

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PATOGENICIDAD DE *Phylloporia chryseita* (Berk.) Ryv.  
HYMENOGYNIACEAE SOBRE  
*Erythrochiton gymnanthus* Kallunki RUTACEAE.

Tesis sometida a la consideración de la comisión del  
Programa de Estudios de Posgrado en Biología para  
optar al grado de Magister Scientiae

RHINA ESMERALDA ESQUIVEL VASQUEZ

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio". Costa Rica.

1993

## DEDICATORIA

Con Amor a mis Hijos:

Jessica Esmeralda y Oscar Elías  
por compartir esta experiencia,  
para quienes deseo un mundo en  
paz y armonía.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos:

Al Gobierno Alemán por medio de su agencia del Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por financiar mis estudios de Maestría, a través del Consejo Superior Universitario Centroamericano (CSUCA). A la unidad de Microscopía Electrónica, por facilitar las instalaciones y el equipo para desarrollar la investigación. A la Universidad de El Salvador ( UES ) por facilitar mi superación académica.

Al Ministerio de Recursos Naturales Energía y Minas por permitir el ingreso a la Reserva Biológica Carara, así mismo al personal que labora en la Reserva.

A la Dra. Julieta Carranza por su asesoría, y amistad brindada durante el desarrollo de mis estudios, a los miembros del comité M.Sc. Elmer Guillermo García, al Dr. José Francisco Di Stefano y al Dr. Oscar Rocha, por sus revisiones y sugerencias dadas a este trabajo.

A todos los profesores que en algún momento brindaron sus conocimientos para mi formación académica.

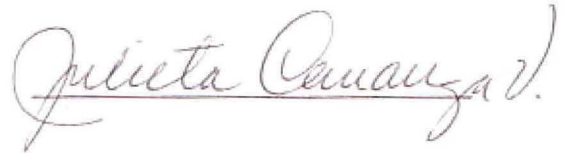
A María Luz, madre abnegada y mi hermana Susana Beatriz quienes me impulsaron y me brindaron todo su apoyo para la culminación de esta fase de mi vida.

A Oscar Armando por su amor, paciencia y apoyo incondicional durante las etapas de estudio y momentos difíciles.

A mis compañeros Centroamericanos y Panameños, para quienes guardo un gran afecto y los recordaré siempre.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae

Julieta Carranza Velázquez, Ph. D.  
Director de Tesis



Elmer Guillermo García, M. Sc.  
Miembro del Comité Asesor



José Francisco Di Stefano, Ph. D.  
Miembro del Comité Asesor



Oscar Rocha, Ph. D.  
Dir. del Programa de  
Posgrado de Biología \*



Luis Camacho Naranjo, Ph. D.  
Decano del Sistema de  
Estudios de Posgrado



Rhina Esmeralda Esquivel Vásquez  
Candidata



\* El Dr. Oscar Rocha sustituyó a la Dra. Julieta Carranza V.

## INDICE

	PAGINA
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
APROBACION DE LA TESIS.....	iv
INDICE.....	v
PREFACIO.....	vii
RESUMEN.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE APENDICES.....	xii
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	12
I- Descripción del área de estudio.....	12
II- Selección de la parcela y observación de las plantas.....	14
III- Recolección y tratamiento de las muestras.....	16
IV- Aislamiento y cultivo del hongo.....	18
V- Análisis estadísticos.....	20
RESULTADOS.....	21
I- Crecimiento en altura de plantas sanas e infectadas.....	21
II- Penetración, infección e invasión de los tejidos..	30
III- Crecimiento vegetativo de <u>Phylloporia chrysita</u> <u>in vitro</u> .....	30

DISCUSION.....	39
CONCLUSIONES.....	47
REFERENCIAS.....	48
APENDICES.....	52

## PREFACIO

Esta tesis está escrita de acuerdo al Reglamento del Sistema de Estudios de Posgrado de la Escuela de Biología, de la Universidad de Costa Rica, y se sigue las normas de presentación de la Revista de Biología Tropical.

## RESUMEN

Se estudió la patogenicidad del hongo Phylloporia chrysa sobre arbustos de Erythrochiton gymnanthus, en un área de la Reserva Biológica Carara, Costa Rica. Se midió el crecimiento en altura de plantas sanas e infectadas y se anotó la presencia y distribución de cuerpos fructíferos a diferentes alturas del tallo y ramas de la planta. La observación de la distribución de las hifas en los diferentes tejidos se llevó a cabo por medio de cortes histológicos de tallo y peciolo de hojas, vistos a través del microscopio de luz y electrónico de barrido. Además se evaluó el crecimiento del hongo en tres medios de cultivo: agar-extracto de malta, agar-extracto de tallo y agar-extracto de hojas de la planta hospedera; a tres temperaturas (26, 31 y 35 °C).

P. chrysa causó una disminución significativa de un 52 % en el crecimiento en altura de las plantas infectadas, con respecto a las plantas sanas.

Se observó invasión de hifas en los tejidos epidérmico, parenquimático y vascular, en los cortes histológicos de tallo y peciolo infectados.

De los tratamientos utilizados en el laboratorio, el mejor crecimiento vegetativo de P. chrysa se obtuvo en medio de cultivo agar- extracto de malta a 26 °C. No se observó crecimiento vegetativo en los medios con extractos de la planta hospedera.



## LISTA DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
1. Incremento acumulativo promedio en altura (cm) de las plantas sanas. Carara, enero 1992-julio 1993.....	22
2. Incremento acumulativo promedio en altura (cm) de las plantas infectadas. Carara, enero 1992-julio 1993.....	22
3. Comparación de promedios de las variables medidas: tasa de crecimiento en altura (cm/mes) de plantas sanas e infectadas, cuerpos fructíferos, humedad relativa (%), temperatura (°C) y precipitación (mm). Carara, enero 1992-julio 1993.....	25

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Distribución de <i>P. chrysa</i> en América y Asia tropical, (Gilbertson y Ryvarden 1987).....	5
2. Cuerpo fructífero de <i>P. chrysa</i> sobre tallo y peciolo de <i>E. gymnanthus</i> .....	7
3. <i>Phylloporia chrysa</i> . a) hifas del contexto inferior, b) hifas del contexto superior, c) basidio y d) basidiósporas.....	8
4. Planta de <i>Ervthrochiton gymnanthus</i> en el sitio de estudio. Carara.....	10
5. Localización de la Reserva Biológica Carara. Costa Rica. 1993.....	13
6. Ubicación del sitio de muestreo en la Reserva Biológica Carara.....	15
7. Incremento acumulativo Promedio en altura y sus desviaciones estándar de plantas sanas (PS) e infectadas (PI). Carara, enero 1992-julio 1993.....	24
8. Temperaturas mensuales promedio, mínima y máxima en Lagunillas, Orotina (1992-1993). Fuente: Instituto Metereológico Nacional de Costa Rica.....	26
9. Humedad relativa mensual promedio, mínima y máxima en Lagunillas, Orotina (1992-1993). Fuente: Instituto Metereológico Nacional de Costa Rica.....	27

10. Precipitación total mensual (mm) en Lagunillas, Orotina (1992-1993). Fuente: Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica.....	28
11. Corte transversal de tallo no infectado. a) parénquima cortical, b) cambium vascular, c) tejidos vasculares. Vista al microscopio de luz (20 X).....	31
12. Corte transversal de tallo infectado por <u>P. chrysita</u> . Vista al microscopio de luz. A: nótese la invasión fúngica (20 X). B: invasión de las hifas en floema y xilema (50 X). a) basidiocarpo, b) parénquima cortical, c) floema y d) xilema.....	32
13. Corte transversal de tallo infectado por <u>P. chrysita</u> . Vista al microscopio electrónico de barrido (30 X). Nótese la inserción del basidiocarpo en los tejidos del tallo. a) basidiocarpo, b) parénquima cortical, c) cambium vascular y d) tejidos vasculares.....	33
14. Corte transversal del tallo infectado por <u>P. chrysita</u> . Se observan hifas en células del tejido parénquima cortical. Vista al microscopio electrónico de barrido (1.31 X).....	34
15. Corte transversal de peciolo infectado por <u>P. chrysita</u> . Hifas en células del tejido parénquima cortical. Vista al microscopio electrónico de barrido (1.99 X).....	35
16. Crecimiento vegetativo de <u>P. chrysita</u> en medio de cultivo agar-extracto de malta a tres diferentes temperaturas. ....	38

## LISTA DE APENDICES

Apéndice No.	PAGINA
1. Datos promedios climatológicos: temperatura (°C), humedad relativa (%) y precipitación (mm). Estación Metereológica Lagunillas, Orotina. 1992.....	52
2. Datos promedios climatológicos: Temperatura (°C), humedad relativa (%) y precipitación (mm). Estación Metereológica Lagunillas, Orotina. 1993.....	53
3. Prueba de Regresión Múltiple de parámetros ambientales y biológicos que afectan el crecimiento de las plantas infectadas. Carara, enero 1992-julio 1993.....	54

## INTRODUCCION

La gran diversidad de especies de plantas en los bosques tropicales, evita el desarrollo de enfermedades epidémicas. Los individuos de una especie dada parecen estar muy separados y rara vez ocurren en arboledas o colonias, toda la flora es una mezcla heterogénea de individuos, en la cual un patógeno no puede aumentar fácilmente la cantidad de inóculo y causar lesiones severas en la población de una especie determinada (Harlan 1976, Dinoor y Eshed 1984).

Las comunidades naturales mantienen un equilibrio dinámico entre los factores genéticos, ecológicos y patológicos. Sin embargo, cualquier cambio en la magnitud relativa de estos factores, puede variar el equilibrio de la comunidad. La importancia de los patógenos de plantas resulta evidente cuando estos cambios ocasionan epidemias (Dinoor y Eshed 1984).

Para que se presente una enfermedad, deben darse tres condiciones: un hospedero susceptible, un patógeno agresivo y virulento y un ambiente favorable, a esto podemos agregarle una cuarta condición: el tiempo, o sea la época del año en que el patógeno y el hospedero están en yuxtaposición, el tiempo y la duración en que se dan la temperatura y humedad favorables para diseminación, germinación y establecimiento de la infección, etc. (Browning et al. 1977).

Los patógenos tienen la capacidad de sufrir cambios rápidos o mutaciones, y de poseer un potencial más alto de propagación que sus hospederos (Dinoor y Eshed 1984), por lo

que se les considera potencialmente, como las mayores fuerzas selectivas que afectan el tamaño y estructura de las poblaciones de plantas. Los efectos que pueden producir en las poblaciones son: a) reducción de la fecundidad; b) disminución de la habilidad para competir con otras plantas vecinas, o c) causar la muerte. Estos efectos se reflejarán en el tamaño de las actuales y futuras poblaciones. Si los cambios se presentan en una forma desproporcionada en un subgrupo de individuos susceptibles al ataque, los patógenos pueden afectar la estructura genética de la población (Burdon 1987).

En la naturaleza se calcula que existen aproximadamente 1 500 000 especies de hongos, de las cuales, únicamente alrededor del 5% (69 000) son conocidas (Hawksworth 1991). De éstas, casi 8 000 son fitopatógenas y causan unas 80 000 enfermedades (Agrios 1989), por lo que son considerados como el grupo más amplio de agentes causales de enfermedades en las plantas.

Los hongos fitopatógenos atacan todos los órganos de la planta y alteran procesos como: absorción y transporte de agua y minerales, fotosíntesis, transporte de fotoasimilados, reproducción, y supervivencia (CATIE 1991). A la vez pueden reducir la variedad de plantas en una zona geográfica determinada, al destruir aquellas especies que sean muy susceptibles al ataque (Agrios 1989).

Algunos de estos hongos son parásitos obligados y presentan especificidad con respecto al tipo de hospedero que

atacan. Es probable que esta especificidad se deba a una coevolución entre el patógeno y su hospedero, en donde se ha desarrollado cierta tolerancia entre ambos, y a la producción de ciertos nutrientes por parte del hospedero que son requeridos por los organismos que los atacan (Agrios 1989).

