

**Caracterización morfológica, patogénica y molecular de aislamientos de  
*Ceratocystis* spp. provenientes de seis zonas cafetaleras de Costa Rica**

**María José Cordero Vega**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA CON EL GRADO DE  
LICENCIADA EN AGRONOMÍA**

**ESCUELA DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**2017**

## **DEDICATORIA**

*A mi Dios por brindarme todas las oportunidades y fortalezas para finalizar una etapa muy importante en mi vida personal.*

*A mis padres María Auxiliadora y Jose por su infinito apoyo y guía durante toda mi vida y a mis hermanos Jazmín y Alonso por todos sus momentos de ánimo y colaboración.*

*A Mainor por su comprensión y compañía.*

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero manifestar mi fuerte agradecimiento al coordinador del departamento de Fitopatología del Centro de Investigaciones en Café, el M.Sc. Miguel Barquero Miranda, por su guía, apoyo, carácter y confianza durante todo este proceso.

A mi directora de tesis, la M.Sc. Amy Wang Wong por su guía y consejos brindados durante el desarrollo del proyecto.

Al Ph.D. Luis Felipe Arauz Cavallini, por sus consejos durante mi formación académica.

A la Dra. Mónica Blanco Meneses, por todo su apoyo y conocimientos brindados.

Al Dr. Danny Humphreys, por la ayuda brindada en la finalización de este trabajo.

A la Lic. Alejandra Robles, por la paciencia y apoyo brindado.

A mis compañeros de las regionales de Coto Brus, Pérez Zeledón, Los Santos, Turrialba, Valle Central y Valle Occidental del Instituto del Café por su guía y colaboración en la recolecta de las muestras.

Al Instituto del Café por todas las oportunidades brindadas.

Y a todas aquellas personas que me apoyaron durante la ejecución de la tesis.

Caracterización morfológica, patogénica y molecular de aislamientos de *Ceratocystis* spp.  
provenientes de seis zonas cafetaleras de Costa Rica

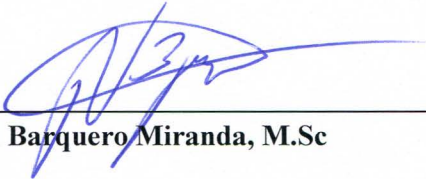
**María José Cordero Vega**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA AGRÓNOMA CON EL  
GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA**



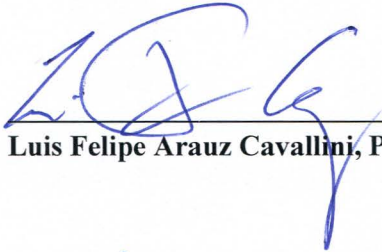
Amy Wang Wong, M.Sc

**DIRECTORA DE TESIS**



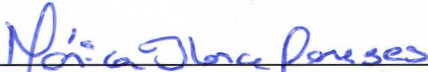
Miguel Barquero Miranda, M.Sc

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



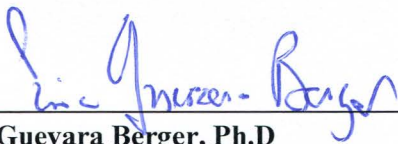
Luis Felipe Arauz Cavallini, Ph.D

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Mónica Blanco Meneses, Dra

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Eric Guevara Berger, Ph.D

**DIRECTOR DE ESCUELA**



María José Cordero Vega, B.Sc

**SUSTENTANTE**

**2017**

# ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	iii
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	xiv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	4
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	9
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	9
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	10
<b>1. Muestreo de las plantas enfermas a nivel de campo</b> .....	10
<b>1.1 Preparación de aislamientos</b> .....	10
<b>1.2 Recuperación de los aislamientos</b> .....	10
<b>2. Caracterización morfológica</b> .....	11
<b>2.1 Preparación del inóculo</b> .....	11
<b>2.2 Evaluaciones</b> .....	12
<b>3. Evaluación de la agresividad</b> .....	12
<b>4. Identificación molecular</b> .....	15
<b>4.1 Preparación de los aislamientos</b> .....	15
<b>4.2 Extracción de ADN</b> .....	15
<b>4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</b> .....	16
<b>RESULTADOS</b> .....	18
<b>1. Muestreo de las plantas enfermas a nivel de campo</b> .....	18
<b>2. Caracterización morfológica</b> .....	23
<b>3. Evaluación de la patogenicidad</b> .....	33

<b>4. Identificación molecular</b> .....	44
<b>DISCUSIÓN</b> .....	46
<b>1. Muestreo</b> .....	46
<b>2. Morfología</b> .....	49
<b>3. Agresividad</b> .....	53
<b>4. Identificación molecular</b> .....	57
<b>CONCLUSIONES</b> .....	61
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	62
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	63
<b>ANEXO</b> .....	71

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de evaluar la variabilidad morfológica, patogénica y molecular de 30 aislamientos de *Ceratocystis* spp. obtenidos de plantas de café en las regiones cafetaleras de Costa Rica: Coto Brus, Pérez Zeledón, Los Santos, Turrialba, Valle Central y Valle Occidental.

Se identificaron fincas con presencia de síntomas característicos de la enfermedad. De esta forma se obtuvo para la región de Coto Brus: 2 aislamientos; Pérez Zeledón 5; Los Santos 6; Turrialba 4; Valle Occidental 4 y el máximo número de individuos se obtuvo del Valle Central con 9. Se determinó que la distribución de la enfermedad está presente en parches, plantas aisladas y en podas.

La caracterización morfológica en los aislamientos recuperados se realizó mediante la observación y mediciones del peritecio (cuello, base y diámetro), ascosporas, clamidósporas, conidias, color del micelio y distribución de los peritecios en medio de cultivo artificial, obteniendo variabilidad entre los aislamientos.

La evaluación de la patogenicidad de los 30 aislamientos se realizó mediante un Índice de Agresividad en el cual se consideran valores de incidencia (%), área final de la lesión, esporas por lesión, periodo de aparición la lesión y de las estructuras sexuales (peritecios). De esta forma, se obtuvo que el tamaño de la lesión final en el tallo varía entre los tratamientos donde el VC22 procedente del Valle Central presentó el mayor valor con 9,9 cm y el aislamiento de Los Santos LS4 el menor, con un valor de 4,75 cm. La tasa de crecimiento diaria estuvo entre 0,94-1,9 cm y para los resultados del Índice de Agresividad se obtuvo que únicamente el 7 % de los individuos presentaban valores de índice menores a 30.000 y el 10 % presentaban los mayores valores, por encima de los 160.000; el 50 % de los individuos presentaban un índice entre 40.000-100.000 y el restante 33 % muestra valores entre 100.000 y 140.000. Para esta variable no se mostró una relación directa entre agresividad y la región de origen y se obtuvo que el aislamiento más agresivo corresponde

al aislamiento LS63 procedente de Santa María de Dota con un valor de 160.000 y el menor lo obtuvo el aislamiento LS4 procedente de la misma región.

Se identificaron diferencias genéticas entre los aislamientos determinados por agresividad y variabilidad morfológica mediante la utilización de los primers ITS,  $\beta$ - tubulina y factor de elongación 1- $\alpha$ . Se obtuvo amplificación de ~ 500 pb para la región ITS y la  $\beta$ - tubulina y ~ 800 pb para el factor de elongación 1- $\alpha$ . Se mostraron polimorfismos entre los aislamientos de *Ceratocystis* spp. obtenidos de plantas enfermas de café en las distintas regiones cafetaleras de Costa Rica. Los aislamientos LS63 y LS4 muestran valores de bootstrap entre ellos de 53 separándose de los aislamientos T43 y PZ67 con un valor de 80. Los aislamientos T43 y PZ67 muestran valores de bootstrap de 100 con la especie *C. papillata*, no obstante, se agrupan en ramas separadas. De forma general, se obtiene una separación genética entre los aislamientos LS63 y LS4 correspondientes a la región de Los Santos del aislamiento de Cajón de Pérez Zeledón PZ67 y del aislamiento de Santa Cruz de Turrialba T43 pudiendo corresponder a especies distintas.



## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Imprimadores para PCR de las regiones utilizadas en al análisis multilocus....16
- Cuadro 2.** Total de muestras positivas y negativas para *Ceratocystis* spp. analizadas en las regiones cafetaleras del Valle Occidental, Los Santos, Turrialba, Pérez Zeledón, Coto Brus y Valle Central de Costa Rica para la búsqueda de aislamientos de *Ceratocystis* spp., setiembre 2014-mayo 2016.....18
- Cuadro 3.** Número de aislamientos obtenidos para *Ceratocystis* spp. según las distintas regiones cafetaleras del país, 2015-2016.....20
- Cuadro 4.** Agrupación de los aislamientos de *Ceratocystis* spp. obtenidos en las distintas regiones según la característica de color mediante la utilización de la tabla Munsell.....33
- Cuadro 5.** Aislamientos de *Ceratocystis* spp. de las regiones cafetaleras de Costa Rica y sus variables morfológicas y patogénicas determinadas para la selección en las pruebas de identificación molecular.....39
- Cuadro 6.** Aislamientos de *Ceratocystis* spp. de las regiones cafetaleras de Costa Rica, especie *C. papillata* y *C. colombiana* y la medición de sus variables morfológicas comparativas.....53

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentaje de aislamientos obtenidos para *Ceratocystis* spp. según las distintas regiones cafetaleras del país, 2015-2016.....21
- Figura 2.** Puntos de muestreo de *Ceratocystis* spp. en las distintas regiones cafetaleras de Costa Rica: Valle Occidental, Los Santos, Turrialba, Pérez Zeledón, Coto Brus y Valle Central, 2015-2016.....22
- Figura 3.** Tamaño de las ascosporas ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.....23
- Figura 4.** Frecuencia poblacional para el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) de las ascosporas en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.....24
- Figura 5.** Tamaño de las conidias ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.....24
- Figura 6.** Frecuencia poblacional para el tamaño de las conidias ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.....25
- Figura 7.** Tamaño de las clamidiósporas ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.....26
- Figura 8.** Frecuencia poblacional para el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) de las clamidiósporas en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.....26

<b>Figura 9.</b> Tamaño de la base de peritecio ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.....	27
<b>Figura 10.</b> Frecuencia poblacional para el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) de la base del peritecio en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.....	28
<b>Figura 11.</b> Tamaño del cuello de peritecios ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.....	28
<b>Figura 12.</b> Frecuencia poblacional para el tamaño del cuello del peritecio en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.....	29
<b>Figura 13.</b> Tamaño del diámetro del peritecio ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.....	30
<b>Figura 14.</b> Frecuencia poblacional para el tamaño del diámetro de peritecio en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.....	30
<b>Figura 15.</b> Tamaño del ostiolo ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.....	31
<b>Figura 16.</b> Frecuencia poblacional para el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) del ostiolo en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.....	32

<b>Figura 17.</b> Tamaño de la lesión (cm) 15 días después de la inoculación en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.....	34
<b>Figura 18.</b> Frecuencia poblacional para el tamaño (cm) de la lesión final a los 15 días después de la inoculación en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.....	34
<b>Figura 19.</b> Tasa de crecimiento diaria (cm) en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.....	35
<b>Figura 20.</b> Frecuencia poblacional en una muestra de la población de <i>C. fimbriata</i> proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica según Índice de Agresividad.....	36
<b>Figura 21.</b> Agrupamiento de los aislamientos de <i>Ceratocystis</i> spp. en cantones según variables morfológicas, patogénicas y climáticas (lluvia-temperatura-humedad) correspondientes al I y II semestre año 2014-2015.....	37
<b>Figura 22.</b> Características morfológicas del aislamiento LS4; crecimiento en medio nutritivo (A); ascosporas, conidias y clamidiósporas cilíndricas (B); peritecio (C), base del peritecio (D), hifas ostiolar divergentes con salida de ascosporas (E), tamaño de lesión final promedio (H).....	40
<b>Figura 23.</b> Características morfológicas del aislamiento LS63; crecimiento en medio nutritivo (A); ascosporas, conidias y clamidiósporas cilíndricas (B); peritecio (C), base del peritecio (D), hifas ostiolar divergentes con salida de ascosporas (E), tamaño de lesión final promedio (H).....	41
<b>Figura 24.</b> Características morfológicas del aislamiento T43; crecimiento en medio nutritivo (A); ascosporas, conidias y clamidiósporas cilíndricas (B); base del peritecio (C), peritecio (D), hifas ostiolar divergentes (E), tamaño de lesión final promedio (H).....	42

**Figura 25.** Características morfológicas del aislamiento PZ67; crecimiento en medio nutritivo (A); ascosporas, conidias y clamidiósporas cilíndricas (B); base del peritecio (C), peritecio (D), hifas ostiolar divergentes con salida de ascosporas (E), tamaño de lesión final promedio (H).....43

**Figura 26.** Árbol filogenético de consenso basado en los criterios de análisis Bayesiano que ilustra la relación de los aislamientos de *Ceratocystis* spp. asociados a la “Llaga macana” en café de Costa Rica y demás especies de *Ceratocystis* spp encontrados en café, cacao, cítricos en Colombia. El árbol se generó mediante secuencias de las regiones ITS, *B*-tubulina y el Factor de Elongación 1- $\alpha$ .....45

**Figura 27.** Muestreo de plantas con presencia de *Ceratocystis* sp., plantas enfermas de forma aislada (A), en podas (B) y en parches (C).....47

**Figura 28.** Lesión irregular marrón- gricácea en tronco característica de *C. fimbriata*, Costa Rica, 2015-2016.....47

## LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1.** Variable morfológica color mediante la utilización de la Tabla Munsell de los aislamientos de *Ceratocystis* spp. obtenidos en las distintas regiones cafetaleras en el país.....71
- ANEXO 2.** Variables morfológicas para implementación de Índice de Agresividad: 0 día de la inoculación (A), 2 días después de la inoculación con aparición de lesión (B), 4-6 días después de la inoculación aparición de peritecios (C) lesión final 15 días después de la inoculación (D), desarrollo de peritecios sobre la lesión en herida realizada (E), medición de la cantidad de peritecios mediante el conteo en un área conocida su equivalencia al área total final de la lesión a los 15 días después de la inoculación (F).....72
- ANEXO 3.** Extracción de ADN mediante el macerado micelio (A-B), PCR y electroforesis con gel de agarosa 1 % para verificación de amplificación de PCR (C-D).....73
- ANEXO 4.** Aislamiento de *Ceratocystis* spp. y números de accesiones del GeanBank utilizados para generar el árbol filogenético en el presente trabajo.....74

## INTRODUCCIÓN

El cafeto, *Coffea arabica*, pertenece a la familia de las Rubiáceas. Su origen se estableció en las tierras altas de más de 1000 m.s.n.m en Etiopía y Sudán, África. Fue introducido en América por el año de 1720 y en Costa Rica a finales del siglo XVIII (Alvarado y Rojas, 2007).

