N. parvum*. En el aislamiento Pr2 de Parrita, el análisis de similitud reportó dos coincidencias para la secuencia, las cuales fueron *L. hormozganensis* Abdollahz., Zare & A.J.L. Phillips con 524 pares de bases y *L. parva* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous con 524 pares de bases, al igual que la anterior (Tabla 8).

Con respecto a los hongos aislados de Pococí, el aislamiento Pc1 obtuvo 100% de similitud con *L. pseudotheobromae*. En el aislamiento Pc2 se reportaron dos coincidencias para la secuencia, las cuales fueron *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. con 525 pares de bases y

L. brasiliensis M.S.B. Netto, M.W. Marques & A.J.L. Phillips con la misma cantidad de pares de bases. En el caso del aislamiento Pc3, el análisis de similitud arrojó dos coincidencias, las cuales fueron *L. theobromae* con 524 pares de bases y *L. brasiliensis* con 524 pares de bases (Tabla 8).

Tabla 8. Identificación molecular y análisis de similitud de los aislamientos de hongos de las plantaciones de teca de Parrita y Pococí.

Aislamiento	Identificación	Análisis de similitud	N.º de accesión
Pr1	<i>N. parvum</i>	568 pb - 100% de similitud	MN180877
Pr2	<i>L. hormozganensis</i>	524 pb - 100% de similitud	MN540683
	<i>L. parva</i>	524 pb - 100% de similitud	GQ469964
Pc1	<i>L. pseudotheobromae</i>	524 pb - 100% de similitud	MN341226
Pc2	<i>L. theobromae</i>	525 pb - 100% de similitud	MT372632
	<i>L. brasiliensis</i>	525 pb - 100% de similitud	MF952733
Pc3	<i>L. theobromae</i>	524 pb - 100% de similitud	MT372633
	<i>L. brasiliensis</i>	524 pb - 100% de similitud	MF952734

Pr= Aislamientos de Parrita, Pc= Aislamientos de Pococí, pb=pares de bases.

Secuencias de las regiones ITS4 e ITS5 utilizadas en el análisis de similitud en Anexo G a K.

A pesar de que las características morfológicas y la secuenciación de las regiones ITS permitieron identificar algunos de los géneros y especies en este estudio, estos no lograron diferenciar las especies de *Lasiodiplodia* reportadas en tres de los aislamientos. El aislamiento Pr2 con *L. parva* y *L. hormozganensis* y los aislamientos Pc2 y Pc3, los cuales en ambos casos reportaron a *L. theobromae* y *L. brasiliensis*.

Estos resultados se deben en parte a que *Lasiodiplodia* presenta especies crípticas (Bautista et al., 2019; Slippers et al., 2014), lo cual dificulta la diferenciación basándose en las características morfológicas. Asimismo, de este género de hongos se ha indicado que presentan poca variación interespecífica en sus genes y que la secuenciación de la región ITS no es suficiente para discriminar entre algunas de las especies de este género (Rangel, 2021).

Lo anterior es reforzado por Lawrence et al. (2017), Serrato et al. (2020), Tan et al. (2019) y Slippers et al. (2014), los cuales mencionan que para una identificación precisa de las especies de *Lasiodiplodia* es necesario llevar a cabo un análisis combinando múltiples loci, que incluyen los de las regiones ITS, TEF1- α y β -tubulina.

4.5 Pruebas de patogenicidad y evaluación de la severidad

De los árboles inoculados con los hongos fitopatógenos aislados y caracterizados, después de 3 meses solo los árboles que fueron inoculados con los aislamientos Pc2 y Pc3 mostraron síntomas asociados a la muerte descendente.

En estos árboles se observaron síntomas iniciales de clorosis y marchitez generalizada. Conforme avanzó el tiempo, estos árboles presentaron necrosis en las partes apicales y seguidamente la necrosis se extendió hacia el tallo (Figura 10). Después de este período de evaluación y de acuerdo con la escala establecida en el estudio, los síntomas observados en estos árboles se agruparon en la clase 4 en la evaluación de la severidad, la cual fue considerada como alta.

Según el análisis molecular en ambos aislamientos se encontraban dos posibles especies de *Lasiodiopodia*, las cuales eran *L. theobromae* y *L. brasiliensis*. Ambas especies de *Lasiodiopodia* han sido reportadas como patógenos asociados a la formación de canchros y los síntomas de la muerte descendente de la teca (Doilom et al. 2015).



Figura 10. Síntomas de muerte descendente en árboles inoculados con los aislamientos Pc2 y Pc3. a) Necrosis apical y marchitez. b) Necrosis en tallos.

Para completar el proceso de los postulados de Koch se obtuvieron muestras de tejido de ramas y tallo de los árboles inoculados que mostraron síntomas. De estas muestras se realizaron los respectivos reaislamientos, de los cuales se observaron las mismas características morfológicas macro y microscópicas de los aislamientos Pc2 y Pc3. Estos resultados permiten asociar a las especies de

Lasiodiplodia reportadas en estos aislamientos como los potenciales agentes causales de la muerte descendente de la teca bajo las condiciones de estudio.

Con respecto a la patogenicidad de las especies *L. theobromae* y *L. brasiliensis* existen pocos estudios en donde se asocia a estos organismos con la capacidad de producir los síntomas de la muerte descendente de la teca. A nivel nacional se reporta un solo estudio que ha informado sobre la patogenicidad de *L. theobromae* y su relación con la muerte descendente. Este primer informe fue realizado por Méndez et al. (2019), los cuales observaron síntomas de necrosis vascular a los 3 meses después de inocular árboles jóvenes de teca. Estos resultados coinciden con los observados en las pruebas de patogenicidad de este estudio, ya que en ambos se observaron síntomas de necrosis vascular después de 3 meses de la inoculación de los árboles.

Estudios similares realizados en Brasil por Borges et al. (2015), asociaron a la especie *L. theobromae* con la formación de canchros. En dicha investigación lograron observar que después de inocular árboles de teca de 6 meses de edad, estos produjeron canchros luego de 3 meses.

En cuanto a *L. brasiliensis*, se encontró un reporte sobre la patogenicidad de este organismo bajo el nombre sinónimo de *L. brasiliense*. Esta investigación fue realizada por Dong et al. (2020), en la cual evaluaron la patogenicidad de esta especie mediante la inoculación de segmentos de ramas de teca con discos con crecimiento activo del hongo e incubados a 25°C durante 7 días. De esta prueba lograron demostrar la patogenicidad después de observar síntomas de necrosis y realizar los aislamientos del hongo.