Las plantas superiores de uso agrícola y forestal pueden estar sujetas a infecciones por uno o más hongos patógenos. A escala mundial, estos organismos originan pérdidas en los cultivos, que ascienden a millones de dólares anuales (National Academy of Sciences 1988). Se han comunicado pérdidas económicas importantes en el campo forestal en zonas templadas, debido a enfermedades causadas por hongos en plantaciones y parques, o a daños ocasionados en aserraderos. En estos casos sobresalen varias especies de royas (Uredinales), Endothia parasitica y Ceratocystis spp. (Ascomycetes) y Phellinus spp (Aphyllophorales) (CATIE 1991).

En áreas tropicales no se han llevado a cabo estudios sobre el impacto de las enfermedades fúngicas en los bosques.

Las principales especies de hongos patógenos se agrupan en las Subdivisiones Mastigomycotina, Deuteromycotina, Ascomycotina y Basidiomycotina, en la cual se incluyen las royas, carbones y muchos hongos que degradan la madera en los bosques (National Academy of Sciences 1988). Dentro de esta Subdivisión cabe mencionar al Orden Aphyllophorales que agrupa muchas familias (Corticeaceae, Ganodermataceae, Hymenochaetaceae, Poliporaceae y otras) patógenas de plantas, las cuales ocasionan daños principalmente en tallos y raíces.

Algunos de estos hongos tienen la capacidad enzimática para degradar el duramen o la albura, y causan podredumbre blanca o parda de la madera según los componentes de la pared celular que degraden, o pueden causar formación de llagas por destrucción del tejido vascular. Algunos géneros de la Familia Hymenochaetaceae (Orden Aphyllophorales) tales como Phellinus spp. e Inonotus spp., atacan el duramen y la albura de tallos y raíces, pero también pueden vivir como saprófitos y degradar otros componentes de la madera (Gilbertson y Ryvarden 1986, Larsen y Cobb-Pouille 1990).

Phylloporia chrysa, es un hongo de la Familia Hymenochaetaceae (Orden Aphyllophorales) que ha sido comunicado como parásito de angiospermas y causante de podredumbre blanca en arbustos caducifolios (Gilbertson y Ryvarden 1987). Posee una distribución muy amplia en las zonas tropicales y subtropicales de América (desde la Península de Florida, México, Cuba, Jamaica, América Central, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Paraguay y Brasil) y Asia (Indochina, Indonesia, Filipinas, Singapur y Nueva Guinea) (Ryvarden y Johansen 1980, Gilbertson y Ryvarden 1987) (Fig.1). En Costa Rica se ha recolectado en Bagaces y en la Reserva Biológica de Carara, sobre árboles de Erythrochiton gymnanthus (Rutaceae), y en Monteverde sobre un hospedero desconocido (Carranza-Morse 1992).

Phylloporia chrysa presenta un basidiocarpo anual, pileado y sésil, solitario o a veces imbricado, semicircular, de 1.0-5.0 x 2.0-7.0 x 0.15 cm. La superficie del pileo es





Fig. 1. Distribución de *Phylloporia chrysita* en América y Asia tropical (Gilbertson y Ryvarden 1987).

pardo-amarillenta a pardo-rojiza, con una cubierta gruesa de consistencia aterciopelada esponjosa de 10 mm de espesor la cual puede desaparecer cuando adulto; una línea delgada negra separa el píleo del contexto. La superficie de los poros presenta un color amarillento a pardo oscuro, con un margen delgado esteril de color pardo. Presenta poros pequeños casi invisibles, de 6-8 por mm, con tubos de 1-4 mm de longitud, el contexto es de 1-2 mm de espesor, denso y se diferencia porque es más pardo que la parte tomentosa, de la cual se separa por una capa oscura que aparece como una línea en cortes longitudinales. Setas ausentes; basidios con cuatro esterigmas, de 7-10 x 3-4  $\mu\text{m}$ ; basidiósporas subglobosas, pardo amarillentas de 2.5-3.5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Gilbertson y Ryvarden 1987) (Fig. 2).

El sistema de hifas monomíticas consta de hifas generativas, de septos simples, de color amarillento a pardo rojizo, en la parte tomentosa con una textura poco compacta, de 4-8  $\mu\text{m}$  de ancho, con paredes de 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  de grosor, hifas del subhimenio de color hialino a amarillo-claro con ramificaciones gruesas de 3-5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Gilbertson y Ryvarden 1987)(Fig. 3).

Erythrochiton gymnanthus es una planta de la familia Rutaceae; se distribuye en tierras calientes del Pacífico, desde el sur de México hasta Panamá. Es un árbol pequeño, de aproximadamente 4 m de altura, ramas corpulentas, glabras, con lenticelas elípticas; hojas opuestas, y agrupadas en el ápice de las ramas, unifoliadas, lámina elíptica obovada de

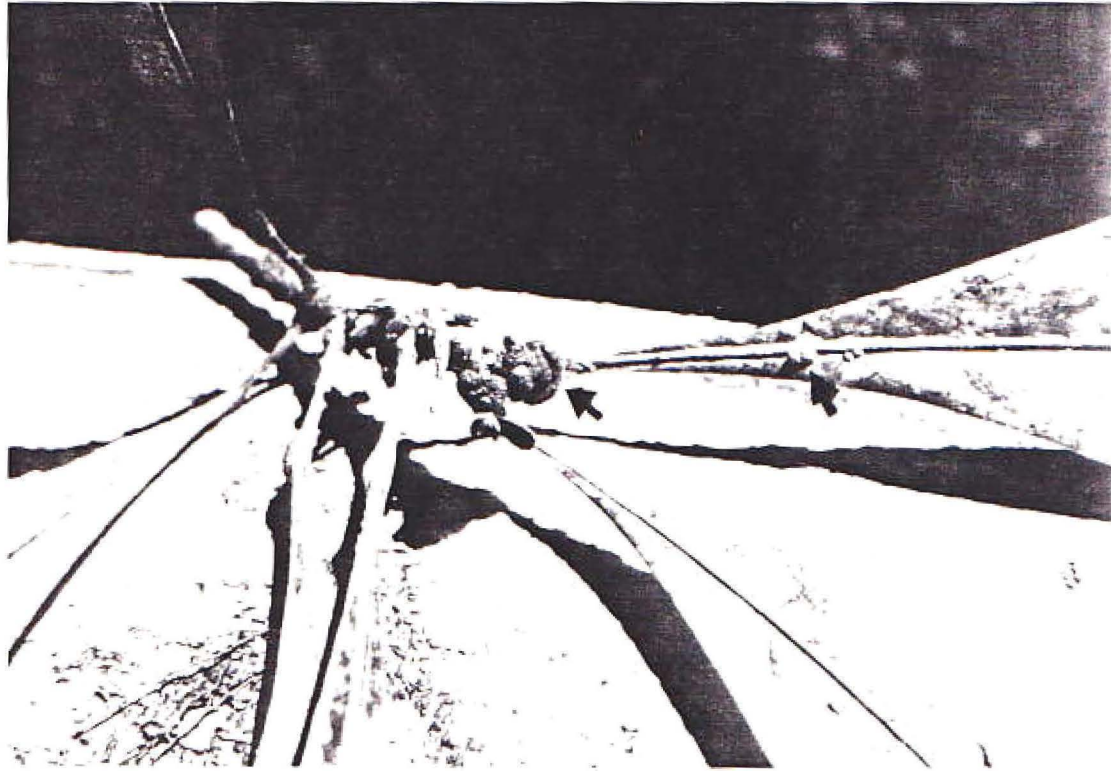


Fig. 2. Cuerpo fructífero de *Phylloporia chrysite*  
sobre tallo y peciolo de *E. gymnanthus*.

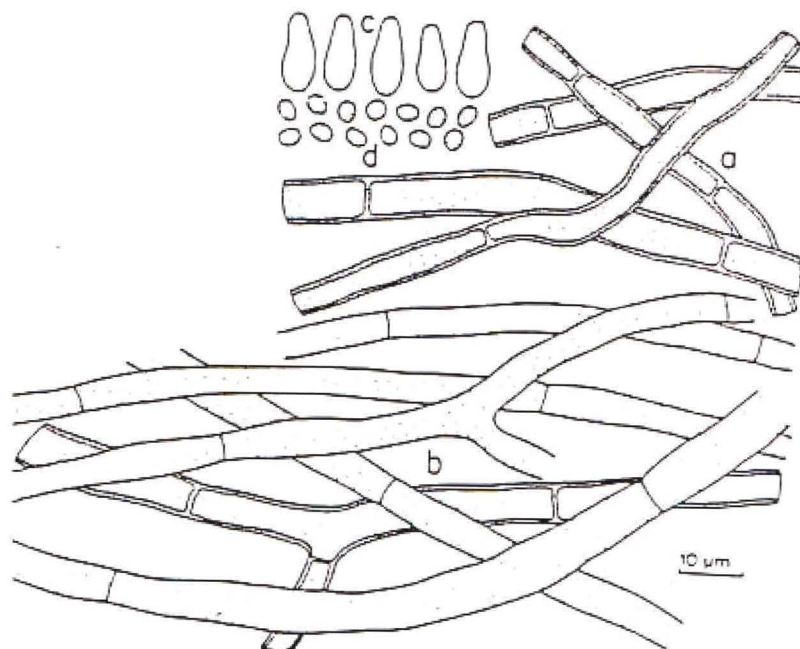


Fig. 3. *Phylloporia chrysaia*. a) hifas del contexto inferior, b) hifas del contexto superior, c) basidio y d) basidiósporas (Tomado de Gilbertson y Ryvarden 1987).

17.5 a 30 cm de largo y 6.3 a 14 cm de ancho, con puntos glandulares en ambas superficies, glabras; inflorescencia terminal con dos a cuatro ramas pequeñas cimosas, pedúnculo erecto de 8-12 cm de largo, glabro; flores de color blanco crema, cáliz de cinco sépalos libres de 1.0 - 1.6 cm de largo; corola con cinco pétalos (de 1.0 - 1.2 cm de largo) oblongo ovados ; el fruto es una cápsula de cinco carpelos. Forma parte de la vegetación del sotobosque (Standley 1937, Porter y Elias 1979) (Fig. 4).

En Costa Rica E. gymnanthus es común en sotobosque de los bosques de galería de Puntarenas, donde se distribuye ampliamente; en la Reserva Biológica Carara es una población típica que se distribuye densamente en las orillas de los senderos (Herbario Nacional de Costa Rica).

Se conoce poco sobre los efectos reguladores de los hongos en poblaciones de plantas del bosque tropical, por lo que un estudio de este aspecto podría ayudar a esclarecer la dinámica de estas poblaciones vegetales en el bosque natural.

El hongo Phylloporia chrysita ha sido observado en plantas de E. gymnanthus, en diferentes estadios de desarrollo (desde plántula hasta árbol adulto), pero se desconocen los efectos que puede ocasionar a la planta.

Este trabajo se llevó a cabo para:

1. Determinar el efecto de P. chrysita sobre el crecimiento de plántulas de E. gymnanthus en el bosque.

2. Determinar el modo de penetración y distribución del hongo en los tejidos de la planta.



Fig. 4. Planta de Erythrochiton gymnanthus en el sitio de estudio. Carara.

3. Describir las características morfológicas microscópicas del hongo en medio de cultivo.

4. Determinar la temperatura de crecimiento óptima del hongo en medio de cultivo.

## MATERIAL Y METODOS

### I- Descripción del área de estudio

Esta investigación se realizó en la Reserva Biológica Carara, ubicada al Oeste del Valle Central de Costa Rica, entre los cantones de Turrubares (Distrito San Juan de Mata, Provincia de San José) y Garabito (Distrito de Jacó, Provincia de Puntarenas). Esta reserva de 4 700 ha, se localiza entre las coordenadas 9° 41'20" - 9° 50'40" N y 84° 31'30" - 84° 37'00" W (Boza 1989) (Fig. 5).