La Organización Internacional del Café (OIC 2014) considera que el café es uno de los productos primarios de mayor valor, superado únicamente por el petróleo. En países en desarrollo, es fuente importante de divisas y genera empleo a millones de personas en todo el mundo durante los procesos de producción y comercialización. También tiene influencia en la economía y en la política de los países productores. Además, es considerado un producto básico con un mercado especial y selecto en Londres y Nueva York.

El consumo de café proporciona grandes aportes a la salud humana. No contiene gran concentración de nutrientes y calorías, sin embargo, diversos estudios han demostrado que es fuente de antioxidantes, retrasa el envejecimiento, posee un efecto protector contra el cáncer, disminuye el riesgo frente a enfermedades cardiovasculares, estimula el sistema nervioso y mejora la capacidad en la concentración (Instituto de Café de Costa Rica (ICAFFE) 2014). Lo anterior, ha incrementado su consumo a nivel mundial.

En el año 2012 el área cafetalera en Costa Rica, según el ICAFFE (2014), fue de 93 774 hectáreas con una producción para el ciclo 2012/2013 de 2 245 543 fanegas (400 litros de café en fruta) distribuidas entre las regiones de Coto Brus, Pérez Zeledón, Los Santos, Turrialba, Valle Central, Valle Central Occidental y la Zona Norte. Este mismo ente informa que el país exporta el 90 % del café que produce, representando para el último ciclo 2015/2016, según la OIC, una exportación total de 995 mil sacos de 60 kg, disminución ocasionada por el ataque severo de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*).

El 92 % de los productores nacionales poseen un área de siembra menor a las cinco hectáreas, el 6 % tienen una superficie entre 5-20 hectáreas y únicamente el 2 % poseen un área de siembra mayor a las 20 hectáreas (ICAFE 2014).

El cultivo del café en Costa Rica se ve afectado por enfermedades foliares, de grano y de raíz y tallo. Entre las de tipo foliar encontramos a antracnosis (*Colletotrichum* spp.), derrite (*Phoma* spp.), ojo de gallo (*Mycena citricolor*), *Myrothecium* sp. y la roya del café (*Hemileia vastatrix*); afectando los granos encontramos a antracnosis (*Colletotrichum* spp.); y a nivel de raíz y tallo se encuentra *Fusarium* spp., *Rosellinia* spp. y *Ceratocystis* spp. (ICAFE 2014).

De esta forma, encontramos una amplia gama de patógenos afectando la caficultura nacional, en donde, las enfermedades foliares y de grano pueden ser manejadas mediante buenas prácticas culturales y productos químicos, por el contrario, para la mayoría de enfermedades de suelo los productos químicos han sido poco eficientes. En estos casos, la mejor herramienta de combate va dirigida a una adecuada implementación de prácticas culturales y la búsqueda de alternativas en el mejoramiento de plantas con tolerancia o resistencia a enfermedades como *Ceratocystis* spp., fomentando en un contexto de competitividad, la optimización de los recursos y la reducción de los costos unitarios de producción para el combate de enfermedades y plagas (ICAFE 2014; Castro-Caicedo et al. 2003; Castro et al. 2003).

De los patógenos presentes en el suelo, se menciona a *Ceratocystis fimbriata* como uno de los más agresivos, debido a que es capaz de reducir la población de plantas de un 20 a 40% (Castro-Caicedo 1999; Castro y Zuluaga 2012). A nivel de suelo, según Ferreira et al. (2010) y Baker et al. (2003), este agente fitopatógeno es el causante de numerosas pérdidas económicas en diferentes cultivos de importancia agrícola a nivel de 41 países en los seis continentes del mundo.

Barnes et al. (2001) encontraron que cepas de *Ceratocystis fimbriata* pueden mantener un alto grado de especialización tanto por sus hospederos como por el área geográfica donde se localizan. Además, Ferreira y colaboradores (2010), hacen mención que aislamientos de



*Ceratocystis fimbriata* en Brasil, obtenidos a partir de diferentes hospederos, no eran patógenos en otras especies de las que fueron aislados y que el nivel de agresividad de las cepas nativas varía según el hospedante y los rangos geográficos. Baker y Harrington (2005) y Zauza y colaboradores (2004) determinaron que los distintos linajes (descendientes) de *Ceratocystis* sp. en América Latina presentan una alta especialización y que mediante el estudio de la morfología se pueden caracterizar nuevas especies.

Wingfield y colaboradores (1996) determinaron que se presentaban diferencias entre aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* originarios de Sudáfrica en relación a aislamientos obtenidos de Nueva Guinea, Francia, Italia y Japón, por lo tanto, incursionaron en la identificación mediante técnicas morfológicas convencionales y con secuencias del ADN ribosómico utilizando los primers ITS1, LR1, 5.8SR y CS2.

Marín y colaboradores (2003), concluyeron que los daños causados por este patógeno pueden agravarse en el futuro a menos que se busque medidas eficaces de combate de la misma. De esta forma Van Wyk y colaboradores (2010) mencionan la importancia de realizar estudios de caracterización de especies en las distintas regiones en los países productores. Esto tendría la finalidad de incursionar en el proceso de selección de plantas para mejoramiento, donde se dirija a la especie del patógeno más agresivo presente en la región de estudio.

Como se ha mencionado anteriormente, el combate químico de la enfermedad es ineficiente (Castro-Caicedo, 1999), además, se conoce que la agresividad varía entre las regiones y que existe diversidad de especies encontradas en los países productores de café. Por tanto, conociendo que este patógeno influye negativamente, causando pérdidas económicas a los sectores cafetaleros, se requiere determinar, mediante pruebas morfológicas, de agresividad e identificación molecular, el comportamiento y la variabilidad de la población en sus distintos ambientes naturales a nivel del territorio nacional, tomando en consideración que no se cuenta con ningún estudio sobre la diversidad y patogenicidad del mismo en nuestro país.

## ANTECEDENTES

Durante la producción de los cultivos, la presencia de agentes fitopatógenos limitan el desarrollo y crecimiento adecuado de los mismos. En Costa Rica, las enfermedades del tronco y la raíz en los cafetos se mencionan desde inicios del siglo XIX donde se observan daños tanto en almácigos como en plantas adultas (Bianchini, 1955). Castro-Caicedo y Cortina-Guerrero (2009) hacen mención de la enfermedad conocida como “llaga macana” desde el año de 1932.

Los primeros informes del género *Ceratocystis* se establecen en el año de 1890 como el causante de la podredumbre negra de la papa en los Estados Unidos (De Beer et al., 2014; Roux y Wingfield, 2009). Saccardo en 1892 le transfirió el nombre de *Sphaeronaema*, en 1923 Elliott le nombró como *Ceratostomella*, en el año de 1934 Melin y Nannfeldt le conocieron como *Ophiostoma* y un año después Davidson se lo transfirió a *Endoconidiphora*. Sin embargo, fue reconocida mundialmente como *Ceratocystis* en el año de 1950 (CABI, 2017).

Echandi (1955) a partir de aislamientos obtenidos de plantas enfermas de Cartago y San José, encontró la presencia del hongo *Ceratostomella*, organismo similar al mencionado en Colombia, Venezuela y Guatemala. Mencionó que el patógeno ataca a plantas de café con edades entre los 40-50 años y que desde años anteriores se encontraba en los cafetos del Valle Central del país. Posteriormente, se le conoció con el nombre de *Ceratocystis* y Castro-Caicedo y colaboradores (2003) mencionan que dicho patógeno en países productores, se encuentra en plantas adultas y jóvenes, y aparece con mayor frecuencia entre los 2 años y 4 años de edad o en cafetos después de su primera poda.

*Ceratocystis sensu lato* pertenece al grupo de los ophiostomatoides e incluye los géneros: *Ceratocystis sensu stricto*, *Ceratocystiopsis* (Upad. & Kendr) y *Ophiostoma* (H. y P. Sydow) (Jacobs et al., 1998; Pérez, 2009). Se conoce que dentro de estos existe variabilidad

en la patogenidad entre ellos, por ejemplo *C. paradoxa* y *C. moreau* son menos agresivos que *O. ulmi* (Buism.), *O. novoulmi brasier* y *C. fimbriata* (Wingfield *et al.*, 1996).

*Ceratocystis* sp. pertenece al reino Fungi, a la división Myxomycota, subdivisión Ascomycotina, clase Microascales y a la familia Ceratocystaceae. Tiene la capacidad de infectar al menos 31 especies en 14 familias de importancia económica, la mayoría dicotiledóneas a excepción de una aráceas (Johnson *et al.* 2005; Baker *et al.* 2003; Roux\*† *et al.* 2004; De Beer *et al.* 2014; Waller *et al.* 2007; Lui *et al.* 2015); sin embargo, García *et al.*, 2016 informa de un total de 40 especies de importancia agrícola afectadas por la enfermedad. Afecta a cultivos en diferentes países, Zauza *et al.* (2004) lo encuentra en banano (*Musa* spp.) y en árboles como *Prunus* spp, melina (*Gmelina arborea*), *Populus* spp., acacia (*Acacia* spp.), *Hevea brasiliensis* y el híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* en Brasil. En Costa Rica afecta mango (*Mangifera indica*), cítricos (*Citrus* sp.), caucho (*Ficus elastica*), cacao (*Theobroma cacao* L.) y otras especies como la guanábana (*Annona muricata*) y el guapuruvú (*Schizolobium parahyba*) (Van Wyk *et al.* 2010; Meneses, 2008; Barnes *et al.* 2001).

Ferreira *et al.* (2010) y Araujo *et al.* (2014) hacen mención que, en Brasil, el primer informe sobre la enfermedad fue en *Crotalaria juncea*, posteriormente, se encuentra en mango donde provoca grandes pérdidas económicas y en eucalipto (*Eucalyptus* spp.); además, produce la pudrición del cormo en la especie *Colocasia esculenta*. En Colombia, Van Wyk *et al.* (2010) hacen referencia a la presencia de la enfermedad en 1932, presentando los mismos hospederos que en países como Costa Rica y Brasil.

Este patógeno provoca la enfermedad reconocida como “llaga macana” o también “mal de machete”, posee una alta capacidad saprofitica y se encuentra presente en la mayoría de los suelos cafetaleros (Cadena y Gaitán 2006). Los síntomas externos a nivel de planta son clorosis, marchitamiento y la progresiva muerte de las mismas; a nivel de tejido interno se produce una obstrucción de los tejidos vasculares del tallo (xilema principalmente), donde las lesiones se extienden hacia arriba y bajo del tronco causando la muerte de la planta (Castro-Caicedo *et al.* 2013; Araujo *et al.* 2014; Bispo *et al.* 2015; CABI, 2017). No

obstante, Araujo et al. (2014), en una investigación sobre la resistencia a la enfermedad realizada en cultivares de mango en Brasil, evidenció la presencia de estructuras del hongo en todos los tejidos de los tallos (colénquima y parénquima), por lo que no lo considera un patógeno estrictamente vascular, sin embargo, la presencia de hifas en estos tejidos se ve restringido por la presencia de compuestos fenólicos por parte de dichas células.