Además de la teca, se han realizado estudios sobre la patogenicidad de los hongos *L. theobromae* y *L. brasiliensis*, y su relación con los síntomas de muerte descendente y la formación de canchros en especies leñosas y frutales. En el caso de *L. theobromae* se informa la capacidad de producir dichos síntomas en aguacate (Alama et al., 2006), limón persa (Bautista et al. 2019), mango (Ismail et al., 2012), rambután (Serrato et al., 2020) y uva (Úrbez et al., 2008). Para *L. brasiliensis* se reportan algunos cultivos como el limón persa (Bautista et al., 2019), manzana (Martins et al., 2018) y uva (Netto et al., 2014).

De los aislamientos de hongos que no produjeron síntomas en los árboles de teca, algunos estudios han reportado la capacidad de estos organismos para producir síntomas de muerte descendente y formación de canchros. De *L. pseudotheobromae*, Dong et al. (2020) mencionan que es capaz de generar síntomas de muerte descendente en teca, aunque su severidad es reportada como

baja. En el caso de *N. parvum* se reporta causando muerte descendente en eucalipto (Suárez, 2016), mango (Ismail et al., 2013) y canchales en higo (Aiello et al., 2020). De *L. hormozganensis* se ha indicado la capacidad de producir síntomas de muerte descendente en rambután (Serrato et al., 2020) y uva (Correia et al., 2013).

Las razones por las que estas especies no produjeron síntomas son variadas, entre ellas se puede mencionar el efecto de factores externos no controlados como la temperatura y la humedad, ya que se sabe que los patógenos de la familia Botryosphaeriaceae requieren de condiciones ambientales favorables y de hospederos que se encuentren bajo alguna situación de estrés para poder infectarlos (García et al. 2017). Según Slippers y Wingfield (2007) muchas de las especies de Botryosphaeriaceae pueden permanecer como endófitos latentes, sin producir síntomas y una vez se presentan las condiciones óptimas, estos pueden volverse patógenos muy agresivos.

Con base a lo dicho por los anteriores autores y tomando en cuenta que las pruebas de patogenicidad se realizaron en Parrita, una zona que se caracteriza por tener temperaturas de 25-27°C media anual, precipitaciones de 3050-3420 mm anuales y periodo secos definidos (Corrales, 2012; Solano y Villalobos, 2000), podría ser que las condiciones en el momento en que se realizaron las pruebas beneficiaran a algunos de los fitopatógenos inoculados y a otros no, ya que según Netto et al. (2017) el crecimiento óptimo de la mayoría de las especies de esta familia varía entre los 27.9°C y 32.3°C, las cuales son temperaturas mayores a la zona donde se llevaron a cabo las pruebas.

Otra de las posibles razones de que los árboles no mostraran síntomas, sería la virulencia asociada a las especies de Botryosphaeriaceae. Estudios como los de Picos et al. (2015) mencionan que *L. theobromae* es una de las especies más virulentas en comparación con otras especies de esta misma familia, como *L. pseudotheobromae*. También, Marques et al. (2013) indicó que la especie *L. hormozganensis* es más virulenta que *L. pseudotheobromae*. Esto podría explicar el motivo del porqué solo algunas de las especies de *Lasiodiplodia* lograron generar síntomas, ya que al ser más virulentas puede que requieran de menos tiempo para manifestar síntomas como los observados en este estudio.

5. CONCLUSIONES

- El diagnóstico realizado en las plantaciones de teca, permitió determinar niveles de incidencia de la muerte descendente mayores para las plantaciones de 12 años de Parrita y menores en las plantaciones de 7 - 8 años de Pococí. Además, este permitió comprobar que la incidencia en las plantaciones de Parrita es mayor que la reportada a nivel nacional del 13%.
- En esta investigación se logró aislar seis hongos fitopatógenos asociados a la muerte descendente del cultivo de teca.
- El análisis molecular de la región de ITS permitió la identificación del género de todos los aislamientos.
- De los aislamientos Pc2 y Pc3 (*L. theobromae* y *L. brasiliensis*), se logró determinar su patogenicidad y asociarlos como los potenciales agentes causales de la muerte descendente de la teca bajo las condiciones de la presente investigación.

6. RECOMENDACIONES

- Con respecto a los organismos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, se recomienda realizar la identificación por métodos moleculares y analizar múltiples loci, para una identificación más precisa de las especies.
- Para las pruebas de patogenicidad, se recomienda hacer pruebas bajo ambientes más controlados, para evitar el efecto de factores externos cambiantes como la temperatura y la humedad.
- Como parte de las medidas de manejo de la enfermedad, se deben desarrollar investigaciones enfocadas en la búsqueda de vectores asociados con los agentes causales de la muerte descendente de la teca. Esto con el objetivo de establecer estrategias de manejo integrado basadas en el manejo de las plagas.
- Asimismo, se deben desarrollar investigaciones para la búsqueda de genotipos resistentes a los patógenos responsables de la muerte descendente de la teca, con la finalidad de establecer programas de mejoramientos genético y la posterior introducción de estos árboles a campo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Goltapeh, E. M., Zare, R., & Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25, 1. <https://doi.org/10.3767/003158510X524150>
- Agrios, G.N. (2005). *Fitopatología*. (2ª ed.). Limusa S.A.
- Aiello, D., Gusella, G., Fiorenza, A., Guarnaccia, V., & Polizzi, G. (2020). Identification of *Neofusicoccum parvum* causing canker and twig blight on *Ficus carica* in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(1), 213-218.
- Alama, I., Maldonado, E., & Rodríguez, E. (2006). *Lasiodiplodia theobromae* afectando el cultivo de palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. *Universalía*, 11(2), 4-15. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2924536>
- Aloi, F., Riolo, M., Parlascino, R., Pane, A., & Cassiola, S. (2021). Bot gomosis of lemon (*Citrus x limon*) caused by *Neofusicoccum parvum*. *Journal of Fungi*, 7(294), 1-16. <https://doi.org/10.3390/jof7040294>
- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A., & Phillips, A. J. L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal diversity*, 28, 1-13.
- Arcos-Alcívar, F. & Jaimez, R. E. (2020). Aporte de nutrientes por caída de hojarasca en plantaciones de *Tectona grandis* (Teca) en períodos de sequía. <https://doi.org/10.37135/ns.01.05.02>
- Arguedas, M. (2003). Problemas fitosanitarios de teca (*Tectona grandis* L.f) América Central: Nuevos reportes. In Seminario y grupo de discusión virtual. Teca (*Tectona grandis* L.f). https://www.researchgate.net/publication/228513047_Problemas_fitosanitarios_en_Teca_tectona_grandis_Lf_en_America_Central_Nuevos_reportes
- Arguedas, M., Chaverri, P., & Verjans, J. (2004). Problemas fitosanitarios de la teca en Costa Rica. *Revista Recursos Naturales y Ambiente*, 41, 130-135. <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/handle/11554/9787>
- Arguedas, M., Rodríguez, M., Guevara, M., Esquivel, E., Sandoval, S., & Briceño, E. (2019). Incidencia y severidad de *Olivea tectonae* y *Rhabdopterus* sp. en plantaciones jóvenes de