La humedad relativa promedio anual es de 75%, con una máxima en el mes de setiembre de 90% y una mínima en febrero de 65%. La temperatura promedio anual es de 27.5 °C, con una máxima de 32.5 °C y una mínima de 22.5 °C. El brillo solar promedio anual es de 7 hr diarias; la precipitación en el mes más seco (febrero) es de 10 mm, y en el más lluvioso (setiembre) llega hasta los 300 mm (Zárate y Ramírez 1983, Protti *et al.* 1983).

La Reserva Biológica Carara, corresponde a una zona de transición entre la región seca del Pacífico Norte y la más húmeda del Pacífico Sur de Costa Rica (Boza 1989). Gómez (1987) la considera un bosque tropical lluvioso semicaducifolio de bajura, que limita al norte con el bosque caducifolio de bajura y al sur con el tropical lluvioso sempervirente de bajura. Por su parte, Holdridge (1971) y Tossi (1969) lo clasifican como un bosque húmedo tropical que



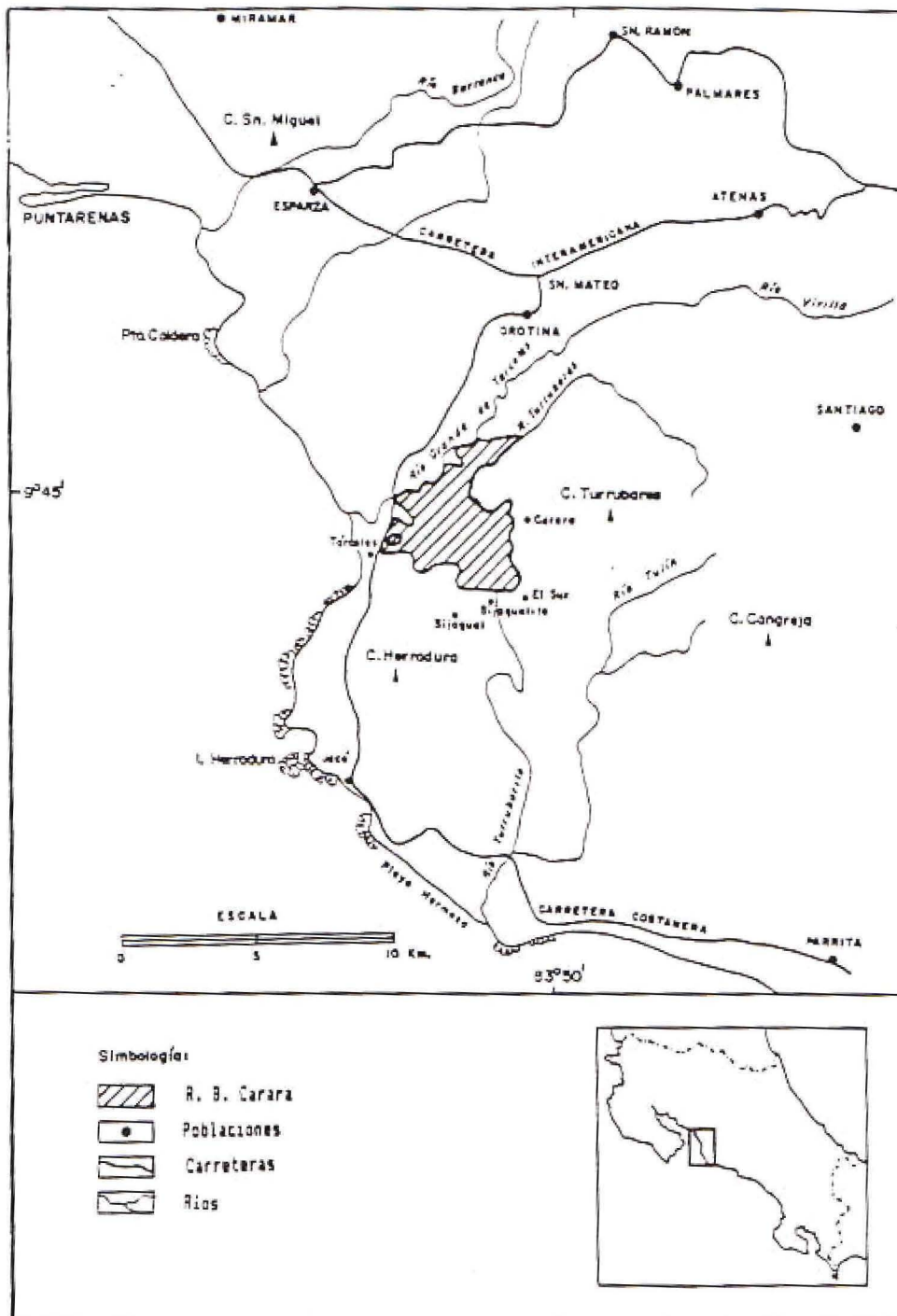


Fig. 5. Localización de la Reserva Biológica Carara. Costa Rica, 1993.

limita al norte con el bosque seco tropical y al sur con el muy húmedo tropical.

Debido a que en la Reserva Biológica Carara no existe ninguna Estación Meteorológica, los datos climatológicos (temperatura, humedad relativa y precipitación) se tomaron de la estación más cercana correspondiente a Lagunillas, Orotina, la cual registraba datos hasta junio de 1993 (Información proporcionada por el Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica).

## II- Selección de la parcela y observación de las plantas

Se recorrió la Reserva Biológica Carara, para delimitar un área donde se encontraran plantas de *E. gymnanthus* de diferentes tamaños, sanas e infectadas. Como resultado, se ubicó una parcela en el sendero Las Aráceas (Fig. 6), donde se marcaron 40 plantas de *E. gymnanthus* de diferentes tamaños, 20 de estas estaban sanas (ausencia de basidiocarpos), y 20 infectadas con *P. chrysita*. La altura de las plantas sanas osciló entre 37.0 y 169.0 cm y las infectadas entre 34.0 y 164.0 cm. En las plantas seleccionadas se midieron las siguientes variables: altura desde el suelo hasta el ápice de la rama principal, presencia o ausencia de basidiocarpos, número y posición de estos,

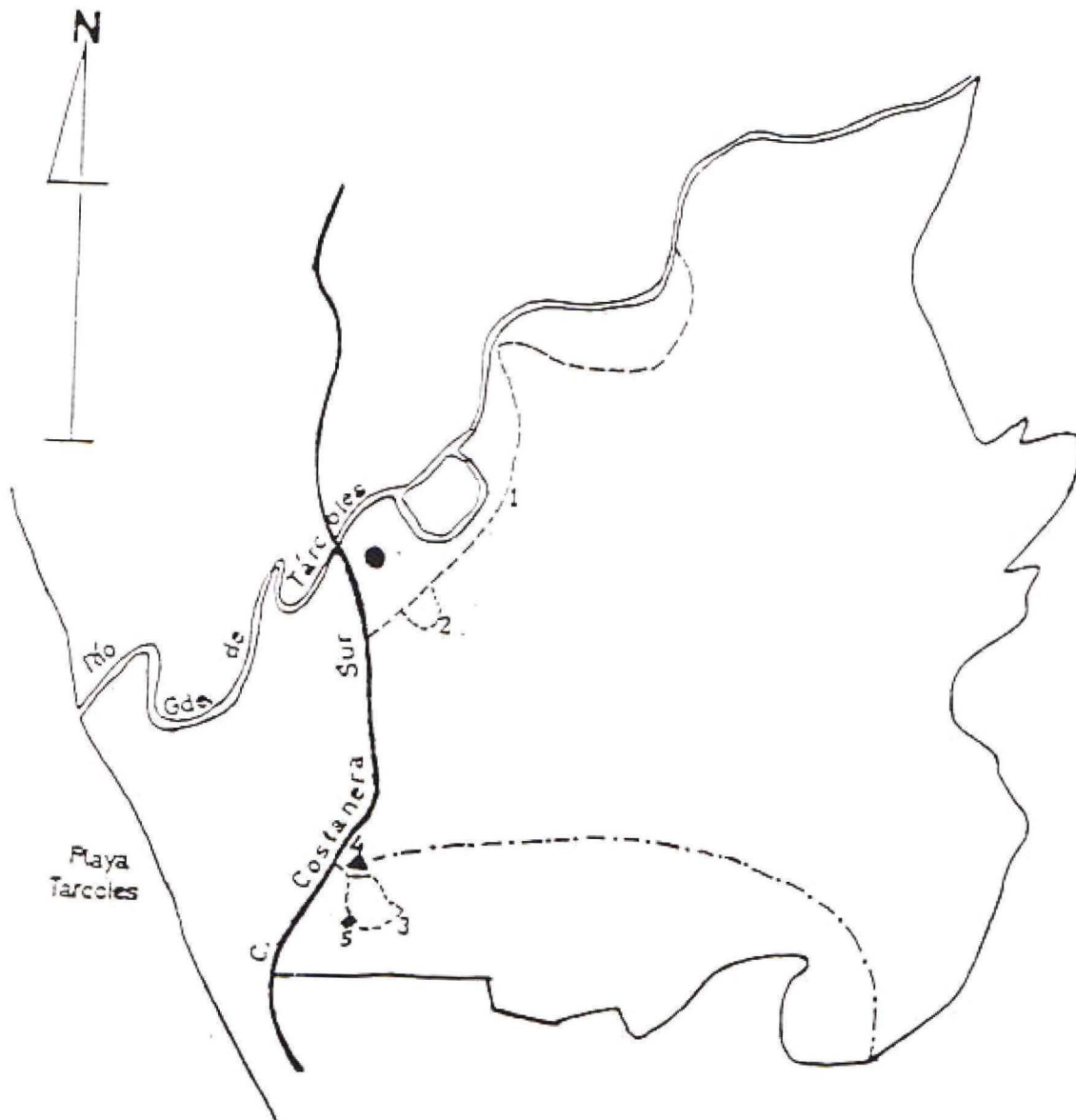


Fig. 6. Ubicación del sitio de muestreo en la Reserva Biológica Carara.

- |                         |                        |
|-------------------------|------------------------|
| 1- Sendero Meándrico    | 3- Sendero Las Araceas |
| 2- Sendero Los Higueros | 4- Administración      |
|                         | 5- Sitio de estudio    |

estadio de desarrollo de los cuerpos fructíferos (presencia o ausencia de tejido himenial), y apariencia general de la planta. Estas mediciones se llevaron a cabo mensualmente desde enero de 1992 hasta julio de 1993, para determinar el efecto de la infección fúngica en el crecimiento de la planta. Además, se midió la temperatura del lugar, con un termómetro a una altura de 30 cm desde el suelo. Esta temperatura se comparó con la correspondiente al mismo día, en la estación metereológica de Lagunillas, Orotina.

A diez de las plantas sanas, se les removi6 al azar cinco hojas y cinco ramas a diferentes alturas del tallo, para determinar si las heridas causadas por abscisión podrían servir de vías de entrada para el hongo.

### III- Recolección y tratamiento de las muestras

Para determinar el modo de penetración y distribución de las hifas en los tejidos de la planta, se recolectaron seis muestras de tallo y seis de peciolo infectado, las cuales fueron llevadas a los Laboratorios de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, para ser procesadas y observadas posteriormente al microscopio de luz y electrónico de barrido (MEB).

Se hicieron cortes transversales de tallo y peciolo de 50 mm de grosor, en forma manual con una navaja y luego se

fijaron en solución de Formalina-Acetato-Alcohol (F.A.A.) al 5% durante 15 días a temperatura ambiente. Transcurrido el período de fijación se separaron unas muestras para analizarlas al microscopio de luz y otras al electrónico de barrido.

Para la observación al microscopio de luz se siguió el siguiente procedimiento de preparación de muestras: deshidratación de los tejidos en un gradiente de agua destilada-alcohol butílico terciario V:V 50, 70, 80, 90, 95, 100, 100%, durante 2, 24, 2, 1, 1, 2, 4 hr, respectivamente. Posteriormente se infiltraron en parafina y se vaciaron en cajas de Petri; cuando las muestras se endurecieron se procedió a hacer cortes transversales de 10  $\mu\text{m}$  de grosor con micrótopo y estos se tiñeron con Safranina-"Fast Green" para la observación de los tejidos vegetales e hifas (Biological Stain Commission 1973).