Estudios realizados indican que *Ceratocystis fimbriata* se encuentra principalmente en suelos de América Central y del Sur, no obstante, también se ha aislado de zonas templadas y las regiones tropicales de todo el mundo (Barnes et al. 2001; Waller et al. 2007). Según Castro -Caicedo (1999) se encuentra distribuido en forma aleatoria en los suelos abarcando altitudes que van desde los 800 m hasta los 2 000 m. Tiene la capacidad de sobrevivir de 7 a 15 días en la superficie de una herida y en fragmentos de madera en ríos y a nivel de suelo hasta 3 meses con temperaturas menores a los 35 °C; su temperatura óptima de crecimiento es de 18 a 28 °C, no obstante, puede desarrollarse a temperaturas entre los 10 °C y 45 °C en presencia de su huésped (Thorpe et al. 2005; Meneses 2008; Grosclaude et al, 1991; CABI, 2017).

Es considerado como la enfermedad de más importancia a nivel de tallo y raíz en los cafetos y ha tenido una alta diseminación y frecuencia de aparición debido a las heridas causadas a las plantas, primordialmente el zaqueo (poda), el uso de herramientas contaminadas y terrenos con alta pendiente que puede ocasionar una herida ocasionada por el apoyo de los recolectores en las plantaciones (Castro-Caicedo et al. 2013). Además, Ferreira et al. (2010), Van Wyk et al. (2007a), De Beer et al. (2014), Pérez et al. (2011) y Roux y Wingfield (2009) mencionan que la transmisión de este hongo está relacionada en muchos casos con insectos de la familia Curculionidae como agentes vectores. Se ha asociado la característica de un olor afrutado fuerte como medio de atracción de vectores y se cree, que la presencia de la enfermedad en países donde no es originario, es debido a la transmisión por dichos insectos, observado en cultivos como mango en Oman -Pakistan y en *Eucalyptus* en Australia. Dicha enfermedad puede ocasionar pérdidas en la producción entre el 20 % y el 50 % e influye en pérdidas económicas directas al tener que reemplazar las plantas muertas de café (Castro-Toro y Rivillas-Osorio 2003; Castro-Caicedo 1999;

Castro et al. 2003; Castro y Zuluaga 2012). En este caso, Castro et al. (2003) hacen mención en un estudio realizado, que las pérdidas económicas aumentan cuando la planta presenta la enfermedad y ésta se encuentra en período de producción, disminuyendo así la vida útil de las mismas con un promedio de 4,6 años/árbol atacado; agregaron que con una incidencia del 13 % de la enfermedad en una hectárea, se producen pérdidas en la productividad entre los \$ 495 000 a \$ 728 000/ ha/año, lo que hace de suma importancia una mayor investigación sobre este patógeno.

La identificación taxonómica actual de hongos se basa en el estudio de las características micro y macromorfológicas: características de la colonia, color en medio de cultivo, tamaño, forma, desarrollo de esporas, esporas sexuales o asexuales y medios de cultivos selectivos. Los métodos moleculares han complementado estos estudios con técnicas basadas en los estudios del ácido desoxirribonucleico (ADN) para evaluar diferencia y relaciones filogenéticas. Se realizan comparaciones de secuencias del rADN mitocondrial y rADN nuclear, este último contienen los espaciadores internos ITS-1 e ITS-2 y un espaciador intergénico llamado IGS que son la base en estudios de filogenie. Los marcadores mitocondriales son considerados como códigos de barras para los hongos y los marcadores nucleares son más susceptibles a acumular mutaciones por lo que son de gran importancia en dichos estudios (Glass y Donaldson 1995; Fourie et al. 2015).

A nivel del mundo existen tres clanes o grupos para este patógeno ubicados en el centro de Asia, América del Norte y Latinoamérica. De cada clan se desarrollan diversos linajes en donde se ha encontrado que aislamientos de los mismos poseen una alta especialización y que mediante diferencias en pruebas morfológicas y taxonómicas se descubren nuevas especies (Baker y Harrington 2005).

Wingfield y colaboradores (1996) determinaron que se presentaban diferencias entre aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* originarios de Sudáfrica en relación a aislamientos obtenidos de Nueva Guinea, Francia, Italia y Japón, por lo tanto, incursionaron en la identificación mediante técnicas morfológicas convencionales y con secuencias del ADN ribosómico utilizando los primers ITS1, LR1, 5.8SR y CS2.

Para Baker y Harrington (2005), *Ceratocystis fimbriata* presenta alta variación genética debido, en muchos casos, a los amplios rangos geográficos en donde se localiza. Araujo et al. (2014) hacen mención que existen diferencias en la agresividad de poblaciones de *C. fimbriata* que atacan mango en diferentes regiones geográficas en Brasil.

Van Wyk y colaboradores (2010) determinaron, mediante pruebas morfológicas y de secuenciación de cinco regiones de genes, la existencia de dos nuevas especies dentro del complejo *Ceratocystis fimbriata sensu lato* con la capacidad de enfermar al cafeto: *Ceratocystis colombiana* y *Ceratocystis papillata*. Según Castro-Caicedo et al. (2013) estas nuevas especies representan una amenaza en la producción de cafeto en Colombia.

El combate de la enfermedad mediante manejo químico ha sido poco exitoso por lo que las recomendaciones van enfocadas a evitar cualquier tipo de herida en la planta, utilizar fungicidas protectores cuando se hacen las respectivas podas y desinfectar las herramientas de corte. Con respecto a la poda, se recomienda realizarla en un periodo seco, para disminuir la probabilidad de infección y estimular la cicatrización (Castro-Caicedo, 1999; Castro y Zuluaga, 2012). Castro-Toro y Rivillas-Osorio (2003) hacen referencia a la utilización de *Trichoderma harzianun* como una buena herramienta de combate biológico para dicho patógeno.

Conociendo la diversidad del patógeno, la capacidad de sobrevivencia, la forma de penetración al hospedero, las pérdidas económicas en las que se incurre y la dificultad en el combate, se incursiona en la búsqueda de materiales con resistencia o tolerancia a las cepas más agresivas imperantes en las regiones cafetaleras en países de América Latina y Sur América.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la morfología, la patogenicidad y la identificación molecular de aislamientos de *Ceratocystis* sp. provenientes de las regiones cafetaleras del Valle Occidental, Los Santos, Turrialba, Pérez Zeledón, Coto Brus y el Valle Central de Costa Rica.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer una muestra de cultivos axénicos de la población de *Ceratocystis* spp. provenientes de cafetos de las regiones cafetaleras del Valle Occidental, Los Santos, Turrialba, Pérez Zeledón, Coto Brus y Valle Central de Costa Rica.
- Caracterizar morfológicamente una muestra de la población de *Ceratocystis* sp. mediante la medición del tamaño del peritecio, las ascosporas, las clamidiósporas y las conidias, así como diferencias en la coloración de la colonia y las distribuciones de los peritecios.
- Evaluar la patogenicidad de aislamientos de *Ceratocystis* sp. mediante el uso de un Índice de Agresividad en troncos ortotrópicos de plantas de café var. Catuaí.
- Identificar, molecularmente, diferencias o similitudes genéticas entre los aislamientos según su morfología y patogenicidad.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones en Café (CICAFE), ubicadas en San Pedro de Barva de Heredia, desde el 9 de marzo del 2015 al 21 de abril del 2017.

### **1. Muestreo de las plantas enfermas a nivel de campo**

#### **1.1 Preparación de aislamientos**

Se inspeccionó, al azar, al menos 10 fincas distribuidas en cada una de las principales regiones cafetaleras de Costa Rica: Valle Occidental, Los Santos, Turrialba, Pérez Zeledón, Coto Brus y Valle Central. En cada finca se identificó plantas que presentaban síntomas característicos de la enfermedad como marchitamiento y clorosis. Posterior a la observación visual, se realizó un raspado del tronco a nivel de suelo y se verificó la presencia de una lesión irregular necrótica-rojiza, donde se pudo observar una lesión previa o podas bajas (menores a los 20 cm). Se trasladaron en bolsas plásticas con una toalla humedecida al Laboratorio de Fitoprotección de CICAFE en donde se procedió con la recuperación del patógeno.

Cada unidad experimental tuvo la siguiente información: fecha de recolecta, coordenadas geográficas, provincia, cantón, distrito y altura mediante la utilización de un Sistema de Posición Global (GPS).

#### **1.2 Recuperación de los aislamientos**

Se tomaron pequeñas secciones del tejido enfermo (tronco), se desinfectaron con aspersiones de alcohol 70 % y se llevaron a la cámara de flujo laminar donde se tomaron 12 secciones del tejido de la zona interna de avance de la lesión de cada una de las muestras. Cada una se colocó en placas Petri en medio con papa dextrosa agar (PDA, marca Difco



<sup>TM</sup>) a una dosis de 35 g/l, acidificado con ácido láctico (250 µl/litro de medio de cultivo). Además, se colocaron secciones de tejido enfermo en dos placas Petri conteniendo rodajas de zanahoria (dos por placa), a las cuales se les colocó papel filtro estéril humedecido con agua destilada esterilizada, esto, como una segunda opción para el crecimiento del patógeno (Marín et al. 2003; Meneses. 2008). La zanahoria es un medio selectivo para *Ceratocystis* sp., lo que promueve la obtención de un aislamiento en un menor tiempo y sin la presencia de otros contaminantes que crecen rápidamente en PDA. El utilizar ambas técnicas aumentó la probabilidad de obtener el patógeno de interés.

Al final, se tomaron estructuras del patógeno de cualquiera de los 16 puntos inoculados (en PDA o zanahoria), con el cuidado de que no se presentara ningún contaminante. La cantidad de secciones utilizadas fue para aumentar la probabilidad de crecimiento del patógeno de interés ya que tiende a contaminarse con otros hongos y bacterias oportunistas que presentan una tasa de crecimiento mayor.

De esta forma, se obtuvo la colección de aislamientos necesario para los posteriores estudios morfológicos, patogénicos y moleculares.

## **2. Caracterización morfológica**

### **2.1 Preparación del inóculo**

Una vez establecido el cultivo axénico para todas las muestras (cuando el patógeno colonizó el total del área de la placa Petri y se observó la presencia de peritecios, aproximadamente entre 18-22 días dependiendo del aislamiento) se realizó un raspado a cada una de las placas y se colocó en un punto sobre un porta objeto, se le colocó una gota de agua estéril (~ 200 µl) e inmediatamente se colocó un cubre objeto. Se prepararon tres repeticiones por aislamiento (correspondientes a tres distintas placas Petri).

## **2.2 Evaluaciones**

Se llevó a cabo la caracterización morfológica mediante observaciones y mediciones realizadas en un microscopio óptico (Olympus CX31), el cual poseía un lente ocular con micrómetro para medir las variables cuantitativas:

2.2.1 Base del peritecio, largo del cuello, diámetro del peritecio con un lente 10x y el largo del ostiolo con un lente de 40x.

2.2.2 Ancho de las ascosporas y largo de las clamidiósporas con un lente de 40x.

2.2.3 Distribución de los peritecios en el medio de cultivo (placa PDA) en tres grupos: grupos centrales, distribuidos en todo el medio y en anillos concéntricos (Van Wyk et al. 2010).

2.2.4 Coloración de los aislamientos mediante la utilización de la tabla Munsell (Soil-Color Charts, 2010) utilizada para la caracterización del color en suelos.

Se realizó una descripción de las estructuras reproductivas. Para las variables cuantitativas se utilizó los límites de confianza y el comportamiento poblacional se evaluó mediante el desarrollo de frecuencias poblacionales.

## **3. Evaluación de la agresividad**

Para la evaluación de la agresividad se utilizaron tallos ortotrópicos de café de la variedad catuaí establecido en una parcela de la finca experimental del CICAPE, ubicada en San Pedro de Barva, con 10 años de edad y con un ciclo de poda de 4 iniciado en el 2016.

Se tomaron los tallos con un diámetro de 2 cm y estos se cortaron en segmentos de 10 cm de largo; a cada segmento de tallo se realizó un raspado de 1 cm de la corteza de forma longitudinal hasta llegar a los haces vasculares con la ayuda de un cuchillo de cocina desinfectado con alcohol del 70 % para evitar contaminación. Se verificó que los troncos

utilizados se encontraban sanos y se trabajó con el mínimo contacto en la preparación de los segmentos.

Se colocaron 12 segmentos de troncos en grupos de tres en cámaras húmedas, las cuales consisten en cajas plásticas de 21 cm de ancho por 29 cm de largo y 7 cm de alto; las mismas contenían 200 ml de agua destilada en el fondo y un soporte de cedazo donde se colocaron las secciones de troncos.