- Tectona grandis* L.f. bajo distintas modalidades de control de arvenses. *Agronomía Costarricense*, 43(1), 9-19. <https://doi.org/10.15517/RAC.V43I1.35631>
- Arias, D., Calvo, J., Arguedas, M., & Salas, B. (2005). Síndrome de la mortalidad de la teca en Costa Rica. <https://www.researchgate.net/>
- Balasunduran, M., & Sankaran, K.V. (1991). *Fusarium solani* associated with stem canker and dieback of teak in southern India. *Indian Forester*, 117(2), 147-149. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19930665634>
- Baltodano, C. (2007). Evaluación fitosanitaria de las plantaciones de *Tectona grandis* L.f. de Ecoforest (Panamá) S.A. <http://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/547>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (2006). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minnesota, USA: APS Press.
- Barreto, J. R., & Anaguano, A. H. (2014). Evaluación del crecimiento y compatibilidad de hongos de la podredumbre blanca. *Ciencia en Desarrollo*, 5(2), 197-205. <http://ref.scielo.org/p7dvvc>
- Batista, D. D., Costa, V. D., Barbosa, M. A., Terao, D., & Silva, F. M. (2010). Manejo Integrado de *Lasiodiplodia theobromae* em Videira no Submédio do Vale do Sao Francisco. *Embrapa Semiárido Circular Técnica*, 91, 1-8.
- Bautista-Cruz, M. A., Almaguer-Vargas, G., Leyva-Mir, S. G., Colinas-León, M. T., Correia, K. C., Camacho-Tapia, M., ... & Tovar-Pedraza, J. M. (2019). Phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with cankers and dieback symptoms of persian lime in Mexico. *Plant disease*, 103(6), 1156-1165. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1036-RE>
- Belezaca, C., Solano, E., López, R., Baque, R., Ávila, A., Córdor, M., Bohórquez, T., & Dueñas, D. (2018). Hongos fitopatógenos asociados a la enfermedad de marchitez vascular y muerte regresiva en plantaciones de *Tectona grandis* L.f. (teca) en el Trópico Húmedo Ecuatoriano. *Boletín Micológico*, 33(2). <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2018.33.2.1410>
- Berraf, A., Mahamed, A. E., Aigoun, W., Spetik, M., Cechová, J., Pokluda, R., Baránek, M., Eichmeter, A., & Alves, A. (2020). *Lasiodiplodia mitidjana* sp. nov. and other Botryosphaeriaceae species causing Branch canker and dieback of *Citrus sinensis* in Algeria. *Plos One*, 15(5), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232448>

- Bogantes, A. & Mora, E. (2017). Influencia del genotipo y la temperatura sobre la carpelodia en papaya *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 577-590.
- Borges, R. C. F., Marques, E., Macedo, M. A., Martins, I., Silva Filho, J. G. D., & Mello, S. C. M. D. (2018). Biocontrol of teak canker caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Revista Árvore*, 42(3). <https://dx.doi.org/10.1590/1806-90882018000300004>
- Borges, R. C. F., Santos, M. D. M., Macedo, M. A., Martins, I., Nascimento, A. G., Café Filho, A. C., ... & de Mello, S. C. M. (2015). A trunk canker disease of *Tectona grandis* induced by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. *New Disease Reports*, 31, 26. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.031.026>
- Camino, R. D. & Pierre, J. (2013). *Las plantaciones de teca en América Latina: mitos y realidades* (Informe Técnico N° 397). <http://agritrop.cirad.fr/571671/1/tecalibro.pdf>
- Chávez, E. & Fonseca, W. (1991). *Teca: (Tectona grandis L.f.) árbol de uso múltiple en América Central* (Informe Técnico N° 179). <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr>
- CIPROC (2020). *Informe TM-0803. Resultados de la identificación molecular de los patógenos de teca.*
- Corrales, J. (2012). *Determinación de ecuaciones de volumen y coeficiente mórfico para la especie Dalbergia retusa, en la zona de Parrita, Puntarenas, Costa Rica* [Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/2953>
- Correia, K. C., Câmara, M. P. S., Barbosa, M. A. G., Sales Jr, R., Agusti-Brisach, C., Gramaje, D., ... & Michereff, S. J. (2013). Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea*, 380-387.
- Coutinho, I. B. L., Freire, F. C. O., Lima, C. S., Lima, J. S., Gonçalves, F. J. T., Machado, A. R., ... & Cardoso, J. E. (2017). Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. *Plant Pathology*, 66(1), 90-104. <https://doi.org/10.1111/ppa.12565>
- Custódio, F. A., Machado, A. R., Soares, D. J., & Pereira, O. L. (2018). *Lasiodiplodia hormozganensis* causing basal stem rot on *Ricinus communis* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 13(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s13314-018-0308-3>

- DaSilva, A., Brainer, R., Michereff, S., Bezerra, M., & Saraiva, M. (2012). Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, *132*, 489-498. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9891-2>
- Doilom, M., Shuttleworth, L. A., Roux, J., Chukeatirote, E., & Hyde, K. (2015). Botryosphaeriaceae associated with *Tectona grandis* (teak) in Northern Thailand. *Phytotaxa*, *233*(1), 1-26. <https://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.233.1.1>
- Dong, W., Doilom, M., Hyde, K. D., Phillips, A., Yan, K., To-anun, C., ... & Nalumpang, S. (2020). Pathogenicity of five Botryosphaeriaceae species isolated from *Tectona grandis* (teak): the pathogenic potential of *Lasiodiplodia* species. *Asian Journal of Mycology*, *3*(1), 399-407. <https://doi.org/10.5943/ajom/3/1/12>
- El-Habbaa, G., Abdou, M., & El-Shaery, S. (2016). Biological and chemical control of grapevine die-back disease and their effect on defense related enzymes. *Int J Sci Eng Res*, *7*, 345-351.
- Fernández, J. (2014). *Gestión de la fertilidad y nutrición de suelos de plantaciones de teca (Tectona grandis L.f.) en América Central* [Tesis de doctorado, Universidad Politécnica de Madrid]. <http://oa.upm.es/30870/>
- Fischer, I. H., Ferreira, M. D., Spósito, M. B., & Amorim, L. (2009). Citrus postharvest diseases and injuries related to impact on packinglines. *Scientia Agricola*, *66*(2), 210-217. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162009000200010>
- Fonseca, W. (2003). *Manual para productores de Teca (Tectona grandis L.f) en Costa Rica*. <https://www.fonafifo.go.cr/es/documentos/manuales-del-ppsaf>
- García, P., Perera, S., Rodríguez, A., & Siverio, F. (2017). *Enfermedades del aguacate causadas por especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae*. <https://www.icia.es/icia/download/publicaciones/Botryosphaeriaceae01.pdf>
- Gezhagne, A., Admasu, W., & Cafà, G. (2020). *Neofusicoccum parvum* causing *Eucalyptus* canker and die-back in Ethiopia. *International Journal of Plant Pathology*, *11*(1), 1-5. <https://doi.org/10.3923/ijpp.2020.1.5>