Las muestras analizadas al microscopio electrónico de barrido, se procesaron de la siguiente manera: transcurrido el período de fijación, se lavaron con 2.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.2 durante 10 min. Este proceso se repitió cuatro veces. Posteriormente se volvieron a fijar en una solución al 2% de tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) preparado en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.2 (2.0 ml), y se mantuvieron en esta solución durante 1 hr a temperatura ambiente. Se lavaron con amortiguador de fosfatos durante 10 min, por tres veces, seguido por el proceso de deshidratación, con un gradiente de etanol (30, 50, 70, 80,

90, 95, 100, 100%), durante 1 hr en cada uno de los alcoholes.

Las muestras fueron transferidas a un secador a punto crítico HCP-2 (Hitachi-Ltd); luego se lavaron con CO<sub>2</sub> a 15 °C, cada 10 minutos, durante una hora. Concluido el lavado, se secaron a una presión de 90-100 kg F/cm<sup>2</sup> y se montaron con cinta adhesiva de doble cara sobre una base de aluminio especial para el MEB, y se hicieron puntos de conducción de pintura de plata. Se cubrieron con platino al vacío (0.10-0.05 Torr) y corriente de 5.0-6.0 mA, durante 5 min, en un cobertor iónico IB-5 (Giko. Ltd). Finalizado el período de cobertura metálica, se observaron al microscopio electrónico de barrido Hitachi S-570, con un voltaje de aceleración de 15 kv y una distancia de trabajo de 15 mm. Se empleó película Kodak VP-120 para el registro de la misma.

#### IV- Aislamiento y cultivo del hongo

El aislamiento del hongo se llevó a cabo de la siguiente manera: a) 15 fragmentos pequeños de basidiocarpos y 15 de tallos infectados de aproximadamente 20 mm de grosor, se lavaron con agua destilada, para eliminar residuos de tierra o restos vegetales adheridos, b) se esterilizaron superficialmente con solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 2 min y c) se colocaron en cajas de Petri con medio

de cultivo agar-extracto de malta al 2 % (con benomil y cloranfenicol) .

Los cultivos se observaron diariamente y se transfirió el hongo varias veces a una nueva caja de Petri con medio de cultivo, hasta obtenerlo en forma pura. Estos cultivos se mantuvieron en una incubadora a 27 °C para su posterior utilización.

El micelio puro se "sembró" en tres medios diferentes para determinar el más favorable para su crecimiento: a) agar-extracto de malta al 2%, b) agar-extracto de hojas de *E. gymnanthus*, y c) agar-extracto de tallo de *E. gymnanthus*.

La preparación de los medios de cultivo con extractos de tallo y hojas, se hizo de la siguiente manera: se licuaron 100 g de tallos o de hojas en 1000 ml de agua destilada, se filtró la solución y se midieron 1000 ml de cada extracto por separado. Luego se le agregó a cada uno 15 g de agar y se procedió a su esterilización.

Para el medio agar-extracto de malta, se utilizó 20 g de extracto de malta y 15 g de agar disueltos en 1000 ml de agua destilada.

Los medios se esterilizaron en una autoclave a 15 lb de presión durante 20 min. Una vez esterilizados, se les agregó 60 mg de benomil para inhibir el crecimiento de hongos imperfectos y 250 mg del antibiótico cloranfenicol para reducir el crecimiento de bacterias (Hunt y Cobb 1971, Maloy 1974, Worrall 1991). A todos los medios de cultivo se les midió el pH.

El hongo se "sembró" en cajas de Petri con los diferentes medios de cultivo. De cada medio se hicieron 30 cajas. Las cajas inoculadas se incubaron a tres temperaturas diferentes: 26, 31 y 35 °C; por cada temperatura se utilizaron 10 cajas de cada medio, para determinar la mejor temperatura de crecimiento. Se midió diariamente el diámetro del crecimiento vegetativo en las cajas de Petri con una regla milimétrica, durante 10 días y se anotaron las características del micelio (color y forma).

#### V- Análisis estadísticos

Se analizaron los datos de crecimiento en altura mensual de las plantas sanas y las infectadas, y se les aplicó la prueba U de Mann-Whitney para determinar si existían diferencias significativas entre el crecimiento de las plantas infectadas y sanas.

Se utilizó el método de regresión múltiple para analizar la relación existente entre el número de basidiocarpos, el crecimiento en altura de las plantas y los parámetros ambientales (temperatura, humedad relativa y precipitación).

Para determinar la relación entre el número de basidiocarpos y el crecimiento en altura de las plantas infectadas se aplicó el método de correlación lineal de Pearson, y la prueba de Kruskal-Wallis se usó para detectar diferencias significativas en el crecimiento vegetativo de P. chrysite en los diferentes medios de cultivo, a las temperaturas seleccionadas.



## RESULTADOS

### I- Crecimiento en altura de plantas sanas e infectadas.

Las observaciones de campo realizadas durante enero de 1992 a julio de 1993, demostraron que todas las plantas de *E. gymnanthus* con alturas mayores de 1.5 m, estaban infectadas con *P. chrysa*, ya que presentaban basidiocarpos tanto en tallos como pecíolos y nervaduras de las hojas. Se observaron diferencias en la madurez de los basidiocarpos y en la distribución de éstos a través de la planta.

No se observó formación de cuerpos fructíferos en ninguna de las plantas a las cuales se les removieron hojas o ramas, ni síntomas de marchitez o defoliación en las plantas infectadas.

El promedio del crecimiento en altura mensual acumulado de las 40 plantas estudiadas fue el siguiente: las 20 sanas presentaron un ámbito de 0.9 ( $\pm 0.3$ ) a 14.9 ( $\pm 5.7$ ) cm, con un coeficiente de variación (CV) de 22 a 38 % (Cuadro 1); las 20 infectadas presentaron un ámbito de 0.6 ( $\pm 0.5$ ) a 7.2 ( $\pm 2.2$ ) cm, con un coeficiente de variación de 22 a 93 % (Cuadro 2).

El valor promedio del crecimiento en altura final de las plantas sanas fue de 14.9 cm, mientras que el de las infectadas fue 7.2 cm. Existe una reducción de un 52 % en el crecimiento en altura de las plantas infectadas respecto a las sanas, durante el período de estudio.

Al aplicar la prueba U de Mann-Whitney, se encontraron diferencias significativas (  $U = 45$ ,  $P < 0.05$  ) entre el

Cuadro 1. Incremento acumulativo promedio en altura (cm) de las plantas sanas.  
Carara, enero 1992 - julio 1993.

ANO :	1 9 9 2								1 9 9 3						
MES :	ene	mar	may	jul	ago	set	nov	dic	feb	mar	abr	may	jun	jul	
PROM. :	0.9	2.0	3.1	4.4	5.3	6.2	7.0	7.7	8.4	9.1	11.0	12.7	14.0	14.9	
S.D. :	0.3	0.6	0.7	1.0	1.4	1.7	2.1	2.4	2.7	3.3	4.1	5.0	5.1	5.7	
C.V. :	30	29	22	23	26	27	29	31	31	35	37	38	35	38	
MAX. :	1	3	4	6	8	10	12	13	14	16	19	20	22	26	
MIN. :	0	1	2	3	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	

PROM. : promedio  
S.D. : desviación estándar  
C.V. : coeficiente de variación  
MAX. : máximo  
MIN. : mínimo

Cuadro 2. Incremento acumulativo promedio en altura (cm) de las plantas infectadas.  
Carara, enero 1992 - julio 1993.

ANO :	1 9 9 2								1 9 9 3						
MES :	ene	mar	may	jul	ago	set	nov	dic	feb	mar	abr	may	jun	jul	
PROM. :	0.6	1.3	2.1	2.3	2.5	3.0	3.3	3.5	3.7	3.9	4.6	5.5	6.5	7.2	
S.D. :	0.5	1.0	0.8	0.8	1.1	1.2	1.0	0.9	1.1	1.2	1.3	1.2	2.1	2.2	
C.V. :	93	68	33	32	41	38	27	26	28	29	28	22	29	29	
MAX. :	1	3	3	3	4	5	5	5	5	5	6	8	10	11	
MIN. :	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	4	4	5	

PROM. : promedio  
S.D. : desviación estándar  
C.V. : coeficiente de variación  
MAX. : máximo  
MIN. : mínimo

crecimiento en altura mensual de plantas sanas e infectadas (Fig.7).

Entre los meses de enero a mayo de 1992, se presentaron los mayores valores promedio de la tasa de crecimiento en altura de las plantas infectadas (de 0.6 a 0.8 cm), mientras que en las sanas se presentó cierta uniformidad en el crecimiento durante el período de estudio; sin embargo, la mayor tasa de crecimiento fue de 1.3 cm en el mes de julio de 1992.

Entre febrero y junio de 1993, las mayores tasas de crecimiento en altura de las plantas infectadas oscilaron entre 0.7 y 1.0 cm (abril a junio), en las plantas sanas la mayor tasa de crecimiento fue de 1.9 cm (abril); sin embargo, en mayo y junio el incremento tendió a disminuir (Cuadro 3).

Respecto a los cuerpos fructíferos, se obtuvo un valor promedio máximo de 2.4 y un mínimo de 1.7, durante el tiempo de estudio. En el año de 1992, el mayor número se presentó en marzo y el menor en julio (Cuadro 3); mientras que, en 1993 el máximo se observó en abril y el mínimo en febrero (Cuadro 3).

De acuerdo con la información suministrada por el Instituto Meteorológico Nacional, las temperaturas promedios en la zona de Lagunillas, Orotina, oscilaron de 23.9 °C a 29.3 °C durante los meses de enero a diciembre de 1992 (Fig. 8) (Apéndice No. 1), la humedad relativa promedio varió entre 51 % (marzo-92) y 89 % (setiembre y octubre-92) (Fig. 9) y se presentó una precipitación total por mes desde 0.0 mm (enero-

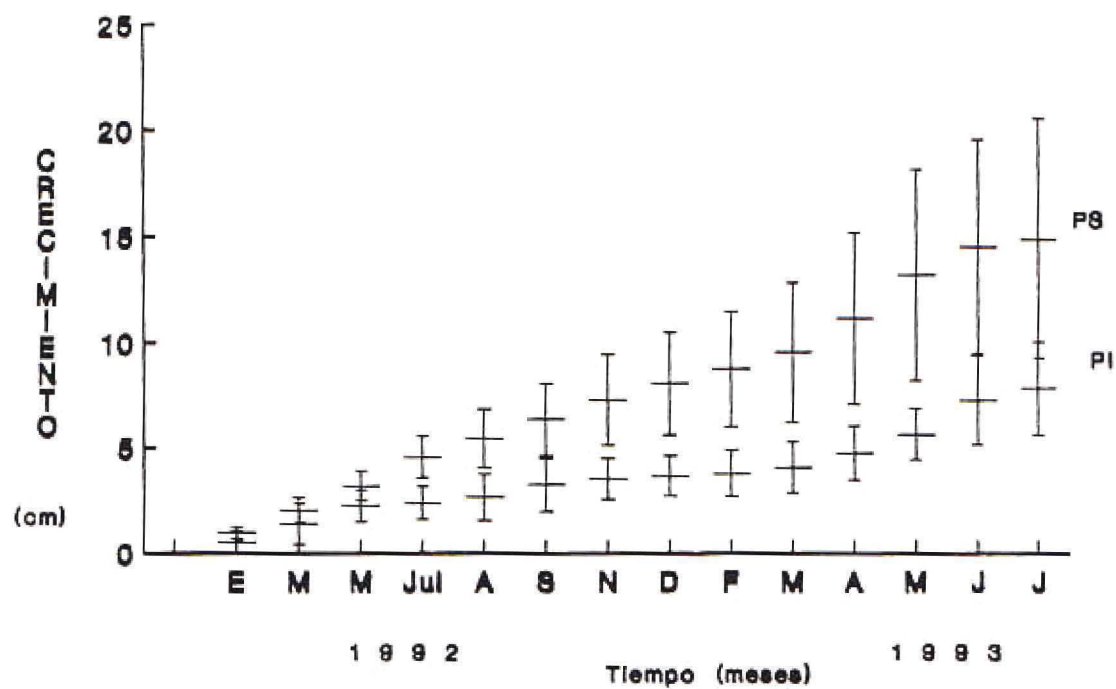


Fig. 7. Incremento acumulativo Promedio en altura y sus desviaciones estándar de plantas sanas (PS) e infectadas (PI). Carara, enero 1992-julio 1993.