Para la preparación del inóculo, se tomaron ascósporas y clamidósporas de una placa Petri de cada uno de los aislamientos y se preparó una suspensión de esporas en agua destilada a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml. Para determinar la concentración, se tomaron 10  $\mu$ l de cada tubo conteniendo la suspensión y se depositaron en una cámara de Neubauer por medio de una micropipeta. Con un microscopio óptico (Olympus CX31), aumento 40x, se contaron las células del retículo central (cuatro esquinas y el centro). Se realizó lo mismo para cada aislamiento, luego se determinó el número de esporas utilizando la fórmula:

$$C = N * Fc * Fd$$

Donde, C= células/ml

N= Número de células del retículo central

Fc= Factor de la cámara

Fd= Factor de dilución.

Cada segmento de tronco se inoculó con 10  $\mu$ l de la suspensión de esporas a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml, en el centro de la lesión longitudinal realizada previamente. Las cámaras húmedas cerradas se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada ( $23 \pm 1$  °C) y un fotoperiodo de 12 horas durante 15 días.

Se realizaron evaluaciones tres veces por semana durante 15 días para cada uno de los aislamientos, la cual consistía en la medición del crecimiento de la lesión en forma longitudinal (largo del tronco). Tres cajas plásticas (cámara húmeda) con 4 secciones de

tronco cada una; esto para cada uno de los aislamientos (para un total de 3 repeticiones con 4 secciones de tronco cada una) con un diseño irrestricto al azar.

Se aplicó el índice de agresividad (IA) (Anexo. 2) utilizado por Pliakhnevich e Ivaniuk (2008) y Waldemar (2012) para medir agresividad y patogenicidad en *Phytophthora infestans* y *Mycena citricolor* respectivamente; esto mediante la fórmula:

“IA:  $(FI*LA*SC)/(IP*LP)$ ” donde,

1. FI es frecuencia de infección (incidencia).
2. LA es el área de la lesión 15 días después de la inoculación (cm).
3. SC es la esporulación (esporas/lesión).
4. IP es el período de incubación (tiempo en días durante el cual se lleva a cabo el proceso de infección que finaliza con la aparición de los síntomas visibles).
5. LP corresponde al período de latencia (tiempo en días de crecimiento del hongo hasta la formación de estructuras reproductivas sobre la sección de tronco).

Además, se realizó una medición del crecimiento de la lesión para cada uno de los aislamientos, 6 veces en los 15 días de evaluación para la obtención de la tasa de crecimiento.

Los datos obtenidos para el caso de Índice de Agresividad se evaluaron mediante el desarrollo de un análisis poblacional (histograma) (Pliakhnevich e Ivaniuk 2008; Waldemar 2012).

Se analizaron los datos de crecimiento para cada uno de los aislamientos mediante la utilización de límites de confianza.

Se desarrolló, además, un análisis de conglomerados (cluster) en cantones mediante el programa estadístico R- Project, considerando variables morfológicas y de agresividad para los aislamientos de *Ceratocystis* spp. de Costa Rica y variables climáticas lluvia-temperatura-humedad tomados por las Estaciones Climáticas del Instituto de Café de Costa Rica durante los periodos correspondientes al I y II semestre años 2014-2015.

## **4. Identificación molecular**

### **4.1 Preparación de los aislamientos**

Se seleccionaron los aislamientos LS4, T43, LS67 y PZ67 para realizar las pruebas genéticas. Cada aislamiento se encontraba puro en PDA a  $21 \pm 1$  °C y 75-85 % de humedad relativa (HR) en condiciones de oscuridad.

Una vez establecido los aislamientos en PDA se realizó el cultivo del hongo en medio líquido compuesto por 3,12 g/l de extracto de levadura (Yeast Extract Hy., Yest ®412, Sigma) y 14,8 g/l de sacarosa (azúcar de mesa “Doña María”) en agua destilada. Se preparó una solución de 50 ml en erlenmeyers de 100 ml para cada muestra y se autoclavó durante 30 minutos y se dejó enfriar. En la cámara de flujo laminar se tomó una asada de micelio o ascosporangios de cada aislamiento establecido en PDA, mediante la utilización de un asa micológica estéril y se colocó en un Erlenmeyer con el medio líquido de extracto de levadura. Se selló cada frasco con papel aluminio y papel parafilm y se colocó en agitación a 1500 r.p.m en un agitador orbital durante 10 días.

Trascurridos los 10 días, se llevaron los erlenmeyers a la cámara de flujo laminar, y utilizando puntas de micropipetas de 1000 µl, se depositó una muestra del líquido en tubos para microcentrífuga (eppendorf) estériles, uno para cada aislamiento. Luego, se tomaron 10 µl de cada tubo y se depositaron en una cámara de Neubauer utilizando una micropipeta, la cual se colocó en un microscopio óptico (Olympos CX31) para verificar la pureza del patógeno y descartar la posibilidad de contaminación. El micelio obtenido para cada aislamiento se almacenó en tubos estériles de vidrio en un sistema de enfriamiento a -30 °C.

### **4.2 Extracción de ADN**

Se extrajo el micelio contenido en los tubos de vidrio almacenados a -30 °C y se colocó en tubos de microcentrífuga utilizando una espátula estéril, permitiendo la toma de una mayor cantidad de estructuras del hongo (De Beer et al. 2014). A la masa de micelio se le añadió 800 µl del buffer de extracción de ADN (BEB: 250 Mm de Tris HCl [pH 8], 250 mM de

NaCl, 25 mM de EDTA [pH 8] y 0.5 % de SDS). Seguidamente se incubaron las muestras en baño maría a 37 °C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo anterior, se les agregó fenol: cloroformo (5:3) y se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos hasta obtener una interfase clara. Esta se extrajo y se le adicionó acetato de sodio 3 M (0.1 volúmenes) [pH 5,5] y se centrifugó 2 min a 10 000 rpm; el precipitado se incubó a 4° C durante toda una noche. La mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 10 000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con etanol 70 %. Se descartó el etanol y se colocó el pellet a secar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se suspendió el ácido nucleico en 50 µl de agua estéril libre de nucleasas.

### 4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se emplearon las regiones de genes utilizadas para la identificación de nuevas especies (*C. papillata* y *C. colombiana*) de patógenos de café descritas por Van Wyk et al. (2012) (Cuadro 1)

**Cuadro 1.** Imprimadores para PCR de las regiones utilizadas en el análisis multilocus

Región	Primer	Secuencia	Referencia
ITS	ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. 1990
	ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
BT	B-T1a	TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG	Glass y Donaldson 1995
	B-T1b	GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC	
EF	EF-1R	TCGGGTGGTATCGACAAGCGT	Jacobs et al. 2004
	EF-2R	AGCATGTTGTGCGCCGTTGAAG	

Para realizar la PCR se utilizó 3.5 ng de ADN, 2.5 µl del Buffer 10x (Promega), 2.18 µl de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0.5 µl de cada dNTP, 1 µl para cada uno de los primers y 0.4 µl de la Taq (Taq ADN Polimerasa de Thermo Scientific). El volumen final se ajustó a 25 µl con agua estéril por reacción.

Para las reacciones del PCR se utilizó un termociclador (Esco Swift<sup>o</sup>Maxpro) mediante la utilización de los siguientes ciclos térmicos según Van Wyk et al. (2006): 2 minutos a 96

°C, seguido de 10 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 40 segundos a 55 °C y 45 segundos a 72 °C. Los últimos tres intervalos de temperatura se repitieron 30 ciclos con un incremento de 5 segundos para la etapa de alineamiento y la etapa final de elongación de 10 minutos a 72 °C

Los resultados de la PCR se purificaron con el Kit Wizard ® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) y se mandaron a secuenciar mediante Biocientífica Internacional S. de R.L a la empresa internacional Macrogen.

Para el análisis se utilizó en programa Bio Edit Sequence Alignment Editor para desarrollar las secuencias en formato fasta; para el alineamiento de las secuencias se utilizó en programa ClustalX 2.1.

Se desarrollaron las matrices con el programa Mesquite versión 3.04. El algoritmo de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) se utilizó para crear el árbol filogenético basado en probabilidades Bayesianas usando el programa del software MrBayes versión 3.2 y se visualizó el árbol filogenético con el programa Fig Tree.versión 1.4.3. El árbol fue obtenido con la adición de 1000 réplicas. Fueron calculados los intervalos de confianza utilizando 1000 réplicas de bootstrap.

Se utilizaron las regiones  $\beta$ - tubulina, ITS y el Factor de Elongación 1- $\alpha$  de 5 especies de *C. papillata* y de 4 especies de *C. colombiana* para comparar con especies que afectan las plantas de café a nivel de América. También se incluyó en el análisis una especie de *C. virescens*, *C. cacaofunesta*, *C. manginecans*, *C. platani*, y *C. fimbriata* obtenidas del Gen Bank. Dichas accesiones pueden verificarse en el anexo 4.

## RESULTADOS

### 1. Muestreo de las plantas enfermas a nivel de campo

Se muestrearon un total de 74 puntos con la finalidad de obtener un promedio de 5 muestras por región, no obstante, en algunas regiones como por ejemplo Coto Brus, se dificultó la colecta de muestras positivas para *Ceratocystis* spp., dando como resultado la obtención de otros patógenos entre los que destacaron *Fusarium* spp. y *Rosellinea* spp. Para cada uno de los puntos muestreados se tomaron datos de altura, coordenadas geográficas, región cafetalera de procedencia, cantón y distrito/caserío (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Total de muestras positivas y negativas para *Ceratocystis* spp. analizadas en las regiones cafetaleras del Valle Occidental, Los Santos, Turrialba, Pérez Zeledón, Coto Brus y Valle Central de Costa Rica para la búsqueda de aislamientos de *Ceratocystis* spp., setiembre 2014-mayo 2016

Código <sup>1</sup>	Altura	Coordenadas		Zona Cafetalera	Provincia	Cantón	Distrito/ Caserío	Positiva	Negativa
		x	y						
VC1	1327	10.059936	084.152627	Valle Central	Heredia	Santa Bárbara	Birrí	x	
VC2	1400	09°.54' 38	93°. 58' 15	Valle Central	Cartago	Tres Ríos	Tres Ríos		x
PZ3	585	503577,33	1070171,03	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	San Pedro	x	
LS4	1779	547147,2	1025279,137	Los Santos	San José	Dota	Santa María	x	
VC5	-	493637	1088311	Valle Central	San José	Desamparados	San Miguel		x
LS6	1670	491190	1064481	Los Santos	San José	Tarrazú	San Carlos		x
LS7	-	-	-	Los Santos	San José	Tarrazú	San Lorenzo		x
LS8	-	495843	1059458	Los Santos	San José	Tarrazú	San Lorenzo		x
LS9	1641	502830	1065896	Los Santos	San José	Dota	Santa María		x
LS10	1451	492479	1066945	Los Santos	San José	Tarrazú	San Lorenzo	x	
LS11	1514	493136	1066958	Los Santos	San José	Tarrazú	San Lorenzo	x	
LS12	1875	486101	1070385	Los Santos	San José	León Cortes	Llano Bonito	x	
VC13	1206	493018	1107209	Valle Central	Heredia	Santo Domingo	-		x
VC14	1300	475336	1114997	Valle Central	Alajuela	Sabanilla	Caserío Lajas	x	
VC15	1249	47293	1116119	Valle Central	Alajuela	Poás	San Juan	x	
VC16	1535	479745	1117646	Valle Central	Alajuela	Alajuela	Carrizal	x	
VC17	1352	476057	1116243	Valle Central	Alajuela	Alajuela	Los Ángeles		x
VC18	1323	477704	1114856	Valle Central	Alajuela	Alajuela	San Isidro	x	
VC19	1479	486949	1111824	Valle Central	Heredia	Barva	San José de la Montaña	x	
VC20	1410	485113	1112870	Valle Central	Heredia	Santa Bárbara	Jesús		x
VC21	1552	482809	1115060	Valle Central	Heredia	Santa Bárbara	Santa Bárbara	x	
VC22	1502	481856	1115619	Valle Central	Alajuela	Alajuela	Carrizal	x	
VC23	1428	503253	1095616	Valle Central	Cartago	Tres Ríos	La Unión	x	
PZ24	-	-	-	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	Cajón		x