- González, E. (2014). *Determinación del momento óptimo de cosecha final en una plantación de Tectona grandis de la zona norte de Costa Rica* [Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/5798>
- Haenzi, M., Cochard, B., Chablais, R., Crovadore, J., & Lefort, F. (2021). *Neofusicoccum parvum*, a new agent of sequoia canker and dieback identified in Geneva, Switzerland. *Forest*, 21, 1-12. <https://doi.org/10.3390/f12040434>
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: A User friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Halleen, F., Fourie, P., & Crous, P. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology*, 56, 637-645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01613.x>
- Hernández, S. (2017). *Establecimiento de criterios técnicos para el mejoramiento y expansión de una plantación de Teca (Tectona grandis) en la finca Villa de San Francisco, Municipio de Aguachica – Cesar* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Abierta y a Distancia de Colombia]. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/12371>
- Honger, J. O., Brentu, C., Opoku, N., & Dzidzienyo, D. (2017). Identification and molecular phylogenetics of *Lasiodiplodia parva* associated with white, yam (*Dioscorea rotundata* L.) in Ghana. *Ghana Journal of Science*, 57, 23-33.
- INDER (2014). Informe de caracterización integral básica del territorio de Pococí. <https://www.inder.go.cr/pococi/Caracterizacion-territorio-Pococi.pdf>
- INEC (2015). VI Censo Nacional Agropecuario 2014: Resultados Generales. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/U40-10581.pdf>
- INIAP (2017). *Etiología de la ‘muerte regresiva en teca en Ecuador’ y rol de insectos en su dispersión*. <http://www.iniap.gob.ec>
- Ismail, A. M., Cirvilleri, G., Lombard, L., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., & Polizzi, G. (2013). Characterisation of *Neofusicoccum* species causing mango dieback in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 549-557. <https://doi.org/10.4454/JPP.V9513.008>

- Ismail, A. M., Cirvilleri, G., Polizzi, G., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., & Lombard, L. (2012). *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology*, *41*(6), 649-660. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0163-1>
- Iturrityxa, E., Slippers, B., Mesanza, N., & Wingfield, M. J. (2011). First report of *Neofusicoccum parvum* causing canker and die-back of *Eucalyptus* in Spain. *Australasian Plant Disease Notes*, *6*(1), 57-59. <https://doi.org/10.1007/s13314-011-0019-5>
- Jacas, J., Caballero, P., & Avilla, J. (2005). *El control biológico de plagas y enfermedades. La sostenibilidad de la agricultura mediterránea*. Castelló de la Plana, España: Publicacions de la Universitat Jaume I.
- Khanzada, M. A., Lodhi, A. M., & Shahzard, S. (2005). Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sindh. *Pakistan Journal of Botany*, *37*(4), 1023-1030. [www.pakbs.org/pjbot/PDFs/37\(4\)/PJB37\(4\)1023.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/37(4)/PJB37(4)1023.pdf)
- Kollert, W. & Cherubini, L. (2012). Teak resources and market assessment 2010. *FAO Planted Forests and Trees Working Paper FP/47/E, Rome, 206*. <http://www.fao.org/3/a-an537e.pdf>
- Lawrence, D. P., Travadon, R., Nita, M., & Baumgartner, K. (2017). TrunkDiseaseID.org: A molecular database for fast and accurate identification of fungi commonly isolated from grapevine wood. *Crop Protection*, *102*, 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.08.017>
- Liang, L., Li, H., Zhou, L. and Chen, F. (2020). *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes stem canker of chinese hackberry in China. *Journal of Forestry Research*, *31*(6), 2571-2580. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01049-x>
- Marques, M. W., Lima, N. B., de Moraes, M. A., Barbosa, M. A. G., Souza, B. O., Michereff, S. J., ... & Câmara, M. P. (2013). Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, *61*(1), 181-193. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0231-z>
- Martínez, H. (2015). Teca (*Tectona grandis* L.f.): condiciones para su cultivo “Fomento de la reforestación comercial para la mejora y conservación de las reservas de carbono”. <http://reddcr.go.cr/es/centro-de-documentacion>
- Martins, M. V. V., Lima, J. S., Hawerroth, F. J., Ootani, M. A., Araujo, F. S. A., Cardoso, J. E., ... & Viana, F. M. P. (2018). First report of *Lasiodiplodia brasiliense* causing disease in apple trees in Brazil. *Plant Disease*, *102*(5), 1027-1027.

- Méndez-Álvarez, D., Rodríguez, A., Badilla-Valverde, Y., & Murillo-Gamboa, O. (2019). First report of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium proliferatum* causing teak die back in Costa Rica. *Forest Pathology*, 49(3), e12504. <https://doi.org/10.1111/efp.12504>
- Murillo, O., Badilla, Y., Rojas, F., & Mata, X. (2014). Uso de biocontroladores y materiales tolerantes a los patógenos asociados al síndrome de la muerte descendente de la teca (*Tectona grandis*) y cancro *Nectria* de la melina (*Gmelina arborea*). <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/3372>
- NCBI (24 de julio de 2018). *TSA: Tectona grandis, transcriptome shotgun assembly*. U.S. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/GGSF00000000.1>
- Netto, M. S., Assunção, I. P., Lima, G. S., Marques, M. W., Lima, W. G., Monteiro, J. H., ... & Câmara, M. P. (2014). Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*, 67(1), 127-141. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0279-4>
- Netto, M. S., Lima, W. G., Correia, K. C., Da Silva, C. F., Thon, M., Martins, R. B., ... & Câmara, M. P. (2017). Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal biology*, 121(4), 437-451. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.006>
- Nitschke, E., Nihlgard, M., & Varrelmann, M. (2009). Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of a polymerase chain reaction - amplified translation elongation factor 1 α gene fragment. *The American Phytopathological Society*, 99(8), 921-929. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-8-0921>
- ONF (2017). Uso y aportes de la madera en Costa Rica: Estadísticas 2016. <https://www.onfcr.org/media/uploads/documents/informe-usos-y-aportes-2016.pdf>
- Olmo, D., Armengol, J., León, M., & Gramaje, D. (2016). Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from almond trees on the island of Mallorca (Spain). *Plant Disease*, 100(12), 2483-2491. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0676-RE>
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., & Wingfield, M. J. (2009). Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: a case study on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51(2), 259-268.

- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadesh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J., & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76(1), 51-167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Rangel, E. (2021). *Caracterización, evaluación del proceso de colonización y búsqueda de estrategias de control biológico de hongos de la familia Botryosphaeriaceae asociados a la vid en México* [Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3578>
- Rivera, G. (2018). *Conceptos introductorios a la fitopatología*. EUNED.
- Rocha, R., Lozano, P., & Martínez, Y. (Ed.). (2004). *Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedero*. Fomento Editorial.
- Rodríguez, E., Maldonado, E., & Alves, A. (2015). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 141(3), 477-489. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0557-8>
- Rodríguez, J. (2018). *Evaluación del efecto de inoculación de Lasiodiplodia theobromae y Fusarium proliferatum en plantas jóvenes de Tectona grandis (L.f)* [Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. <https://hdl.handle.net/2238/11539>
- Sáenz, A. G. (2009). Genes y especies. *Ecosistemas*, 18(1), 3-9.
- Serrato-Díaz, L. M., Aviles-Noriega, A., Soto-Bauzó, A., Rivera-Vargas, L. I., Goenaga, R., & Bayman, P. (2020). Botryosphaeriaceae fungi as causal agents of dieback and corky bark in rambutan and longan. *Plant disease*, 104(1), 105-115. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0295-RE>
- Slippers, B., & Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal biology reviews*, 21(2-3), 90-106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Slippers, B., Roux, J., Wingfield, M. J., Van der Walt, F. J. J., Jami, F., Mehl, J. W. M., & Marais, G. J. (2014). Confronting the constraints of morphological taxonomy in the Botryosphaeriales. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 33, 155. <https://doi.org/10.3767/003158514X684780>

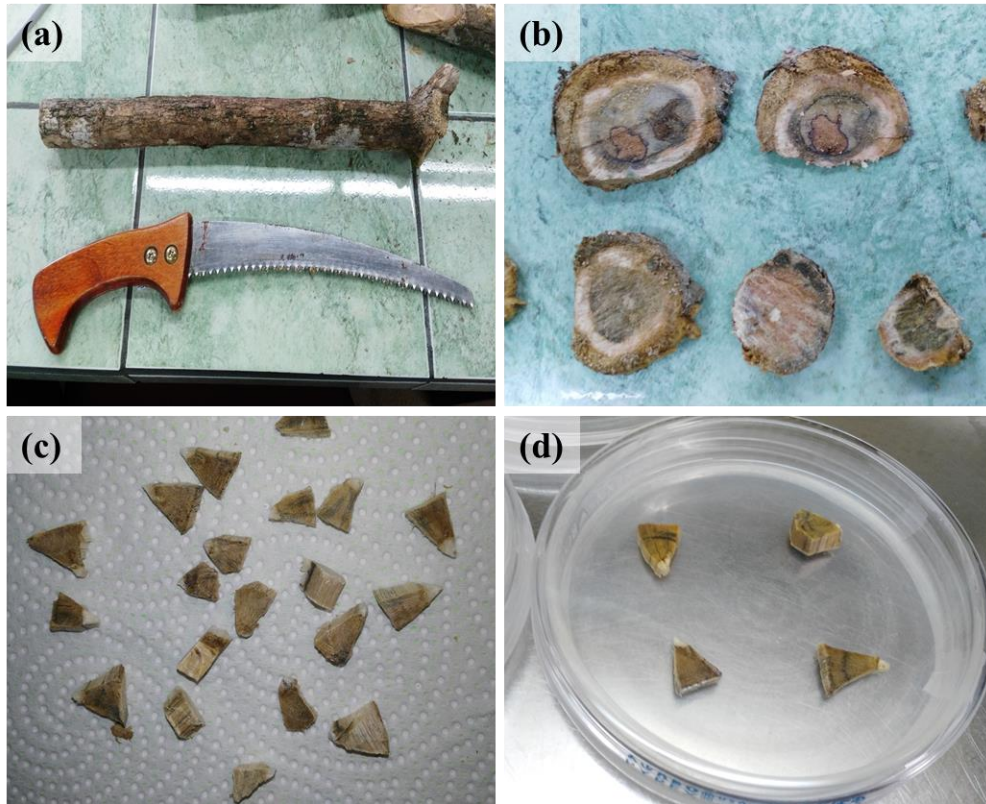
- Solano, E. H., Belezaca, C., López, R., & Macías, K. (2019). Incidencia y severidad de la enfermedad marchitez vascular, muerte regresiva de *Tectona grandis* L. F. en cuatro provincias de Ecuador. *Universidad y Sociedad*, 11(5), 262-269. <http://ref.scielo.org/2n333c>
- Solano, J., & Villalobos, R. (2000). *Regiones y subregiones climáticas de Costa Rica*. San José: Instituto Meteorológico Nacional. Instituto Meteorológico Nacional. Recuperado de www.imn.ac.cr.
- Su, Y. Y., Qi, Y. L., & Cai, L. (2012). Induction of sporulation in plant pathogenic fungi. *Mycology*, 3(3), 195-200.
- Suárez, G. (2016). *Botryosphaeriaceae asociadas a la muerte de ramas en plantaciones de Eucalyptus globulus Labill, en la región del Biobío y de La Araucanía (Chile)* [Tesis de maestría, Universidad de Concepción de Chile].
- Tan, Y. P., Shivas, R. G., Marney, T. S., Edwards, J., Dearnaley, J., Jami, F., & Burgess, T. I. (2019). Australian cultures of Botryosphaeriaceae held in Queensland and Victoria plant pathology herbaria revisited. *Australasian Plant Pathology*, 48(1), 25-34.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J., & Gubler, W. D. (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, 92(4), 519-529.
- Valdés, E. L. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de Trichoderma como control biológico. *Revista Científica Agroecosistemas*, 2(1).
- Valencia, S. (2018). *Escolítidos asociados en árboles de Tectona grandis L.f. (teca) enfermos con marchitez vascular y muerte regresiva en la provincia de Esmeraldas* [Tesis de licenciatura, Universidad Técnica Estatal de Quevedo]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3057>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 31

8. ANEXOS

Anexo A. Preparación de medio de cultivo PDA

El medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) se prepara de la siguiente forma: por cada litro de PDA se pesa 200 gramos de papa, los cuales se cosen en 500 ml de agua destilada. En otro beaker con 500 ml de agua destilada, se añaden 20 gramos de agar y se pone en agitación. Luego, de que la papa este cocida se recupera el líquido haciéndolo pasar a través de un colador y este se adiciona a los 500 ml de agua destilada para completar un litro de medio. Finalmente, se le adicionan 20 gramos de dextrosa, se agita y se distribuye en varios Erlenmeyer de 200 ml. Posteriormente los Erlenmeyer se autoclavan a 121 °C y 15 psi (libras de presión por pulgada cuadrada), durante 15 minutos.