Cuadro 3. Comparación de promedios de las variables medidas: tasa de crecimiento en altura (cm/mes) de plantas sanas e infectadas, cuerpos fructíferos, humedad relativa (%), temperatura (°C) y precipitación (mm), Carara, enero 1992 - julio 1993.

1 9 9 2						
MESES	TCSAN	TCINF	# CF	% H	% T	% P
Ene	0.9	0.6	1.9	59	25.9	0.0
Mar	1.1	0.7	2.4	51	29.3	0.0
May	1.1	0.8	1.8	72	27.7	127.6
Jul	1.3	0.2	1.7	86	24.1	236.5
Ago	0.9	0.2	1.8	87	24.7	220.8
Set	0.9	0.5	1.8	89	24.0	317.3
Nov	0.8	0.3	1.8	86	23.9	240.2
Dic	0.7	0.2	2.0	80	24.9	8.8

1 9 9 3						
MESES	TCSAN	TCINF	# CF	% H	% T	% P
Feb	0.7	0.2	1.7	61	27.4	0.0
Mar	0.7	0.2	2.0	64	27.7	15.2
Abr	1.9	0.7	2.4	70	28.4	28.2
May	1.7	0.9	2.0	84	25.9	282.1
Jun	1.3	1.0	2.0	88	25.8	232.3

TCSAN : tasa de crecimiento en altura de plantas sanas  
 TCINF : tasa de crecimiento en altura de plantas infectadas  
 # CF : número de cuerpos fructíferos  
 H : humedad relativa  
 T : temperatura  
 P : precipitación total

† Fuente de H, T, P: Instituto Meteorológico Nacional  
 (Estación Lagunillas, Orotina).

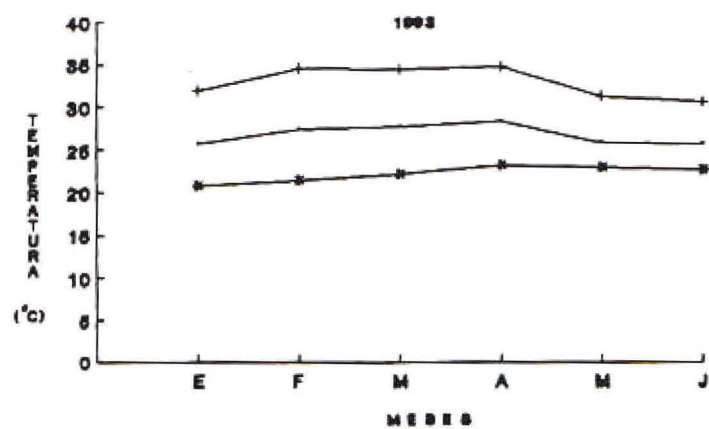
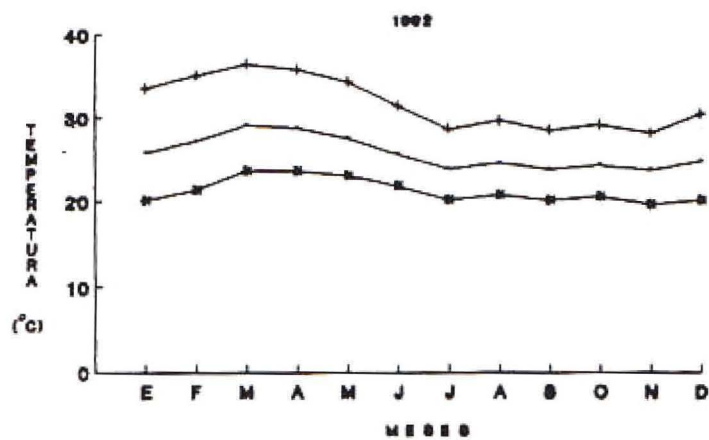


Fig. 8. Temperaturas mensuales promedio, mínima y máxima en Lagunillas, Orotina (1992-1993). Fuente: Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica.

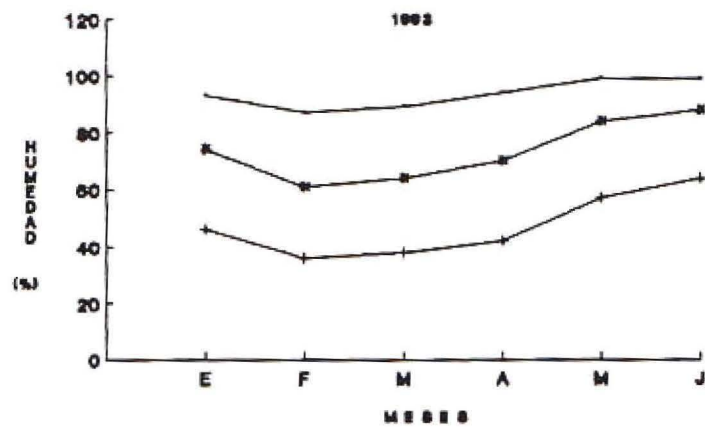
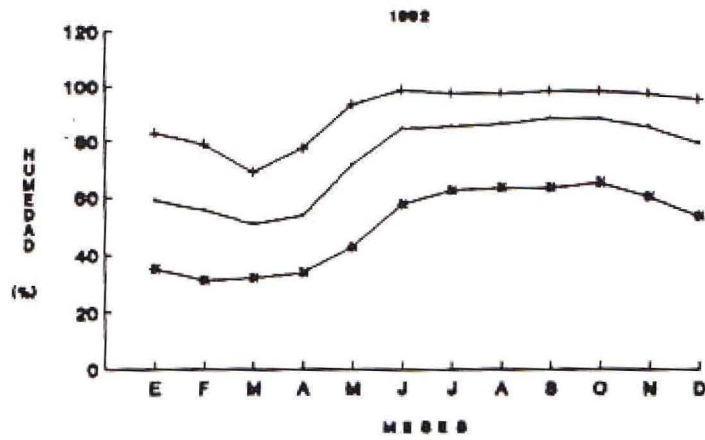


Fig. 9. Humedad relativa mensual promedio, mínima y máxima en Lagunillas, Orotina (1992-1993). Fuente: Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica.

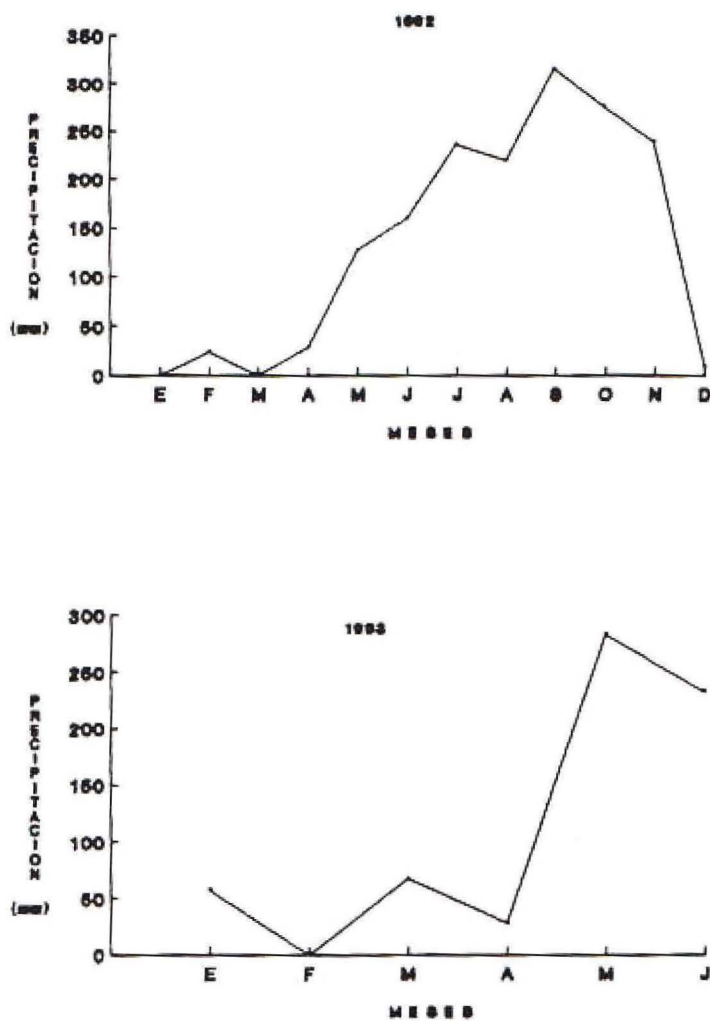


Fig. 10. Precipitación total mensual (mm) en Lagunillas, Orotina (1992 - 1993). Fuente: Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica.



marzo-92) hasta 317.3 mm (setiembre-92) (Fig.10) (Apéndice No. 1). Las temperaturas tomadas el día del muestreo en la Reserva Biológica Carara, fueron similares a las que se presentaron en la Estación Meteorológica Lagunillas en Orotina.

Durante los meses de enero a junio de 1993, la temperatura promedio osciló entre 25.8 °C (enero-93) a 28.4 °C (abril-93) (Fig.8); la humedad relativa promedio varió de 61 % (febrero-93) a 88 % (junio-93) (Fig.9) y se presentó una precipitación total por mes de 0.0 mm (febrero-93) a 282.1 mm (mayo-93) (Fig.10) (Apéndice No 2 ).

Al aplicar el análisis de regresión múltiple, se encontró una relación positiva ( $r= 0.82$ ,  $P< 0.05$ ), entre el crecimiento mensual de plantas infectadas con el número de cuerpos fructíferos, la humedad, la temperatura y la precipitación. De todas las variables, la que ejerce un efecto significativo sobre el crecimiento de estas plantas es el número de basidiocarpos; mientras que al relacionar solo los factores ambientales con el crecimiento en altura de las plantas infectadas no se detectó relación significativa (Apéndice No. 3). Al relacionar el número de cuerpos fructíferos con los factores ambientales, tampoco se obtuvo relación significativa.

Según el método estadístico de Pearson, existe una asociación significativa ( $r=0.9$ ) entre el crecimiento en altura de las plantas infectadas y el número de basidiocarpos, durante el período de medición.

## II- Penetración, infección e invasión de los tejidos.

En las observaciones de campo no se pudo determinar si las heridas causadas por abscisión, podrían servir de vías de entrada al patógeno debido que no se observó la presencia de basidiocarpos en estas zonas, durante el período de estudio; sin embargo, es posible que la infección pueda iniciarse por penetración directa del hongo a través de la epidermis del tallo o a través de las lenticelas.

Si se compara la Fig. 11 que muestra un corte de tallo sano, con las Figs. 12, 13 y 14 de tallo infectado, se puede observar el proceso de infección e invasión de los diferentes tejidos con la subsecuente destrucción de algunos de éstos. El hongo invade epidermis, parénquima y tejidos vasculares, y luego forma el cuerpo fructífero, para completar las diferentes fases de su ciclo de vida.

Las Figuras 14 y 15 muestran varias hifas en las células del parénquima cortical de un corte transversal de tallo y peciolo infectado; se pueden observar las paredes celulares degradadas por la acción de enzimas.