PZ25	780	540079	1031661	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	Cajón		x
PZ26	558	551574	1021401	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	San Pedro		x
PZ27	625	553256	1023192	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	San Pedro		x
PZ28	620	550089	1025850	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	San Pedro	x	
VO29	1098	440380	1119081	Valle Occidental	Alajuela	San Ramón	Piedades Sur		x
VO30	-	462552	1122473	Valle Occidental	Alajuela	Naranjo	Robles I		x
VO31	-	468594	1116072	Valle Occidental	Alajuela	Grecia	San Isidro		x
VO32	1340	448328	1107355	Valle Occidental	Alajuela	San Ramón	Berlín		x
VO33	1466	458667	1120876	Valle Occidental	Alajuela	Naranjo	Sirrí		x
VO34	1474	458600	1120920	Valle Occidental	Alajuela	Naranjo	Sirrí	x	
VO35	1003	460314	1116235	Valle Occidental	Alajuela	Naranjo	San Jerónimo		x
VO36	1076	451239	1114015	Valle Occidental	Alajuela	Palmares	Buenos Aires		x
VO37	-	451851	1115458	Valle Occidental	Alajuela	San Ramón	San Isidro		x
VO38	996	460787	1117215	Valle Occidental	Alajuela	Naranjo	San Jerónimo		x
T39	951	982132	8356676	Turrialba	Cartago	Turrialba	Dulce Nombre	x	
T40	1045	993698	8372701	Turrialba	Cartago	Turrialba	Santa Rosa	x	
T41	1056	993981	8372686	Turrialba	Cartago	Turrialba	Santa Rosa	x	
T42	1268	9.95418	83.11809	Turrialba	Cartago	Turrialba	Santa Cruz		x
T43	1188	1006983	8426139	Turrialba	Cartago	Turrialba	Santa Cruz	x	
PZ44	651	9.33960	83.65536	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	General Viejo		x
PZ45	612	9.90043	83.66747	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	General Viejo		x
PZ46	673	93536	8365243	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	General Viejo	x	
PZ47	681	9.33021	83.63541	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	General Viejo		x
PZ48	692	9.33006	83.63472	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	General Viejo		x
PZ49	617	9.27522	83.54384	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	San Pedro		x
PZ50	615	9.27479	83.54417	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	San Pedro		x
PZ51	614	9.27436	8354437	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	San Pedro	x	
VO52	1131	450965	1115789	Valle Occidental	Alajuela	San Ramón	Berlín	x	
VO53	1385	449161	1107050	Valle Occidental	Alajuela	San Ramón	Berlín		x
VO54	1093	451174	1116088	Valle Occidental	Alajuela	San Ramón	San Isidro		x
VO55	1210	449723	1106309	Valle Occidental	Alajuela	San Ramón	Pata de Gallo		x
VO56	1219	489483	1107053	Valle Occidental	Alajuela	San Ramón	Pata de Gallo	x	
CB57	998	8.83531	082.96940	Coto Brus	Puntarenas	Coto Brus	San Vito	x	
CB58	931	8.84471	82.95083	Coto Brus	Puntarenas	Coto Brus	San Vito		x
CB59	1021	8.83391	82.96162	Coto Brus	Puntarenas	Coto Brus	San Vito		x
CB60	1014	9.98645	84.4414	Coto Brus	Puntarenas	Coto Brus	Sabalito		x
CB61	999	8.83480	82.96879	Coto Brus	Puntarenas	Coto Brus	San Vito		x
CB62	1071	8.86557	82.88146	Coto Brus	Puntarenas	Coto Brus	Sabalito		x
LS63	1784	09.66223	083.95588	Los Santos	San José	Dota	Santa María	x	
LS64	1678	09.64400	084.04839	Los Santos	San José	Tarrazú	San Lorenzo	x	
LS65	1773	09.66238	083.95546	Los Santos	San José	Dota	Santa María	x	
LS66	1412	9.65312	84.06406	Los Santos	San José	Tarrazú	San Lorenzo		x
PZ67	630	0547229	1025727	Pérez Zeledón	San José	Pérez Zeledón	Cajón	x	
VO68	1327	10.113466	084.270358	Valle Occidental	Alajuela	Grecia	San Isidro	x	
VC69	-	476577	1118458	Valle Central	Alajuela	Poás	Sabana		x
VO70	-	-	-	Valle Occidental	Alajuela	Palmares	Zaragoza		x
VC71	1132	09°.52' 08"	82°. 49' 53"	Coto Brus	Puntarenas	Coto Brus	Sabalito		x
CB72	1132	08°.52'08.0"	82°.49'53.9"	Coto Brus	Puntarenas	Coto Brus	Sabalito	x	
CB73	988	08°.48'32.5"	82°.54'53.0"	Coto Brus	Puntarenas	Coto Brus	Buenos Aires		x
CB74	958	08°.49'15.1"	82°.53'35.8"	Coto Brus	Puntarenas	Coto Brus	Buenos Aires		x

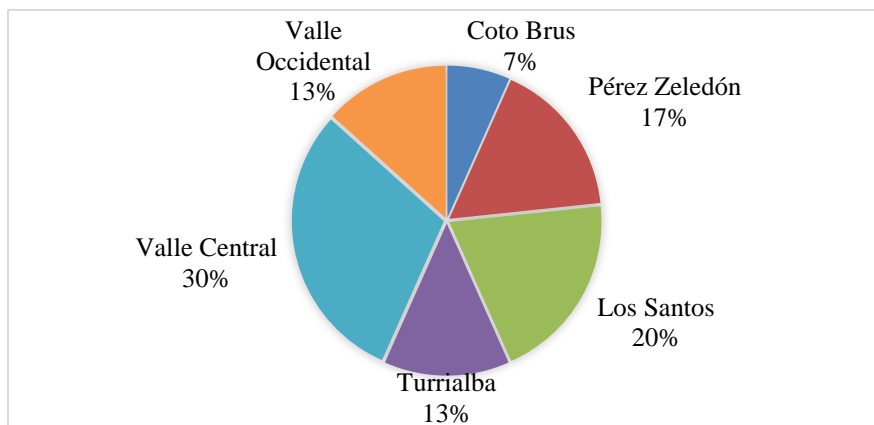
<sup>1</sup> CB: Coto Brus; PZ: Pérez Zeledón; LS: Los Santos; T: Turrialba; VC: Valle Central y VO: Valle Occidental

En cada región se pretendía recolectar un mínimo de 5 muestras de *Ceratocystis* spp., no obstante, conforme se realizaba el muestreo, la presencia de síntomas en plantas eran más evidentes en unas regiones que en otras, por lo que se muestreó más puntos para obtener este número. De esta forma, en el Valle Occidental se obtuvo un máximo de 17 puntos y Turrialba, con el mínimo número de muestras de 5 (esta área cafetalera presentaba menor presencia de plantas con los síntomas de la enfermedad). De los 74 puntos en total, positivas para *Ceratocystis* spp. fueron únicamente 30, distribuidas de la siguiente forma:

**Cuadro 3.** Número de aislamientos obtenidos para *Ceratocystis* spp. según las distintas regiones cafetaleras del país, 2015-2016

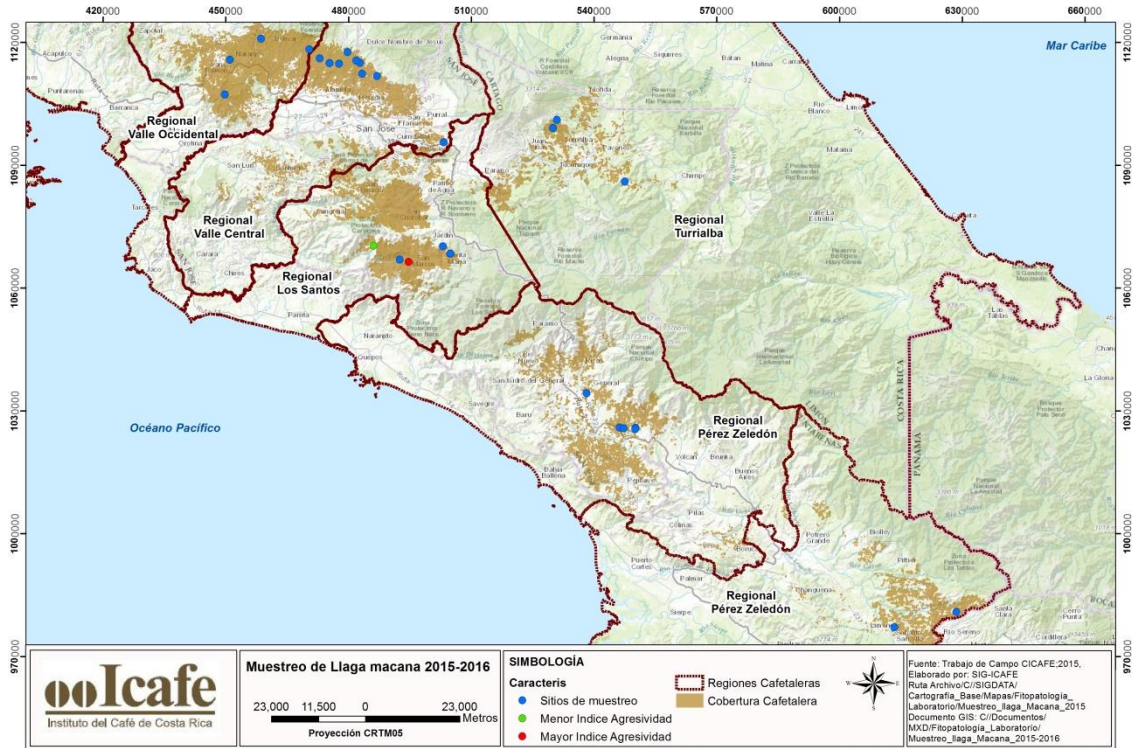
<b>Región</b>	<b>N° Aislamientos</b>
<b>Coto Brus</b>	2
<b>Pérez Zeledón</b>	5
<b>Los Santos</b>	6
<b>Turrialba</b>	4
<b>Valle Central</b>	9
<b>Valle Occidental</b>	4

Del total de muestras positivas para *Ceratocystis* spp. en las distintas regiones cafetaleras se obtiene que el mayor porcentaje se encuentra en el Valle Central con un 30 % de la población total seguido por Los Santos con un 20 %, Pérez Zeledón con un 17 %, Turrialba-Valle Occidental con un 13 % las dos y la menor proporción se obtuvo en la región de Coto Brus con un 7 % (Fig. 1).



**Figura 1.** Porcentaje de aislamientos obtenidos para *Ceratocystis* spp. según las distintas regiones cafetaleras del país, 2015-2016.

En la Figura 2, se observa los límites geográficos de cada una de las regiones cafetaleras establecidas para Costa Rica. La coloración café representa fincas cafetaleras en cada una de las zonas. La mayor área cafetalera corresponde a la región de Los Santos, seguido por El Valle Occidental y el Valle Central. Los puntos en coloración azul muestran los puntos de muestreo positivos para la presencia de *Ceratocystis* spp., el punto marcado en rojo representa a la muestra LS63 siendo el aislamiento más agresivo y el punto marcado en verde correspondiente a LS4 es el que mostró una menor agresividad.

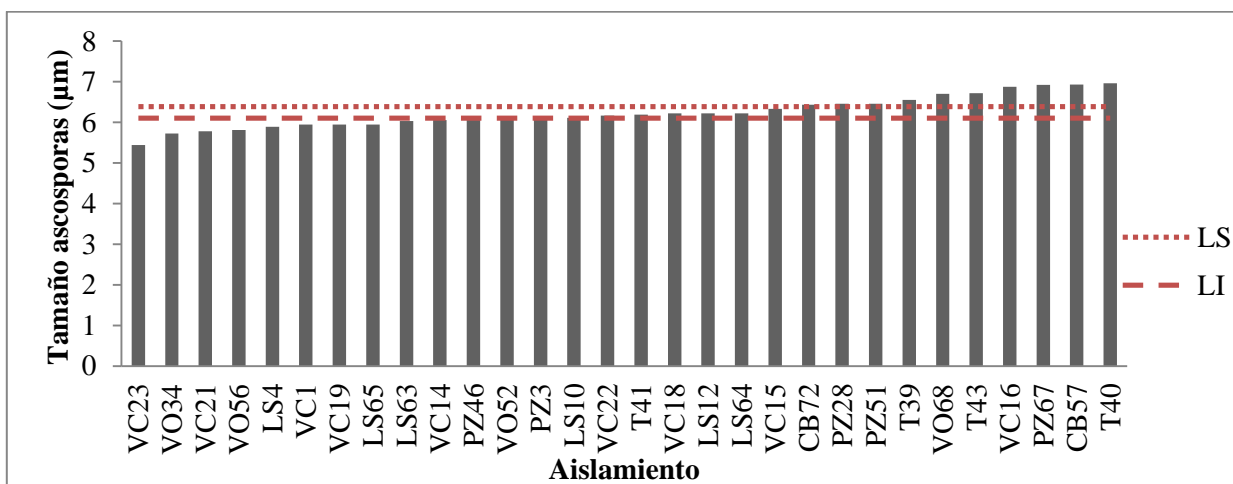


**Figura 2.** Puntos de muestreo de *Ceratocystis* spp. en las distintas regiones cafetaleras de Costa Rica: Valle Occidental, Los Santos, Turrialba, Pérez Zeledón, Coto Brus y Valle Central, 2015-2016.