Anexo B. Preparación de muestras para los aislamientos de tejido vascular de ramas de teca con síntomas de muerte descendente



Nota. a-c) Obtención de muestras para los aislamientos, a partir de tejido vascular de ramas de teca.
d) Aislamientos en medio PDA + ácido láctico.

Anexo C. Protocolo de extracción de ADN del Laboratorio de Técnicas Moleculares del CIPROC

1. Maceración de la muestra

1.1 Para micelio de hongos, colonias de bacterias, suspensión de esporas: coloque la muestra en un eppendorf de 1.5 ml, agregue 150 µl de Buffer de extracción y macere utilizando un pistilo Konte en el caso de micelio; aplique vortex en el caso de bacterias.

2. Extracción de ADN

2.1 Agregue 150 µl de Buffer de lisis al tejido macerado.

2.2 Agite cada muestra por 15 segundos utilizando un vortex.

2.3 Incube la muestra a 65 °C por 60 minutos.

2.4 Agregue un volumen igual al de ambos buffers (300-400 µl) de cloroformo-isoamil-alcohol (24:1) debajo de la campana de gases.

2.5 Mezcle manual y suavemente (50 veces) y centrifugue a 14000 rpm por 15 min.

2.6 Transfiera el supernadante o fase acuosa a un nuevo eppendorf.

2.7 Agregue un volumen igual al de ambos buffers (300 µl) de cloroformo-isoamil-alcohol (24:1).

2.8 Mezcle manual y suavemente (50 veces) y centrifugue a 14000 rpm por 10 min.

2.9 Transfiera el supernadante y agregue 20 µl de acetato de sodio 3M + 300 µl de etanol puro 95%.

2.10 Mezcle el contenido manualmente y colóquelo a -20°C al menos por 30 min para precipitar el ADN.

2.11 Centrifugue a 14000 rpm por 20 min.

2.12 Elimine el acetato y etanol cuidadosamente, decantándolos en un beaker.

2.13 Limpie el pellet de ADN con 150 µl de etanol de 70% frío.

2.14 Centrifugue a 12000 rpm por 10 min.

2.15 Decante el etanol cuidadosamente y deje boca abajo cada eppendorf sobre una toalla estéril para eliminar el exceso y secar por 30 min (dentro de la cámara de flujo laminar).

2.16 Disuelva en 50 µl de Buffer TE.

2.17 Guarde a -20°C.

Anexo D. Procedimiento para la inoculación de árboles de teca, en los Postulados de Koch



Nota. **a)** Equipo para inoculación: alcohol 75%, algodón, bisturí, sacabocados, sello Parafilm y cepas de hongos en medio PDA. **b)** Árbol de teca de 1.5 m. **c)** Corte en el tallo para la inoculación. **d)** Disco de PDA + micelio del hongo. **e)** Inoculación del hongo en tejido vascular del árbol. **f)** Sellado de heridas con Parafilm.

Anexo E. Análisis estadístico de ANOVA y comparación múltiple de Tukey de las tasas de crecimiento de los aislamientos de Parrita y Pococí.

ANOVA (alfa = 0.05)

```
> aov(tasacrecimiento~aislamiento)
Call:
  aov(formula = tasacrecimiento ~ aislameinto)

Terms:
            aislamiento Residuals
Sum of Squares 202.81404  1.30873
Deg. of Freedom      4      10

Residual standard error: 0.3617642
Estimated effects may be unbalanced
> anova<-aov(tasacrecimiento~aislamiento)
> summary(anova)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
cepa   4 202.81   50.70   387.4 6.47e-11 ***
Residuals 10  1.31    0.13
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Prueba de comparación múltiple de Tukey

```
> TukeyHSD(anova)
  Tukey multiple comparisons of means
  95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = tasacrecimiento ~ aislamiento)