## III- Crecimiento vegetativo de Phylloporia chrysita in vitro.

En los medios de agar-extracto de hojas y de tallo a un pH 5, no se observó crecimiento a ninguna de las tres

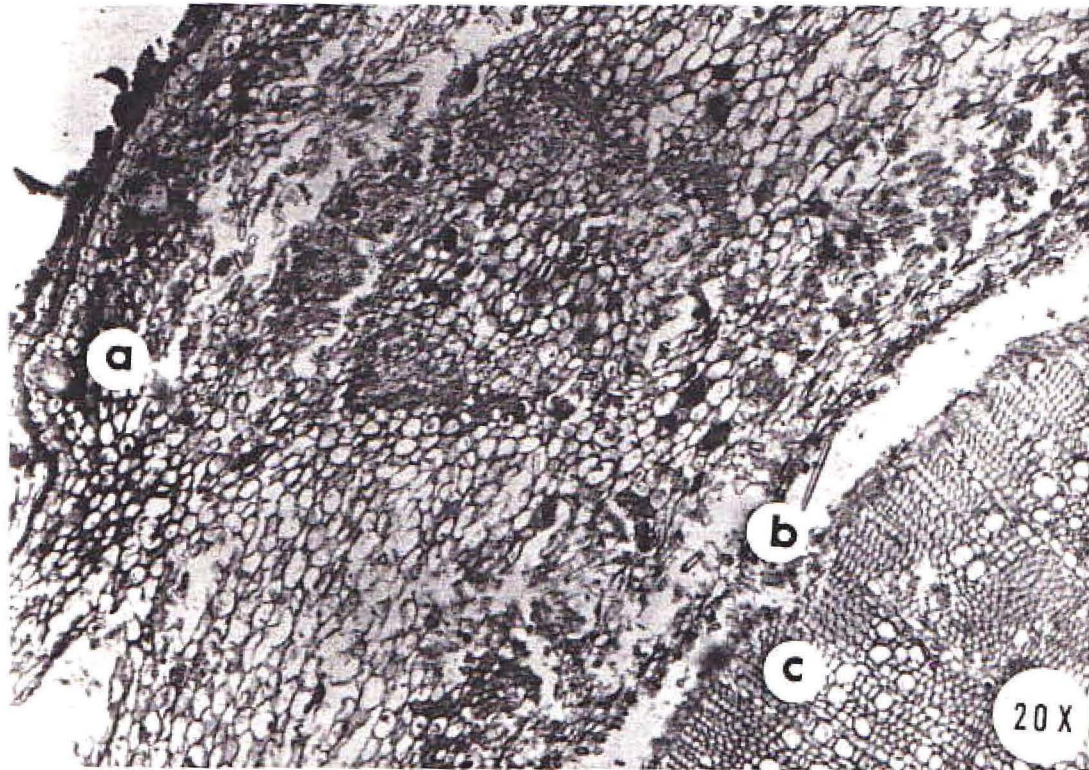


Fig. 11. Corte transversal de tallo no infectado. a) parénquima cortical, b) cambium vascular, c) tejidos vasculares. Vista al microscopio de luz (20 X).

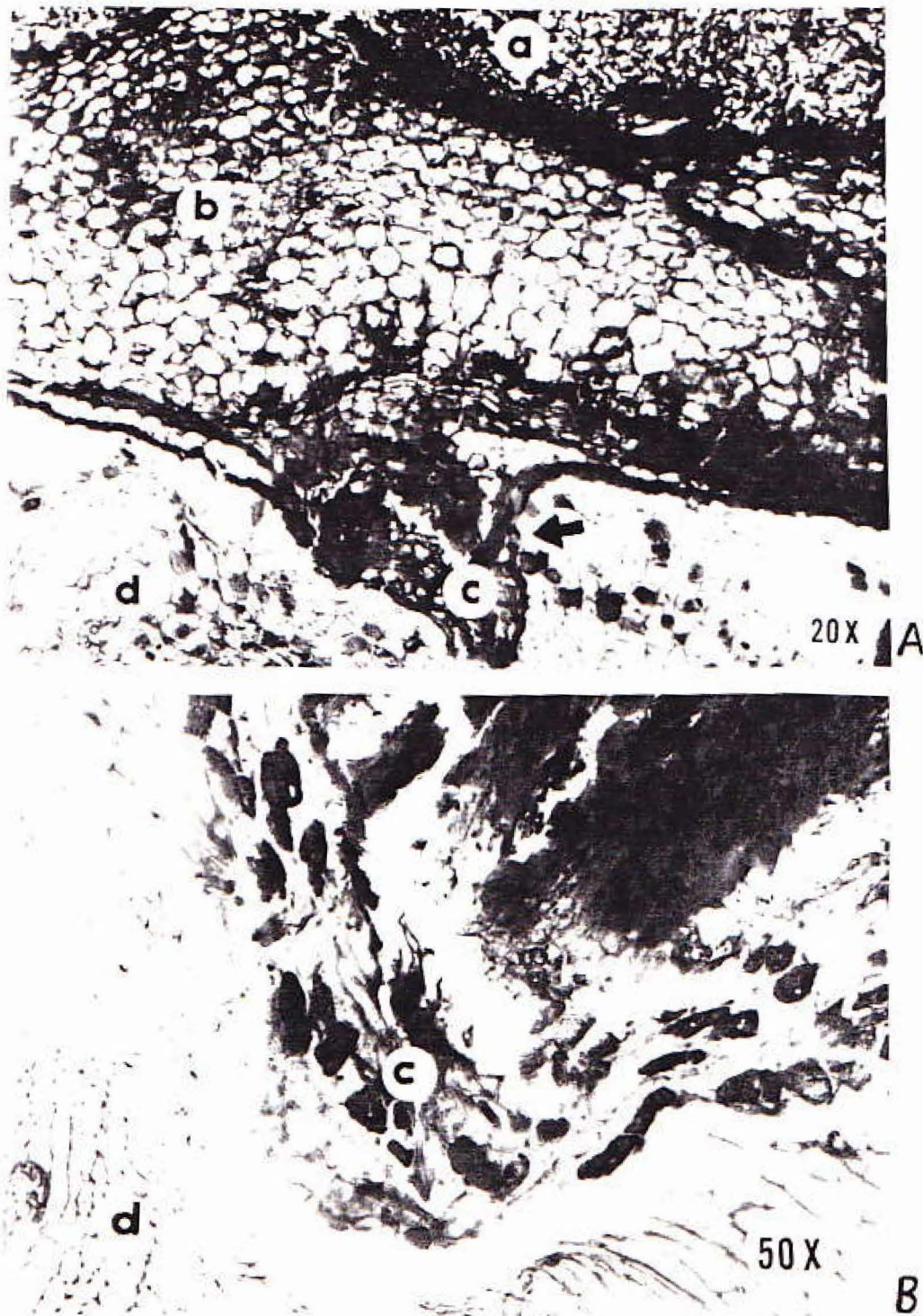


Fig. 12. Corte transversal de tallo infectado por *P. chrysita*. Vista al microscopio de luz  
 A: nótese la invasión fúngica (20 X).  
 B: invasión de las hifas en floema y xilema (50 X). a) basidiocarpo, b) parénquima cortical, c) floema y d) xilema.

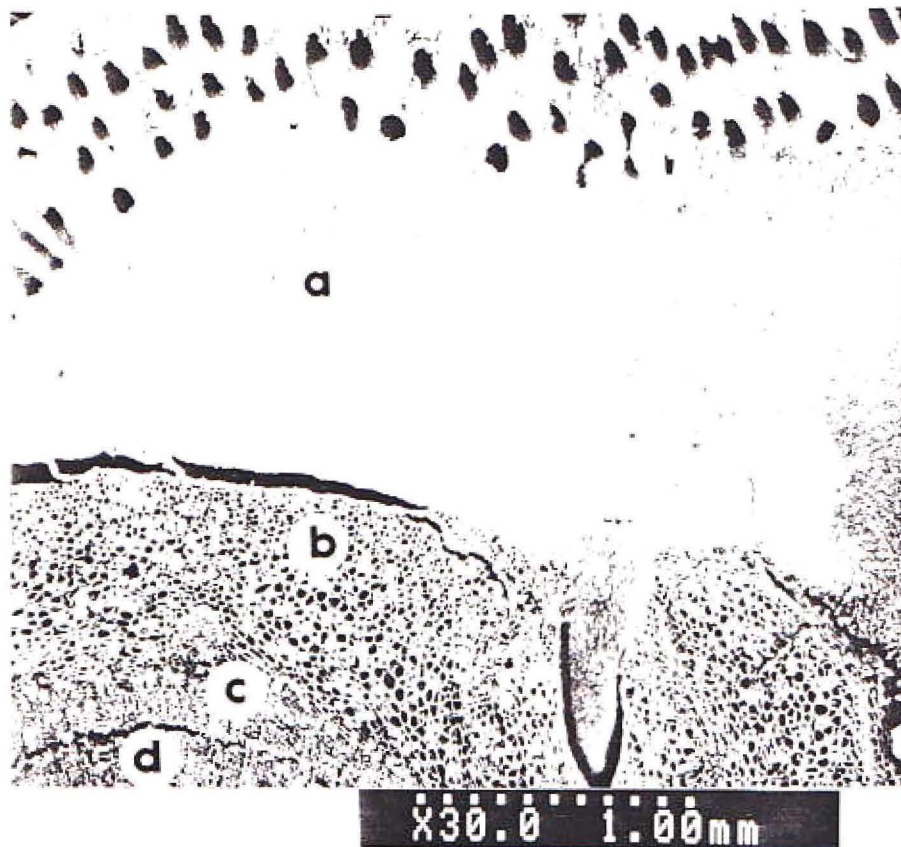


Fig. 13. Corte transversal de tallo infectado por *P. chrysita*. Vista al microscopio electrónico de barrido (30 X). Nótese la inserción del basidiocarpo en los tejidos del tallo. a) basidiocarpo, b) parénquima cortical, c) cambium vascular y d) tejidos vasculares.



Fig. 14. Corte transversal de tallo infectado por *P. chrysita*. Se observan hifas en células del tejido parénquima cortical. Vista al microscopio electrónico de barrido (1.31 X).

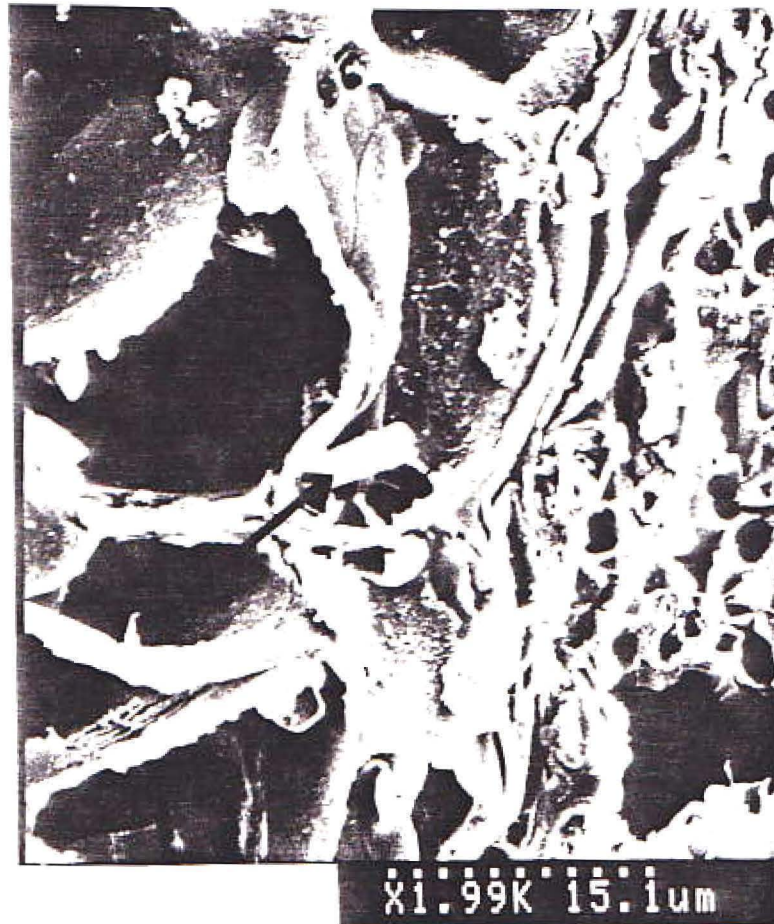


Fig. 15. Corte transversal de peciolo infectado por *P. chrysita*. Hifas en células del tejido parénquima cortical. Vista al microscopio electrónico de barrido (1.99 X).

temperaturas seleccionadas durante los 10 días de observación.