## 2. Caracterización morfológica

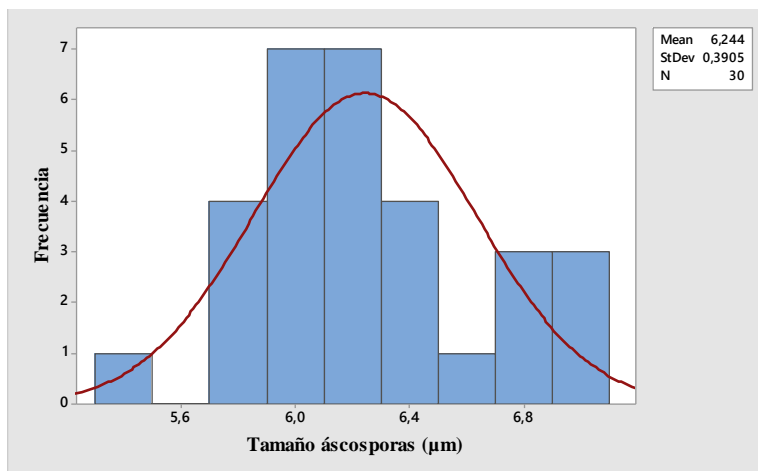
Se mostraron diferencias en algunas de las variables morfológicas evaluadas para los aislamientos de *Ceratozystis* sp. en las distintas regiones cafetaleras del país.

Las ascosporas presentaban forma de sombrero y el intervalo de medición se encontró entre 5,43-6,97  $\mu\text{m}$ , donde los aislamientos VC23, VO34, VC21, VO56 y LS4 mostraron diferencias obteniendo los valores más bajos en relación a los aislamientos T39, VO68, T43, VC16, PZ67, CB57 y T40 con las mayores mediciones (Fig. 3).



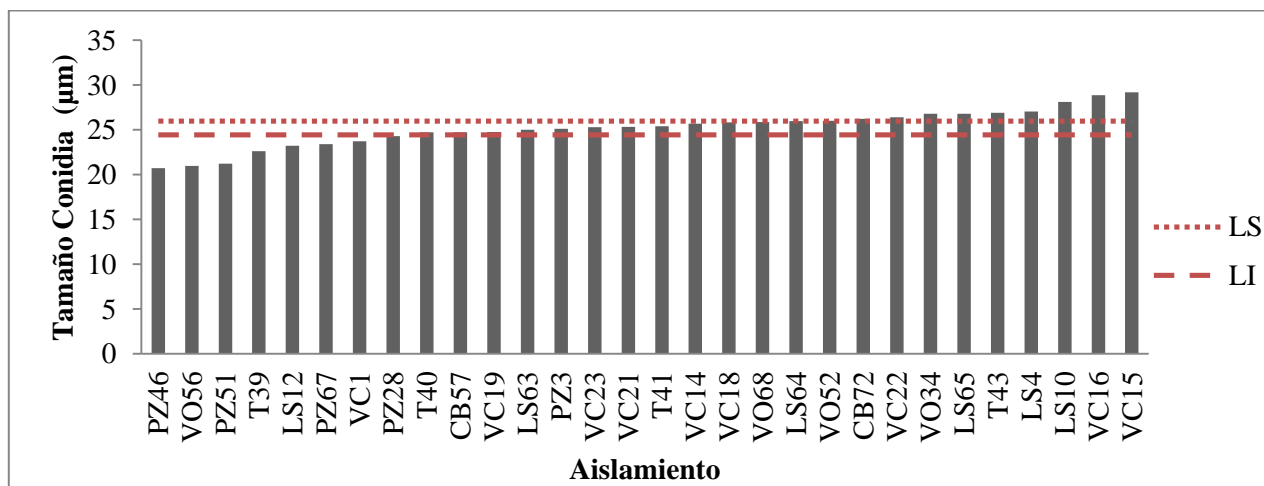
**Figura 3.** Tamaño de las ascosporas ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.

La distribución del tamaño de las ascosporas en la población estudiada está compuesta por tres grupos, un 3,3 % de la población se presenta en el extremo de menor valor, el 87 % de los individuos mostraron valores intermedios entre los 5,7 y 6,8  $\mu\text{m}$  y únicamente el 10 % se encuentra en el extremo máximo con una distribución normal (Fig. 4).



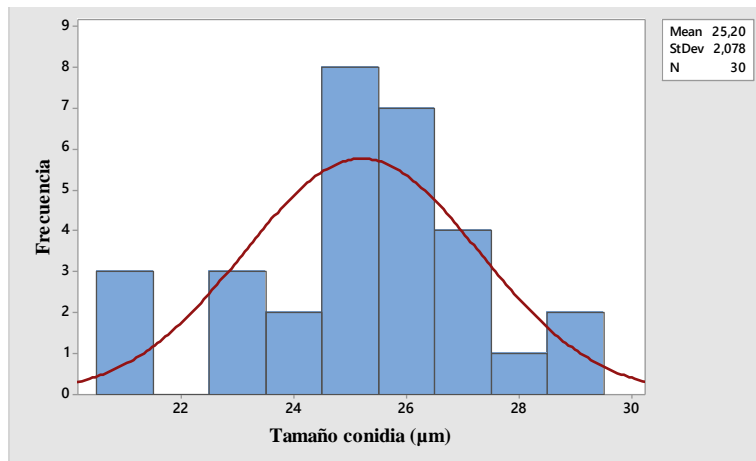
**Figura 4.** Frecuencia poblacional para el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) de las ascosporas en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.

Las conidias tenían formas cilíndricas y en algunos casos en forma de barril, el tamaño de las conidias mantuvo valores entre 20.73-29.20  $\mu\text{m}$ , donde el aislamiento PZ46 obtuvo el menor tamaño y el VC15 el mayor (Fig. 5).



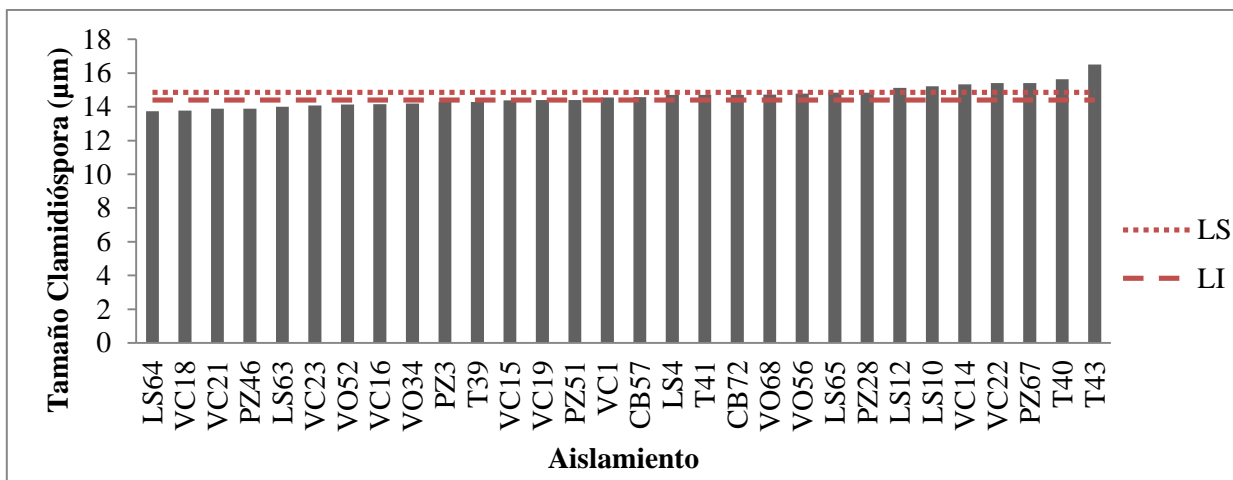
**Figura 5.** Tamaño de las conidias ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.

En la Figura 6 se observa el tamaño de las conidias, en donde el 10 % de los individuos se localizan en el extremo de menor valor, el 87 % de los individuos en valores intermedios entre los 25 y 27  $\mu\text{m}$  y el 6,7 % en el extremo máximo de la campana, mostrando el comportamiento de una distribución normal.



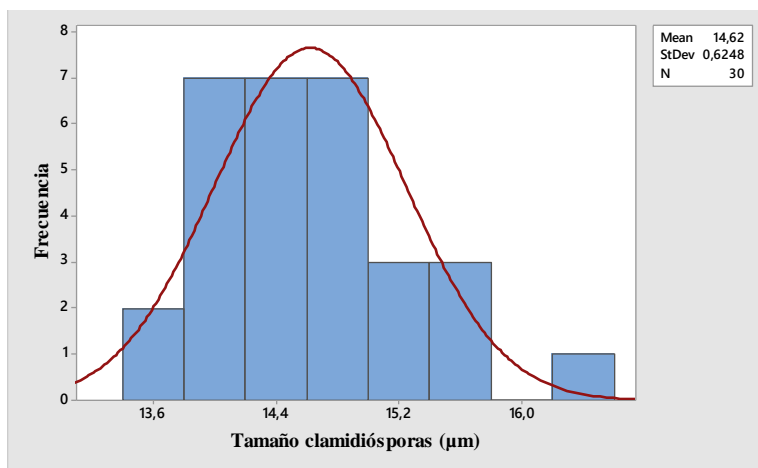
**Figura 6.** Frecuencia poblacional para el tamaño de las conidias ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.

En el caso de las clamidiósporas, estructura globosa con paredes gruesas, el intervalo de tamaño de la población se mantuvo entre 13.73-16.53 ( $\mu\text{m}$ ), donde el aislamiento LS64 presentó el menor valor y el aislamiento T43 el mayor valor (Fig. 7).



**Figura 7.** Tamaño de las clamidiósporas ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.

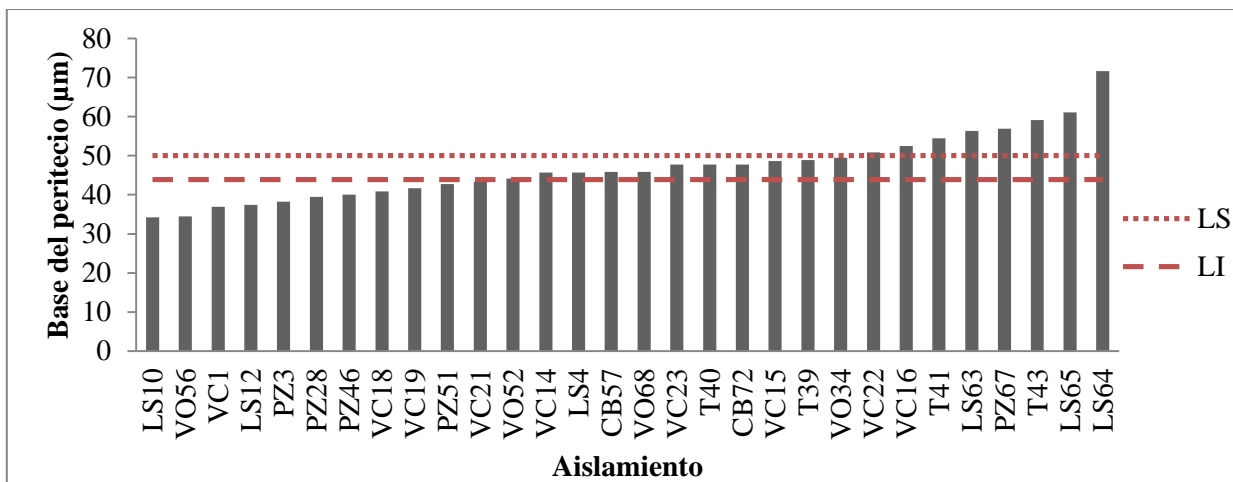
En la Figura 8 se observó cómo, para el tamaño de las clamidiósporas, el 7 % de la población se presentó en el extremo de menor valor, el 90 % valores intermedios entre los 14 y 15,8  $\mu\text{m}$  y un 3,3 % en el extremo máximo de la campana, mostrando resultados de una distribución normal.



**Figura 8.** Frecuencia poblacional para el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) de las clamidiósporas en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.

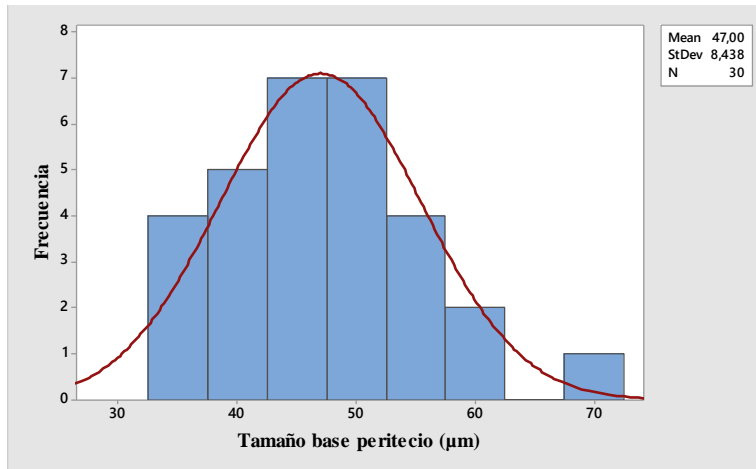


La base del peritecio de los diferentes aislamientos mostró una mayor variabilidad. La población se mantuvo en un intervalo entre los 34,23-71,67 ( $\mu\text{m}$ ), mostrando diferencias principalmente entre los aislamientos LS10 y VO56 con el LS64, con menores y mayor valor respectivamente (Fig. 9).