$aislamiento
      diff      lwr      upr    p adj
PC2-PC1 -0.6666667 -1.6387840  0.3054507 0.2352741
PC3-PC1 -0.4166667 -1.3887840  0.5554507 0.6351189
PR1-PC1 -9.6100000 -10.5821173 -8.6378827 0.0000000
PR2-PC1 -0.6666667 -1.6387840  0.3054507 0.2352741
PC3-PC2  0.2500000 -0.7221173  1.2221173 0.9097602
PR1-PC2 -8.9433333 -9.9154507 -7.9712160 0.0000000
PR2-PC2  0.0000000 -0.9721173  0.9721173 1.0000000
PR1-PC3 -9.1933333 -10.1654507 -8.2212160 0.0000000
PR2-PC3 -0.2500000 -1.2221173  0.7221173 0.9097602
PR2-PR1  8.9433333  7.9712160  9.9154507 0.0000000
```


Anexo F. Datos de crecimiento diametral y tasa de crecimiento de las cepas de hongos de Parrita y Pococí

Cepa	Longitud del diámetro (mm)				Tasa de crecimiento
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	
Pr1	1.5	18.0	54.0	79.0	25.83
Pr1	2.0	18.0	54.0	79.0	25.67
Pr1	2.0	17.5	53.0	79.0	25.67
Promedio	1.8	17.8	53.7	79.0	25.72
Pr2	10.0	58.0	79.0		34.50
Pr2	10.0	56.0	79.0		34.50
Pr2	9.0	63.0	79.0		35.00
Promedio	9.7	59.0	79.0		34.67
Pc1	9.0	46.0	79.0		35.00
Pc1	9.0	64.0	79.0		35.00
Pc1	8.5	45.0	79.0		35.25
Promedio	8.8	51.7	79.0		35.08
Pc2	9.0	58.0	79.0		35.00
Pc2	9.0	47.0	79.0		35.00
Pc2	11.0	53.0	79.0		34.00
Promedio	9.7	52.7	79.0		34.67
Pc3	9.0	33.0	79.0		35.00
Pc3	10.0	50.0	79.0		34.50
Pc3	8.5	39.0	79.0		35.25
Promedio	9.2	40.7	79.0		34.92

Anexo G. Secuencias reportadas de la amplificación de las regiones ITS 4 e ITS 5 del aislamiento Pr1 de Parrita

>**Secuencia ITS 4 con 671 b.** Aislamiento Pr1. Guapinol de Parrita, Costa Rica. *N. parvum*.

GGTCAGGTCTATCTTCCTGATCCGAGGTCACCTTGAGAATAATTCAAAGGTTTCGTCCGA
GCGGGCGACGCCGTGCGCTCCAAAGCGAGGTGTTTTCTACTACGCTTGAGGCAAGACG
CCACCGCCGAGGTCTTTAAGGCGCGTCCGTGGAGGACGGGGCCCAATACCAAGCAGAG
CTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTCGGAATACCAAGGGGCGCAA
TGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT
CGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAGTTTTATT
AACTTGTTTTTCAGACTGCGAAGTTCACTGACTGGAGTTTTATGGTCCTCTGGCGGGCG
CTGGCCAGCCCCCGAAGGGCGCCGGTGCGGAGGACCGCGGCCCGCCAAAGCAACAG
AGGTAGGTACACATAGGGTGGGAGAGTCGAGCCGGAGCTCGAATCAACTCGGTAATGA
TCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACACCTTTTTTACCTTCAAACCCCCC
CCTTTTTTTTCCCTTTTTTCCTCCTTTTTTCCTTCCACCCCTCCTCCCTTTTTCTCCCTCTTCT
TTCCTCTCCTTTTTTCCTTTTT

> **Secuencia ITS 5 con 1635 pb.** Aislamiento Pr1. Guapinol de Parrita, Costa Rica. *N. parvum*.

TCAGGGAGCTGGACGTGAGGAGGACATTACCGAGTTGATTCGAGCTCCGGCTCGACTC
TCCCACCCTATGTGTACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCCTCCGCACCGGCG
CCCTTCGGGGGGCTGGCCAGCGCCCGCCAGAGGACCATAAACTCCAGTCAGTGAAC
TCGCAGTCTGAAAAACAAGTTAATAAACTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCT
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTT
CGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCCCCGTCCTCCACGGACGC
GCCTTAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACCTCGCTTT
GGAGCGCACGGCGTCGCCCCCGGACGAACCTTTGAATTATTTCTCAAGGTTGACCTCG
GATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACTTAAGCATATAAAAAGGGGGAAGAAAAAAAAA
ACAACAGGGATGCCCTTGGTACAACCTTAACTTCAAACGCCCGCATTAAATATAAAG
GTCCCACGATCATTAGGATGATTAGTGTTTCGTATTTTTATGCGCCCGTGTA AAAACAA
AAAAGCGTGCTCGTGTTAAGAATAGCACAGTGCGCGCGTAGGGCTACCAAGACTGCAC
GAGGACTTATGCATACGACCGGGTACGCAAGGAGAAAAGAAAAGAGGATAAAGTAGC

GATGTATAGGAGCCCCCGGTGGCTGAGGGAGGGGAGATTAGATAAGGAGTAGAATA
GAAAGATATAGAAGAGAGGATAGGAGTATGTTTAGAGGCGTGCGTCCGGGTAGGAATT
AGATGAGGGTAAATGAGTGGGGATATGGGGTGGGGTTTTGAAGGGGTGGTGCGGCGTG
AGTAGTGGGTAAATCGGGGGGCCTTATGATTTAATGAATATAGTATAAAAAATTCGC
CGGATATCCACAAGGGCGTTTGATCGCTTGGGTTGAGGTGTGATGTATGTTCACTTTTA
GATGGAGACCGGAGGTGGAGAGAGGTGGGGGATAGGATTGCTTTACTGCGGGCAGAC
ACTGGTGTCTAATCTGAGACGTGGGAAGGGATGATGTGCGCATACTGACGAGAAGC
GCAGAAGCGCTTTAAGATTGTTTTGCGATTACTTCCGGCGGCTGACGGTGGGGGCGAGG
TATAGATAAGGGGGGGTTACGTGCAGTGGGTATAGATGTGTGCGAGAGTAGAGAAGGAT
GAGTGTGAGTTCGATAGGGACCTGAGGTCTATGAATAGACGAGCACTACACGTGGTTG
AGATGTAGAGGAATAGGGTTTATGGCGTACTGGTTTGATTGGGGCGATGGTCTACTGTG
GGGACATAAATAATGGACACATAACACACGGTGCGGGAGCGGAAGAACGTAATATGT
ACAACGCTGGACACTGGGGGCATAGTGCACCGGTATCTCGCGGTGGAGTAGTAAGGT
GGTTTGGCAGGAGTTTTCGCTATTGAGATAGATAGGATATATGAAGGACTGATGATAGT
TA

Anexo H. Secuencias reportadas de la amplificación de las regiones ITS 4 e ITS 5 del aislamiento Pr2 de Parrita

>**Secuencia ITS 4 con 561 pb.** Aislamiento Pr2. Guapinol de Parrita, Costa Rica. *L. hormozganensis* y *L. parva*.

GGCGGACGTACTIONCACCTGATCCGAGGTCACCTTGAGAAAGTTCAGAAGGTTTCGTCCGG
CGGGCGACGCCAACCGCTCCAAAGCGAGGTGTATTCTACTACGCTTGAGGGCTGAACA
GCCACCGCCGAGGTCTTTGAGGCGCGTCCGCAGTGAGGACGGTGCCCAATTCCAAGCA
GAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAAGGGGCG
CAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGC
ATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAGTT
TATTAACCTGTTTATCAGACGTCTGCGTTTACTGACTGGAGTTTGAAGGTCCTTTGGCGG
CCGGAGCCGCCAAAGCAACAGAGGTACGTTACAAAGGGTGGGAGAGTCGAGCCGAA
GCTCGAAAACCTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACACCT
TTTTTTACTTTCAAACCCGCGCTTTCGTCCCG

>**Secuencia ITS 5 con 592 pb.** Aislamiento Pr2. Guapinol de Parrita, Costa Rica. *L. hormozganensis* y *L. parva*.

TCATGGTAGGGGGTGGCTGCCGGAGGGTCATTACCGAGTTTTTCGAGCTTCGGCTCGACTC
TCCCACCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTC
AAACTCCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTA
TTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGGAATTGG
GCACCGTCCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTTCAGCCCTCAA
GCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCCGCCGGACGAACCTTCT
GAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCGCTGAACTTAAGCATAT
CATAAAGAGCGGGAGAGAAAAGGGGGCCCCCGGGTTTTGCCCCGTTTCCACTTTTTTATC
CAA

Anexo I. Secuencias reportadas de la amplificación de las regiones ITS 4 e ITS 5 del aislamiento Pc1 de Pococí

> **Secuencia ITS 4 con 589 pb.** Aislamiento Pc1. Roxana de Pococí, Costa Rica. *L. pseudotheobramae*.

GGGGCCCGGGTCCTTTACCTGATTTCGAGGTCACCTTGAGAAAGTTCAGAAGGTTTCGTCC
GGCGGGCGACGCCAACCCTCAAAGCGAGGTGTATTCTACTACGCTTGAGGGCTGAA
CAGCCACCGCCGAGGTCTTTGAGGCGCGTCCGCAGTGAGGACGGTGCCCAATTCCAAG
CAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAAGGGG
CGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATC
GCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTA
GTTTATTAACCTTGTTTATCAGACGTCTGCGTTTACTGACTGGAGTTTGGAGGTCCTTTGG
CGGCCGGAGCCGCCAAAGCAACAGAGGTACGTTACAAAGGGTGGGAGAGTCGAGCC
GAAGCCCGAAAACCTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACA
CTTTTTTACTTACAAATCCCCCGCGTATGATAAGACCGCTGTTACAACCTTTTAACAATCA
AA

> **Secuencia ITS 5 con 598 pb.** Aislamiento Pc1. Roxana de Pococí, Costa Rica. *L. pseudotheobramae*.

ACTTTAGGCGGGCCGGGCGTAGGACATTACCGAGTTTTTCGGGCTTCGGCTCGACTCTCC
CACCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTCCAA
ACTCCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATT
CCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGAAATTGGGC
ACCGTCCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTTCAGCCCTCAAGC
GTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGTGGTTGGCGTCGCCC GCCGGACGAACCTTCTGA
ACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
TAAAGAGGGGGGAGAAAAAGGGGCCGCTTCTTTTTTTTACCCTGCTTTACAACCTTTT
GACATGAAAC

Anexo J. Secuencias reportadas de la amplificación de las regiones ITS 4 e ITS 5 del aislamiento Pc2 de Pococí

> **Secuencia ITS 4 con 671 pb.** Aislamiento Pc2. Roxana de Pococí, Costa Rica. *L. theobramae* y *L. brasiliensis*.

TTCTACGGGTCCTTTACCTGATCGAGGTCACCTTGAGAAAGTTCAGAAGGTTTCGTCCGA
GCGGGCGACGCCAACCGCTCCAAAGCGAGGTGTATTCTACTACGCTTGAGGGCTGAAC
AGCCACCGCCGAGGTCTTTGAGGCGCGTCCGCAGTGAGGACGGTGCCCAATTCCAAGC
AGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAAGGGGC
GCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTTATCG
CATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAG
TTTATTAACCTTGTTTATCAGACGTCTGCGTTTACTGACTGGAGTTTGAAGGTCCTTTGGC
GGCCGGAGCCGCCAAAGCAACAGAGGTACGTTACAAAGGGTGGGAGAGTCGAGCCG
GAGCTCGAAAACCTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTACACA
AATTTAACCTACAAACCTCCCCCTATTTATTTTTCTTTCTTCCCCCTTTTTTTTCCAACAC
CCCTCCTCCTTTTTTCTGTTTTTCTTTTTCTTCTCCTCCTTCTCCTCCTCCCCCTCTT
TCCTTCTTCTTCTTTTTCTTT

> **Secuencia ITS 5 con 585 pb.** Aislamiento Pc2. Roxana de Pococí, Costa Rica. *L. theobramae* y *L. brasiliensis*.

CCAAGGCTGCGTACCTGACGGAGACATTACCGAGTTTTTCGAGCTCCGGCTCGACTCTCC
CACCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAA
ACTCCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATT
CCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGGAATTGGGC
ACCGTCCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTTCAGCCCTCAAGC
GTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCC GCCGGACGAACCTTCTGA
ACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
TAAAGGGGGGAAAAAGAAGGCACACTTGGTTTTTCTCTGGTTTCGTCTTTCTTC

Anexo K. Secuencias reportadas de la amplificación de las regiones ITS 4 e ITS 5 del aislamiento Pc3 de Pococí

> **Secuencia ITS 4 con 1064 pb.** Aislamiento Pc3. Jiménez de Pococí, Costa Rica. *L. theobramae* y *L. brasiliensis*.

GTCGAGTGTACCCTCCTGATCCGAGGTCACCTTGAGAAAGTTCAGAAGGTTTCGTCCGAG
CGGGCGACGCCAACCGCTCCAAAGCGAGGTGATTCTACTACGCTTGAGGGCTGAACA
GCCACCGCCGAGGTCTTTGAGGCGCGTCCGCAGTGAGGACGGTGCCCAATTCCAAGCA
GAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAAGGGGCG
CAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGC
ATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAGTT
TATTAACCTTGTTTATCAGACGTCTGCGTTTACTGACTGGAGTTTGAAGGTCCTTTGGCGG
CCGGAGCCGCCAAAGCAACAGAGGTACGTTACAAAGGGTGGGAGAGTCGAGCCGGA
GCTCGAAAACCTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACACAA
TTTTTAACCTACAAACCTCCCCCTTTTTGTCATTGCGCGTTCGAACTTTTATTCAAATT
AACCCCGTTGGTTTTAGGGGGTTACCTCCGACTCTTATACAATCCGAGGTTACGGGGT
TTTATTTACAGGCCCATGGGTGAGCTCGACTGTGTTGCCCCACGGGTGGGTGGGGAT
AAACTACAATTCTAGTGAGATCAGCCTTTCCCGCAGCAACGACGAGAGGGGTGTCACGG
GTGGTGATTCTAGAAATTTTTGCCGGAAGTCCCCGAGTAACAATTTAGAAAAACATAGA

AAAAAAAAACCCCGCCGGCTTTAGAGAGGAGATATTATGCTTTTTGTGGTCATTCTGGCG
GGTTTCCGGCCAGATGAAGAGTATTTTCATACGTTCTTTCATGGGACACCCCGGGGGTA
ATTGGAGGATGTTCCCGTGGGAATTTTAATGGAGGGCTATATGGGGGTGGCCTGGAAA
AGGCGGGAGGCAACTTAGTCTGATTTATATAATAAAGACTAACCATATGAGTGCCATTG
ACCCCG

> **Secuencia ITS 5 con 594 pb.** Aislamiento Pc3. Jiménez de Pococí, Costa Rica. *L. theobramae* y *L. brasiliensis*.

TCTTTGGAGGTGACGTGCGGGAGGGTCATTACCGAGTTTTTCGAGCTCCGGCTCGACTCT
CCCACCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTC
AAACTCCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGTA
TTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGAATTGG
GCACCGTCCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTTCAGCCCTCAA
GCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCC GCCGGACGAACCTTCT
GAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT
CATAAAAAGCCGGAAAAAAAAGGGTTTGAAATTTGTTGTTAACTTTTTTCCACCTTTAAA
GCTGAA