En el medio de cultivo con agar-extracto de malta a un pH 6, fue donde se observó crecimiento micelial del hongo. De las temperaturas escogidas, el mejor crecimiento vegetativo se dió a 26 °C, donde se obtuvo un valor promedio de 7.3 ( $\pm$  0.2) cm, el crecimiento promedio a 31 °C fue de 4.9 ( $\pm$  0.2) cm y a 35 °C; se dio el menor crecimiento promedio de 3.5 ( $\pm$  0.4) cm (Fig.16).

El crecimiento micelial diario osciló entre 0.7 a 0.8 cm a 26 °C; a 31 °C entre 0.4 a 0.5 cm, y a 35 °C entre 0.3 a 0.42 cm.

Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis se encontró diferencia significativa ( $F= 83$ ,  $P < 0.05$ ) en el crecimiento vegetativo de *P. chrysvita* en las diferentes temperaturas.

De acuerdo con Nobles (1948), la tasa de crecimiento vegetativo del hongo a 26 y 31 °C es considerada rápida, ya que las cajas de Petri se cubrieron en 10 o 14 días respectivamente, a partir de la inoculación; a 35 °C el crecimiento es considerado moderadamente rápido, a esta temperatura el hongo llenó la caja de Petri a las tres semanas aproximadamente.

El micelio de *P. chrysvita* presentó una coloración blanca y una textura algodonosa durante los tres primeros días de crecimiento a 26 y 31 °C. A partir del quinto o séptimo día, empezó a tornarse amarillento y luego se oscureció y formó parches pardo-rojizos en el medio. A 35 °C, se observó una coloración amarillenta en las hifas a los ocho días de



incubación.

Las hifas presentaron septos, y ramificaciones; su diámetro osciló entre 3 y 3.5  $\mu\text{m}$ .

No se observó formación de cuerpos fructíferos en las cajas de Petri durante el tiempo de estudio.

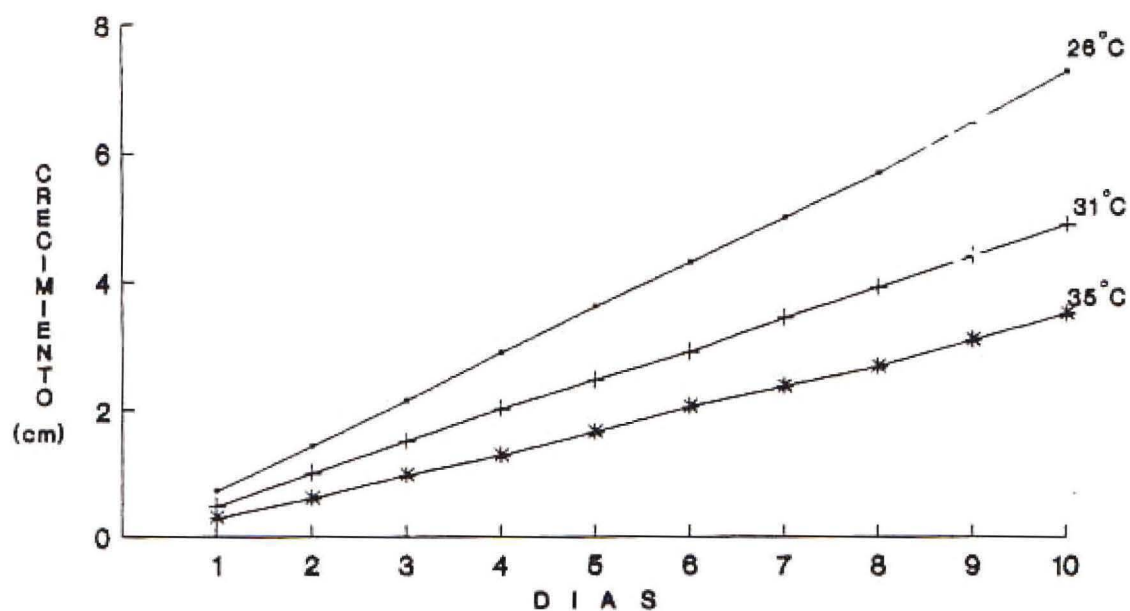


Fig. 16. Crecimiento vegetativo de *P. chrysita* en medio de cultivo agar-extracto de malta a tres diferentes temperaturas.

## DISCUSION

En el presente estudio se pudo comprobar que *P. chrysita* es un hongo patógeno de *E. gymnanthus*. Se observó una diferencia significativa entre el crecimiento de las plantas sanas y las infectadas (Fig. 7); el crecimiento de las plantas infectadas fue más lento que el de las sanas, lo que es de esperar debido a una posible reducción en la energía disponible para su desarrollo (Sarasola y Sarasola 1975, Burdon 1987).

La penetración del patógeno al hospedero involucra degradación enzimática de componentes estructurales del hospedero (Hancock y Huisman 1981), ésto se pudo observar en los cortes histológicos de tallo y peciolo infectados. Las hifas se distribuyeron en los tejidos del hospedero desde la epidermis hasta los tejidos vasculares, con la subsecuente disociación celular, necrotización y podredumbre. Los canales de conducción estaban invadidos por las hifas, lo que pudo causar una obstrucción al paso de sustancias.

Se obtuvo un coeficiente de variación muy alto (22 a 93 %) en el crecimiento de las plantas infectadas (Cuadro 2). Es posible que dichas variaciones se deban a la variabilidad en la susceptibilidad de las plantas a enfermedades o a condiciones ambientales desfavorables para el desarrollo.

En este estudio se observó que existen ciertas épocas del año de enero a mayo de 1992 y de abril a junio de 1993 (Cuadro 3) en donde las plantas infectadas presentaron un

mayor crecimiento a pesar de estar infectadas, es posible que en estas etapas la planta halla producido más fotosintatos que le permitieron desarrollar nuevos tejidos y que el hongo no estaba causando una reducción significativa de nutrientes. En esta época las condiciones ambientales pueden ser favorables para el crecimiento vegetativo de la planta.

*P. chrysita* se ha encontrado únicamente en *E. gymnanthus* en la Reserva Biológica Carara, lo que hace pensar que podría existir una subespecie diferente a la comunicada en Monteverde (Carranza-Morse 1992). Es posible que *E. gymnanthus* ha desarrollado cierta tolerancia hacia el patógeno y éste cierta resistencia a las sustancias producidas por la planta, ya que no se observó mortalidad en las plantas infectadas. Este tipo de equilibrio entre hongos patógenos y sus hospederos ha sido comunicado en otros grupos de hongos, por ejemplo en las royas (Agrios 1989).

La variación de las condiciones físicas por las que atraviesa una población de hospederos, es con frecuencia la responsable de los cambios en el desarrollo de la población del patógeno de año en año (Burdon 1992). El período en el cual las condiciones del medio son favorables para el crecimiento de la planta, puede serlo para el crecimiento vegetativo del hongo, al existir una mayor disponibilidad de nutrientes.

El clima es un indicador importante de los límites probables de propagación y de la capacidad destructora de un patógeno. Los cambios climáticos pueden afectar la gravedad

de una enfermedad o causar nuevos problemas (Sarasola y Sarasola 1975).

Entre los factores climáticos que afectan las enfermedades se encuentran la temperatura, la humedad, precipitación, movimiento del aire, evaporación, radiación y presión atmosférica; de éstos, la temperatura y la humedad son factores básicos que limitan el comportamiento de los patógenos (Garraway y Evans 1984).

El ambiente influye en el proceso de enfermedad tanto en la planta sana, si la predispone a ser atacada, como sobre la planta ya enferma, si la susceptibiliza en mayor o menor grado, así como sobre el patógeno, si lo hace más o menos agresivo.

Sin embargo, en este trabajo, no se encontró una relación entre los factores humedad, precipitación y temperatura, al relacionarlos con el crecimiento de las plantas infectadas. Debe considerarse que las condiciones microclimáticas que se presentan en el sotobosque no quedan bien definidas con las medidas comunes de las estaciones meteorológicas.

Las fases fenológicas de los árboles tropicales son consideradas como reacciones a la acción de temperatura, precipitación y contenidos de humedad en el suelo (Borchert 1980), estación del año, fototropismo, sombra y algunos reguladores del crecimiento vegetal (Araya 1983, Gómez 1984). E. gymnanthus atraviesa por varias etapas durante el año, las cuales pueden estar determinadas en parte por condiciones

climáticas. En los meses de abril, mayo, junio y julio de 1992 y 1993, se observó el mejor crecimiento tanto en las plantas sanas como en las infectadas. En la época seca (meses de diciembre-92 a marzo-93) (Cuadro 3), al existir bajas condiciones de humedad y altas temperaturas, el crecimiento es menor en ambas plantas, lo cual coincide con la época de floración en las plantas adultas, en la cual hay un mayor gasto de energía.

Los factores ambientales que promueven el crecimiento vegetativo en los hongos, inhiben la reproducción y viceversa; la inducción o inhibición de esporocarpos puede llevarse a cabo cuando los niveles de humedad son altos, o pueden producirse solo en sitios donde las condiciones de humedad son constantes. La temperatura es un factor muy importante en la producción de cuerpos fructíferos; generalmente, las temperaturas que inducen la formación de cuerpos fructíferos son más bajas que las que inducen crecimiento vegetativo (Rayner y Boddy 1988).

Además de la temperatura, la humedad y el pH, otro factor que afecta la fructificación de los hongos es la disponibilidad de nutrientes, en particular N, P, y K (Vogt et al. 1992).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la mayor cantidad de cuerpos fructíferos presentes en las plantas de *E. gymnanthus*, se pudieron observar en los meses de marzo-92 y abril-93 cuando la temperatura ambiental era alta y la humedad mayor de 50 %. El inicio de la formación de

estos cuerpos fructíferos puede darse en los meses secos de enero y febrero cuando las condiciones de temperatura y humedad no son favorables para el desarrollo de la planta y por consiguiente para el crecimiento vegetativo del hongo. Cuando se inician las primeras lluvias (mayo a junio), los basidiocarpos ya han alcanzado su madurez y producen esporas, las cuales pueden ser dispersadas y producir nuevas infecciones en plantas susceptibles.

Muchos factores influyen en la germinación de esporas, crecimiento vegetativo, fructificación, esporulación y penetración del hongo a las células del hospedero. Entre estos factores están la humedad, la temperatura, la luz y el pH (Dickinson y Lucas 1982, Smith y Berry 1974). Las etapas del ciclo biológico de un patógeno se dan dentro de un ámbito que por debajo o por encima de esos límites el patógeno se vuelve inactivo o muere. Cada una de esas etapas se desarrolla en ámbitos distintos.

El ámbito de temperatura apropiado para el desarrollo de los hongos oscila de 10 a 40 °C; sin embargo, algunos se desarrollan a 5 °C. En general, los organismos patogénicos están limitados a ámbitos más estrechos de temperatura (Sarasola y Sarasola 1975, Moore-Landecker 1990).

Los hongos fitopatógenos crecen óptimamente a temperatura ambiente, mientras que las temperaturas de 30 a 37 °C son inadecuadas para muchos de ellos (Deacon 1988).

En el caso de *P. chrysita* se encontró que de las temperaturas utilizadas en el laboratorio, la mejor para el

crecimiento vegetativo fue de 26 °C, mientras que a 31 y 35 °C el crecimiento fue lento. Al relacionar estas temperaturas, con lo observado en el campo, es posible especular que cuando la temperatura en el bosque se mantuvo cerca de los 26 °C, pudo haberse dado crecimiento vegetativo del hongo dentro del hospedero.

Se ha comunicado que la penetración del patógeno al hospedero puede ser activa a través de aperturas naturales o directa por medio de factores mecánicos y enzimáticos (Dimond 1975, Agrios 1989). *E. gymnanthus* presenta gran cantidad de lenticelas en el tallo, éstas son áreas restringidas de la peridermis donde el felógeno es más activo y origina una masa laxa de células, con muchos espacios intercelulares (Flores Vindas 1989).