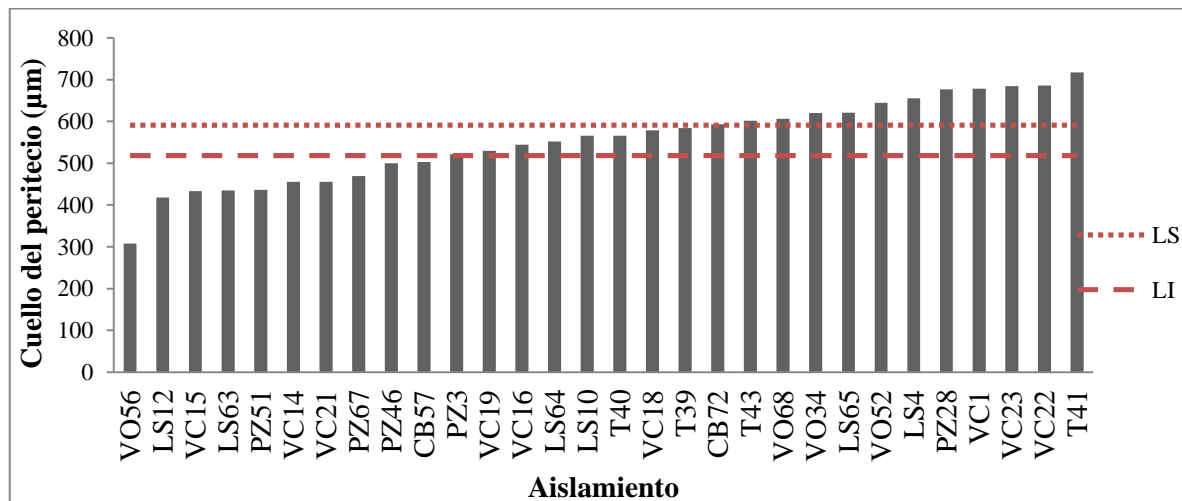
**Figura 9.** Tamaño de la base de peritecio ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.

En la Figura 10 se observa cómo, para el tamaño de la base del peritecio, el 13,3 % de los individuos mostraron valores menores a 35  $\mu\text{m}$ , el 83,3 % se encontró en la media poblacional y únicamente el 3,3 % presentó un valor de 70  $\mu\text{m}$  ubicado en el extremo máximo de la curva.



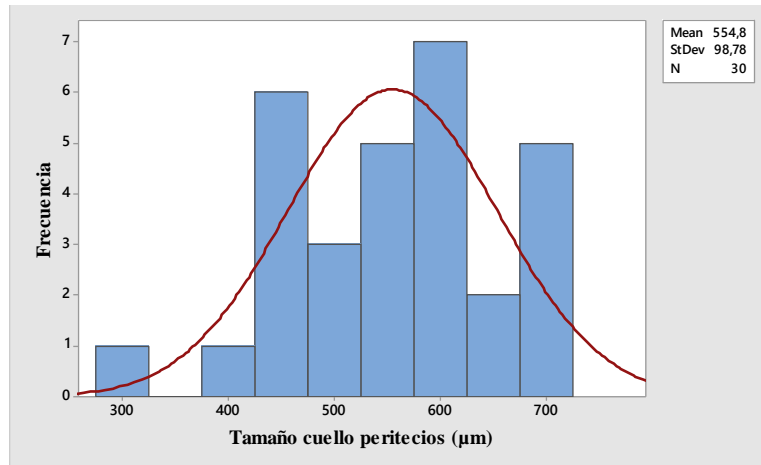
**Figura 10.** Frecuencia poblacional para el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) de la base del peritecio en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.

En cuanto al tamaño del cuello del peritecio, los valores promedio fueron entre 307,77-717,77  $\mu\text{m}$ , donde el aislamiento VO56 representa el menor valor y el T41 con el mayor valor, mostrando diferencias entre ellos (Fig. 11).



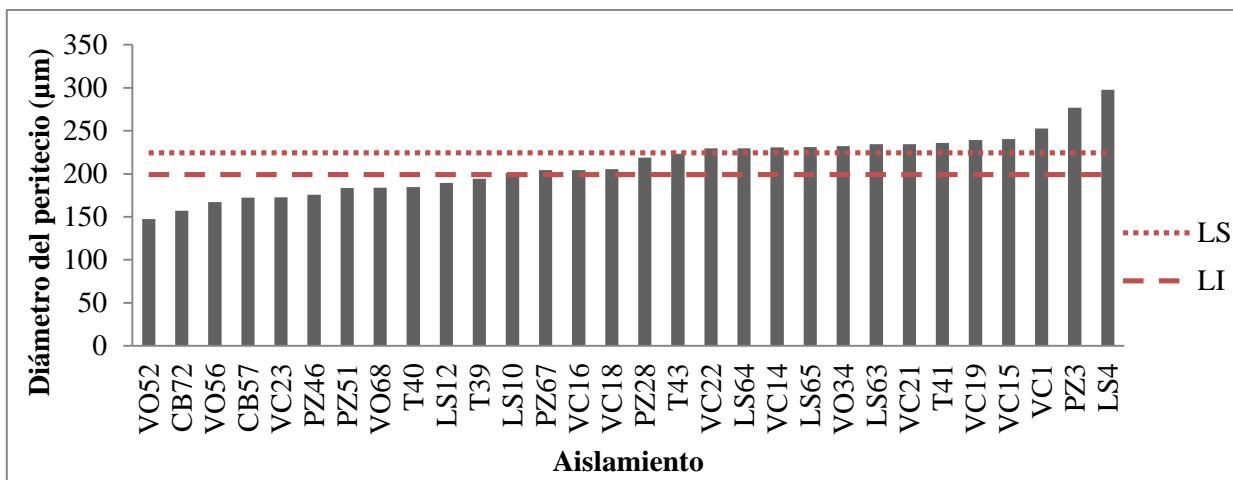
**Figura 11.** Tamaño del cuello de peritecios ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.

En la Figura 12 se observó cómo, para el tamaño del cuello del peritecio, el 3,3 % de los individuos mostraron valores de 300  $\mu\text{m}$  ubicado en el extremo mínimo, el 80 % de estos se ubicaron entre 400-650  $\mu\text{m}$  y el 16,7 % mostró valores máximos de 700  $\mu\text{m}$ .



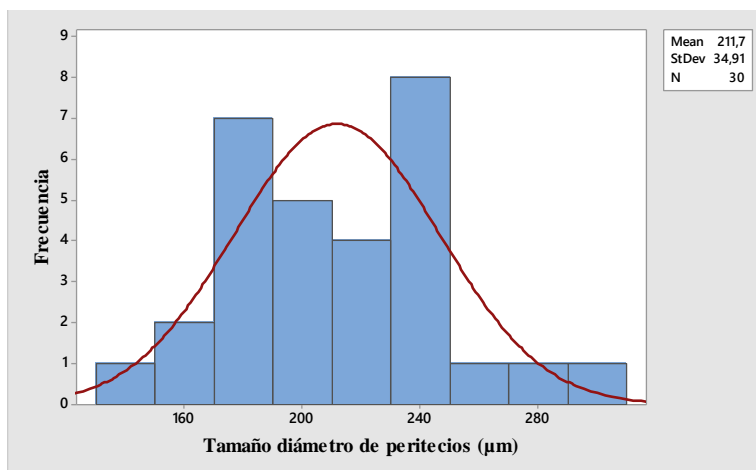
**Figura 12.** Frecuencia poblacional para el tamaño del cuello del peritecio en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.

El peritecio presenta una base globosa, el intervalo de medición del diámetro se encuentra entre 147,23-294,77  $\mu\text{m}$ , donde el aislamiento VO52 obtiene el menor valor seguido por el LS4 con la medición más alto (Fig. 13).



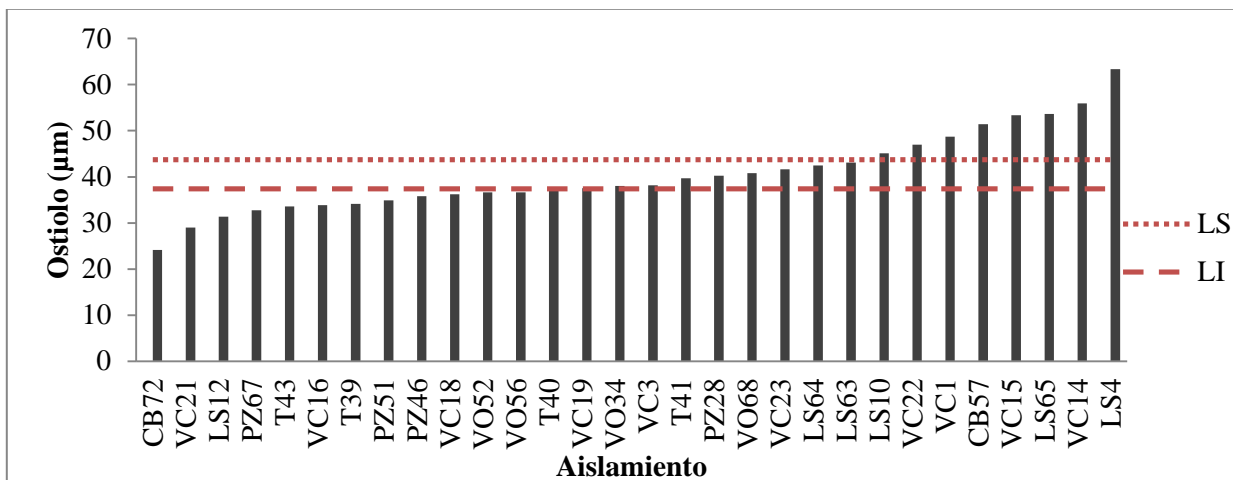
**Figura 13.** Tamaño del diámetro del peritecio ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.

Para la variable diámetro de peritecio, el 3,3 % de los individuos mostró valores de 140  $\mu\text{m}$ , el 93,3 % presentó valores entre los 160-280  $\mu\text{m}$  y un 3,3 % se presentó el máximo valor con un 290  $\mu\text{m}$  (Fig. 14)



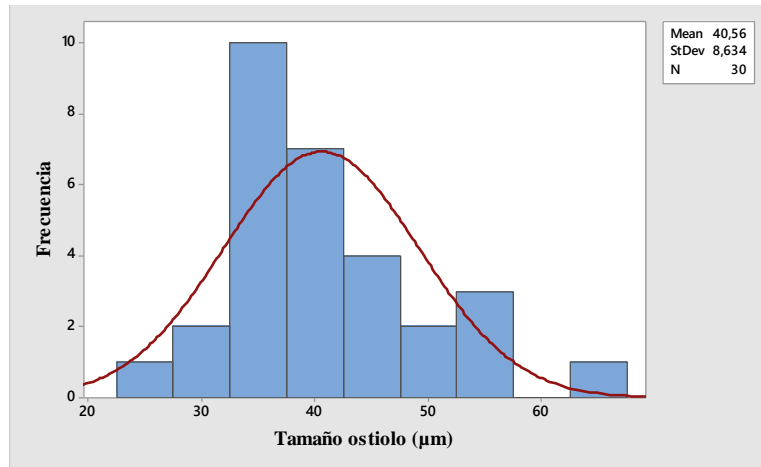
**Figura 14.** Frecuencia poblacional para el tamaño del diámetro de peritecio en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.

Para la variable ostiolo (hifas ostiolares divergentes), la población de *Ceratocystis* sp. varía entre los 24,17- 63,30  $\mu\text{m}$ , mostrándose diferencias entre el aislamiento CB72 con el menor valor en relación al individuo LS4 con la mayor medición (Fig. 15).



**Figura 15.** Tamaño del ostiolo ( $\mu\text{m}$ ) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.

Para la variable tamaño del ostiolo es la que presenta mayor diferencia entre los individuos; un 10 % presenta valores de 30  $\mu\text{m}$ , un 33,3 % presenta valores de 35  $\mu\text{m}$ , la mayor cantidad de individuo con un 53,3 % valores entre 40 y 55  $\mu\text{m}$  y únicamente un 3,3% presenta el valor máximo de 70  $\mu\text{m}$  (Fig. 16).



**Figura 16.** Frecuencia poblacional para el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) del ostiolo en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.

La distribución de los peritecios en el medio de cultivo (PDA) de los 30 aislamientos de *Ceratozystis* spp. fue: un 40 %, correspondiente a 12 individuos mostraron formación de los peritecios en anillos concéntricos, el 57 % de los individuos presentaron una distribución en todo el medio de cultivo y un 3 % (1 individuo únicamente) permaneció en un grupo central.

Como lo muestra el cuadro 4, 18 de los aislamientos presentaron un tono olivo, 3 de ellos un olivo pálido, 2 con tonalidad marrón grisáceo y 1 aislamiento para los colores: amarillo, pardo grisáceo oscuro, gris olivo, marrón amarillento, marrón, gris olivo claro y gris olivo oscuro.