Durante el período de estudio, no se observó formación de esporocarpos en las cicatrices o en las heridas provocadas al remover las ramas. Se puede especular que por la estructura de las lenticelas, estas podrían ser un punto de entrada de las esporas de *P. chrysita* o ser un punto de salida del micelio para formar los cuerpos fructíferos; aunque también el hongo podría entrar directamente a través de las paredes celulares de la epidermis del tallo.

El medio agar-extracto de malta utilizado en el laboratorio presentó un pH 6; los extractos de hojas y tallos pH 5. Parece ser que *P. chrysita* es sensible a pH más bajos de 6, ya que no se observó crecimiento en los extractos de hojas y tallos. Esto puede a su vez estar relacionado con



presencia de concentraciones altas de sustancias tóxicas en los extractos, ya que al licuar los tallos o las hojas, se concentran sustancias que pueden ser tóxicas para el hongo, como por ejemplo fenoles, taninos y otros (Agrios 1989).

Es posible que *E. gymnanthus* presente un pH favorable para el desarrollo del hongo, o que el hongo modifique el medio para poder crecer, como se ha observado en el caso de otros patógenos (Dickinson y Lucas 1982).

El pH es importante para el crecimiento de microorganismos. La mayoría de los hongos prefieren medios de cultivo ácidos. La adición de ácidos o álcalis en un medio de cultivo pueden inhibir o prevenir que estos organismos continúen con sus funciones normales. La respuesta de los hongos a las concentraciones de iones hidrógeno (pH), es afectada en gran parte por otros factores como los nutrientes del medio. Estudios realizados demuestran que muchos hongos crecen a intervalos de pH de 4.5 a 8.0, con un ámbito óptimo de 5.5 a 7.5 (Deacon 1988).

Se observó crecimiento micelial en el medio agar extracto de malta, pero no se obtuvo formación de cuerpos fructíferos. Podría ser que los requerimientos nutricionales y de temperatura para el crecimiento vegetativo y formación de estructuras reproductoras en este hongo sean muy específicos, como ha sido comunicado para otros hongos (Moore-Landecker 1990, Agrios 1989).

Se ha comunicado en muchos casos que es difícil obtener fructificación de parásitos obligados en medio de cultivo, ya

que para ellos es indispensable desarrollarse en su hospedero, como se ha comunicado para algunas especies de hongos fitopatógenos (Sarasola y Sarasola 1975).

Nobles (1948 y 1965) estudió el crecimiento vegetativo de varios hongos Aphyllophorales en medio de cultivo agar-extracto de malta, a temperatura ambiente, y los clasificó en hongos de crecimiento rápido (1-2 semanas), moderadamente rápido (3-4 semanas), lento (5-6 semanas) y muy lento (más de 6 semanas) de acuerdo a la velocidad en que llenan las cajas de Petri. Según esta clasificación *P. chrysita* es un hongo de crecimiento rápido cuando crece a una temperatura de 26 y 31 °C, y moderadamente rápido a una temperatura de 35 °C

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación se puede concluir lo siguiente:

1. Phylloporia chrysita es un patógeno de Erythrochiton gymnanthus.
2. El hongo reduce el crecimiento en altura de las plantas al infectarlas.
3. Las hifas invaden varios tejidos entre ellos epidermis, parénquima, floema y xilema.
4. El mejor crecimiento vegetativo de P. chrysita se obtuvo en medio de cultivo agar-extracto de malta a una temperatura de 26 °C.
5. Se encontró una correlación positiva entre el crecimiento de las plantas infectadas con el número de basidiocarpos.
6. No se logró establecer ninguna correlación entre los factores macroclimáticos y el crecimiento en altura de las plantas infectadas.

## REFERENCIAS

- Agrios, G.N. 1989. Fitopatología. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México, D.F. 756 p.
- Araya, E. 1983. Fenología de 12 especies frutales en el bosque premontano húmedo. Tesis. Escuela de Fitotecnia, Fac. de Agronomía. Universidad de Costa Rica. 50 p.
- Biological Stain Commission. 1973. Staining Procedures. 2nd. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. 120 p.
- Borchert, R. 1980. Phenology and ecophysiology of tropical tree: Erythrina poeppigiana O. F. Cook. Ecology 61 (5):1065-1074.
- Boza, M. 1989. Parques Nacionales de Costa Rica. Ed. Heliconia, San José, Costa Rica. 271 p.
- Browning, J.A., M.D. Simons & E. Torres. 1977. Managing host genes: epidemiologic and genetics concepts, p. 191-212. In Horsfall, J.G. & E.B. Cowling (ed.). Plant disease: an advanced treatise. Vol. I. How disease is managed. Academic Press. New York.
- Burdon, J.J. 1987. Diseases and plant population biology. Cambridge University Press. New York. 208 p.
- Burdon, J.J. 1992. The growth and regulation of pathogenic fungal population, pp. 173-181. In: Carroll, G.C. & D.T. Wicklow. The fungal community: Its organization and role in the ecosystem. Marcel Dekker, Inc New York.
- Carranza-Morse, J. 1992. Pore fungi of Costa Rica. II. Mycotaxon 43: 351-369.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 1991. Plagas y enfermedades forestales en América Central. Manual de consultas. Turrialba, Costa Rica. 85 p.
- Deacon, J.W. 1988. Introducción a la micología moderna. Edit. Limusa, S.A. de C.V. México, D.F. 350 p.

- Dickinson, C.H. & J.A. Lucas. 1982. Plant Pathology and plant pathogens. 2a. Ed. Blackwell Scientific Publication. Oxford London. 229 p.
- Dimond, A.E. 1975. Patogenesis y predisposición, p.21-118. In: Sarasola, A.A. & M.A. de Sarasola (ed.). Fitopatología. Curso moderno. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- Dinoor, A. & N. Eshed. 1984. The role and importance of pathogens in natural plant communities. Ann. Rev. Phytopathol. 22:443-466.
- Flores Vindas, E.M. 1989. La planta: estructura y función. Edit. Tecnológica de Costa Rica. 501 p.
- Garraway, M.O. & R.C. Evans. 1984. Fungal nutrition and physiology. John Wiley & Sons, Inc. New York. 401 p.
- Gilbertson, & L. Ryvardeen. 1986. North American Polypores. Fungiflora, Oslo-Norway. Vol. I. 433 p.
- \_\_\_\_\_ . 1987. North American Polypores. Fungiflora, Oslo-Norway. Vol.II. 448 p.
- Gómez F., P. 1984. Fenología y ecofisiología de dos poblaciones de Tabebuia rosea (Bertol) D.C., Roble de Sabana en el Valle Central de Costa Rica. Tesis de Maestría en Biología, Escuela de biología. Universidad de Costa Rica. 55 p.
- Gómez, L.D. 1987. Mapa de tipos de vegetación. Hoja San José. Escala 1:250.000. Editorial EUNED, San José.
- Hancock J. & C Huisman. 1981. Nutrient movement in host-pathogen system. Ann. Rev. Phytopathol. 19:309-331.
- Harlan, J.R. 1976. Diseases as a factor in plant evolution. Ann. Rev. Phytopathol. 14:31-51.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. Mycol. Res. 95 (6): 641-655.
- Holdridge, L.R. 1971. Forest environment in tropical lifes zones. A pilot study. Pergamon Press. Oxford. 731 p.

- Hunt, R.S. & F.W. Cobb, Jr. 1971. Selective medium for the isolation of wood rotting basidiomycetes. *Can. J. Bot.* 49: 2064-2065.
- Larsen, M.J. & L.A. Cobb-Pouille. 1990. Phellinus (Hymenochaetaceae). A Survey of the world taxa. *Fungiflora*. Oslo-Norway. Synopsis Fungorum. Vol 3. 206 p.
- Maloy, O.C. 1974. Benomyl-malt agar for the purification of cultures of wood decay fungi. *Pl. Dis. Reporter* 58(10): 902-904.
- Moore-Landecker, E. 1990. *Fundamental of the fungi*. 3a. Ed. Prentice-Hall, Inc. New Jersey. 561 p.
- National Academy of Sciences. 1988. *Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas*. Vol.1. Editorial Limusa, S.A.de C.V. México, D. F. 223 p.
- Nobles, M.K. 1948. Studies in forest pathology. VI: Identification of cultures of wood-rotting. *Can. J. Res.* 26: 281-431.
- Nobles, M.K. 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Can. J. Bot.* 43: 1097-1139.
- Porter, D.M. & T.S. Elias. 1979. Family Rutaceae. In: Woodson, R.E. Jr. & R.W. Schery. *Flora of Panama*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 66(2): 123-164.
- Protti, E., D. Siu, E. Zárate, P. Ramírez, J. Bergoeing, L. Brenes, E. Echandi & W. Montero. 1983. El sistema fluvial de Tárcoles, Costa Rica. Instituto Geográfico Nacional, San José. 90 p.
- Rayner, A.D.M. & L. Boddy. 1988. *Fungal decomposition of wood: Its Biology and Ecology*. John Wiley and Sons, New York. sp.
- Ryvarden, L & I. Johansen. 1980. A preliminary polipore flora of East Africa. *Fungiflora*. Oslo-Norway. 636 P.

- Sarasola, A.A. & M.A. R. de Sarasola. 1975. Fitopatología. Curso Moderno. Buenos Aires, Edit. Hemisferio Sur. Tomo I 364 p.
- Smith, J.E. & D.R. Berry. 1974. Biochemistry of fungal development. Academic Press. London New York. 326 p.
- Standley, P.C. 1937. Flora of Costa Rica. Field Museum of Natural History. Vol. XVIII Tomo II. Chicago, USA. 567 p.
- Tossi, J. 1969. Mapa ecológico de Costa Rica. Escala 1:750.000. Instituto Geográfico Nacional, San José, Costa Rica.
- Vogt, K.A., J. Bloomfield, J.F. Ammirati & S.R. Ammirati. 1992. Sporocarp production by basidiomycetes, with emphasis on forest ecosystems, pp. 563-581. In: Carroll, G.C. & D.T. Wicklow (ed.). The fungal community: Its organization and role in the ecosystem. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Worrall, J.J. 1991. Media for selective isolation of Hymenomycetes. Mycologia 83 (3): 296-302.
- Zárate, E. & P. Ramírez. 1983. Mapas del sistema fluvial de Tárcoles. CONICIT, San José, Costa Rica.

Apéndice No. 1. Datos promedios climatológicos: temperatura (°C),  
 humedad relativa (%) y precipitación (mm).  
 Estación Meteorológica Lagunillas, Orotina. 1992

MES	TEMPERATURA	HUMEDAD	* PRECIPITACION
E	25.9	59	0.0
F	27.3	56	23.5
M	29.3	51	0.0
A	29.0	54	28.2
M	27.7	72	127.6
J	25.9	85	161.3
J	24.1	86	236.5
A	24.7	87	220.8
S	24.0	89	317.3
O	24.4	89	276.7
N	23.9	86	240.2
D	24.9	80	8.8

\* Valores de precipitación total

Fuente: Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica.



Apéndice No. 2. Datos promedios climatológicos: temperatura (°C),  
humedad relativa (%) y precipitación (mm).  
Estación Metereológica Lagunillas, Orotina. 1993.

MES	TEMPERATURA	HUMEDAD	* PRECIPITACION
E	25.8	74	57.4
F	27.4	61	0.0
M	27.7	64	66.9
A	28.4	70	28.2
M	25.9	84	282.1
J	25.8	88	232.3

\* : Valores de precipitación total

Fuente: Instituto Metereológico Nacional de Costa Rica.

Apéndice No. 3. Prueba de Regresión Múltiple de parámetros ambientales y biológicos que afectan el crecimiento de las plantas infectadas. Carara, enero 1992 - julio 1993.

Variable	Coefficiente	Error Estandar	Probabilidad
Constante	-1.63	2.32	0.503
Humedad	-0.007	0.012	0.564
Precipit	0.001	0.0009	0.124
Temperat	0.049	0.0735	0.518
Basidiocarp	0.057	0.249	0.049

$P < 0.05$  muestra diferencia significativa.