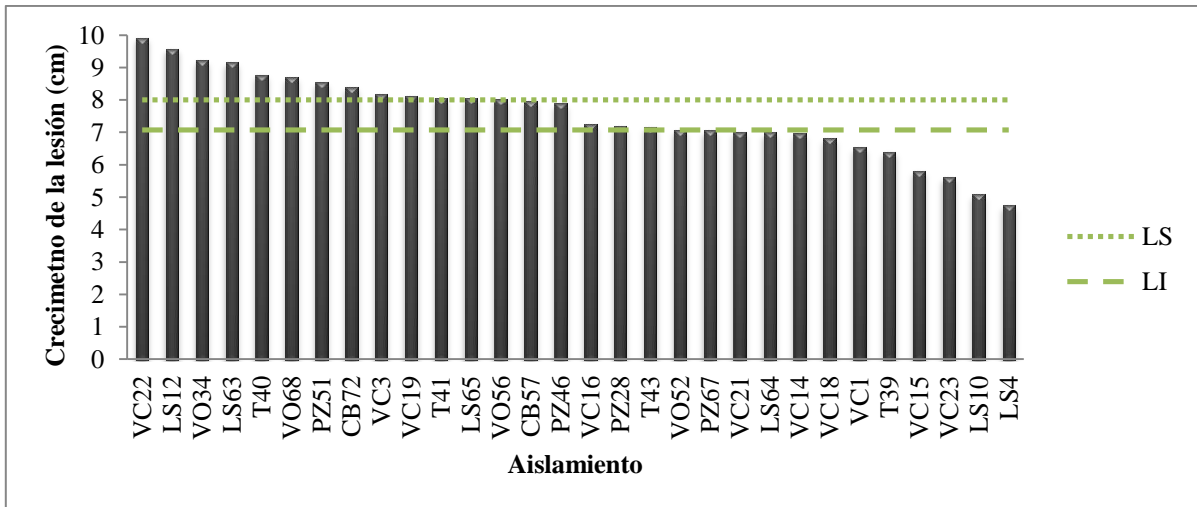
**Cuadro 4.** Agrupación de los aislamientos de *Ceratocystis* spp. obtenidos en las distintas regiones según la característica de color mediante la utilización de la tabla Munsell

<b>Color</b>	<b>N° de aislamientos</b>
<b>Amarillo</b>	1
<b>Olivo</b>	18
<b>Pardo grisáceo oscuro</b>	1
<b>Gris olivo</b>	1
<b>Marrón grisáceo</b>	2
<b>Marrón amarillento</b>	1
<b>Marrón</b>	1
<b>Gris olivo claro</b>	1
<b>Olivo pálido</b>	3
<b>Gris olivo oscuro</b>	1

### **3. Evaluación de la patogenicidad**

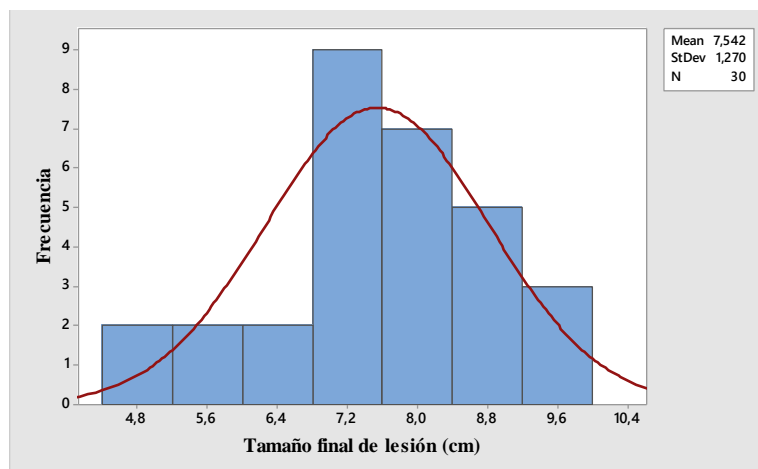
En la evaluación de la patogenicidad, se realizó la medición de tres variables: tamaño final de la lesión ocasionada por el patógeno en los troncos de café, tasa de crecimiento diaria para cada uno de los individuos durante los 15 días de crecimiento en los troncos de café y el Índice de Agresividad donde se incluyen las variables anteriores y valores intrínsecos de cada individuo en su establecimiento.

El tamaño final de la lesión a los 15 días posteriores a la inoculación varía entre los aislamientos, donde se observan tres grupos: el mayor presenta valores entre 9,9-8 cm; los valores de la media se encuentran entre 8,13-7,9 cm y los individuos con menor tamaño se ubican entre los 7,1-4,7 cm. El individuo VC22, correspondiente al Valle Central, presenta el mayor tamaño con un promedio de 9,9 cm con diferencias con el aislamiento LS4 con un menor valor de 4,7 cm. No se mostró una correlación entre el tamaño de la lesión final entre cada uno de los individuos de una misma región (Fig. 17).



**Figura 17.** Tamaño de la lesión (cm) 15 días después de la inoculación en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica; LS: Límites superior, LI: Límite inferior.

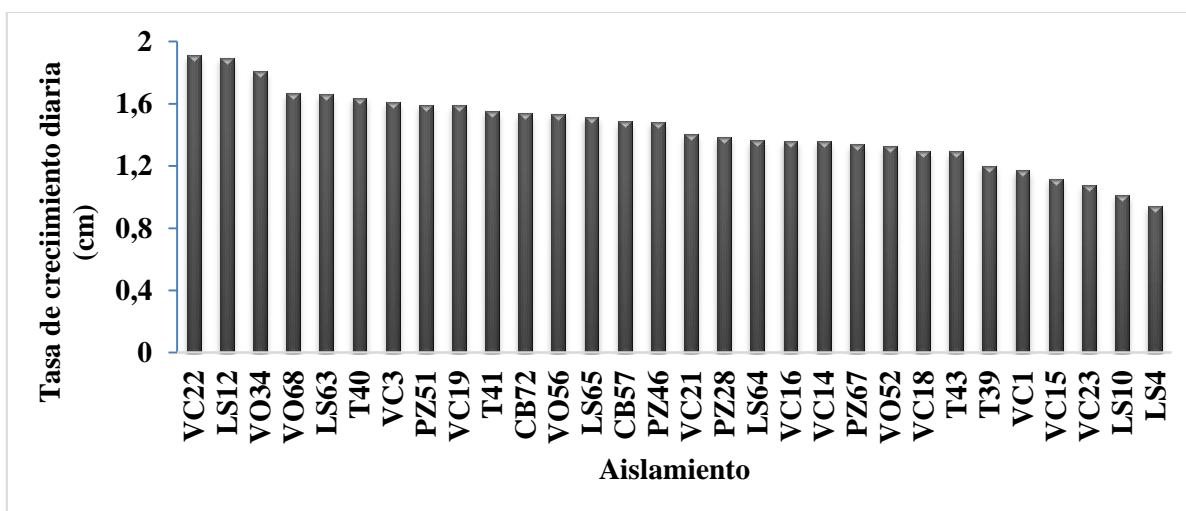
En la figura 18 se muestra como el 20 % presentó valores menores a 6,4 cm, el 70 % de los individuos presenta valores de crecimiento de la lesión entre los 7,2 - 8,8, y únicamente el 10 % presentó los mayores valores de crecimiento final.



**Figura 18.** Frecuencia poblacional para el tamaño (cm) de la lesión final a los 15 días después de la inoculación en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.

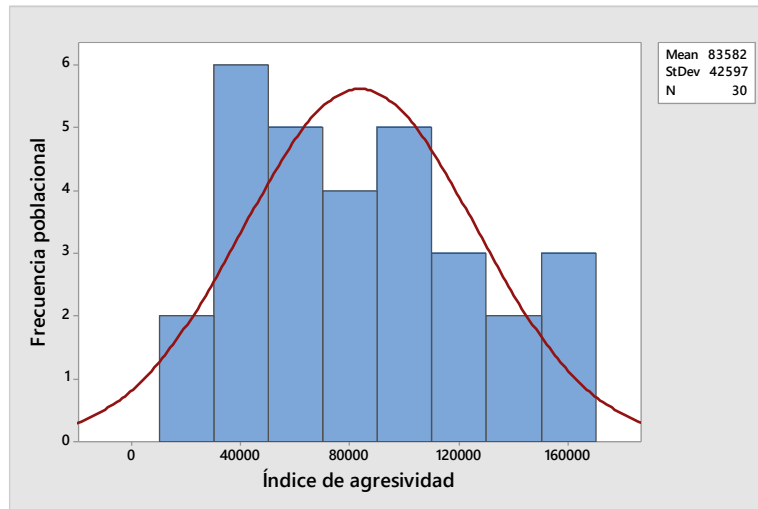


En la figura 19, se observa la tasa de crecimiento diaria para los aislamientos, donde se obtiene que el aislamiento VC22 presenta la mayor tasa de crecimiento diaria de 1,9 cm en relación al aislamiento LS4 con menor crecimiento (0,94 cm). El restante de los aislamientos muestra una tasa de 1-1,8 cm.



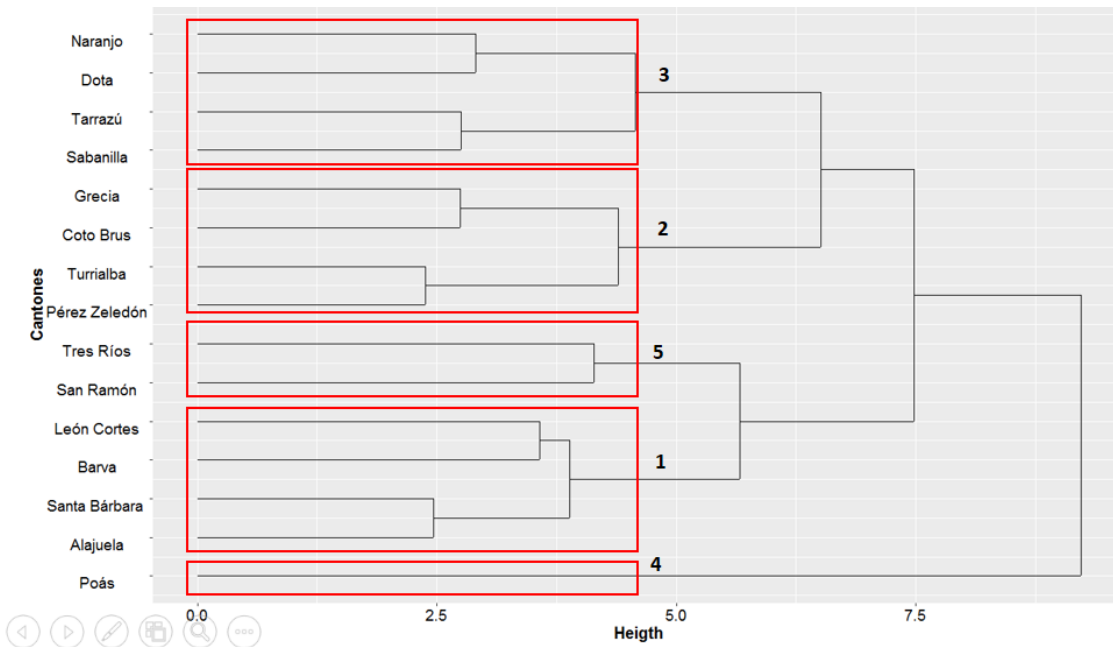
**Figura 19.** Tasa de crecimiento diaria (cm) en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica.

Mediante la implementación del Índice de Agresividad se obtuvo que la frecuencia poblacional del patógeno a nivel de país muestra un comportamiento de una distribución normal donde encontramos individuos en cada uno de los extremos de la campana. De esta forma se obtiene que únicamente el 7 % de los individuos presentan valores bajos de índice menores a 30 000, el 50 % de los individuos presentan un índice moderadamente bajo entre 40 000-100 000, el 33 % muestra valores intermedios con tendencia a ser moderadamente altos entre 100 000 - 140 000 y el 10 % presentan los valores más altos, por encima de los 160 000. Del total de los aislamientos obtenidos en las distintas regiones, los individuos VC22, CB72, T40 y LS63 obtuvieron los mayores valores de índice con 134037, 164030, 165956 y 166362 respectivamente y los aislamientos LS10, VC15 y VC3 con los menores valores de 12218, 27290 y 31062 respectivamente. (Fig. 20).



**Figura 20.** Frecuencia poblacional en una muestra de la población de *C. fimbriata* proveniente de las seis regiones cafetaleras de Costa Rica según Índice de Agresividad.

Considerando las características morfológicas, los resultados en los datos del Índice de Agresividad y las variables climáticas incluyendo lluvia, temperatura y humedad relativa, durante el período de muestreo correspondiente a I y II semestre del 2014-2015 se realizó un agrupamiento (cluster) por cantones para relacionar dichas variables obtenidas en los distintos lugares de muestreo (Fig. 21). De esta forma, se agrupan los aislamientos en 5 clusters: León Cortes, Barva, Santa Bárbara y Alajuela; Grecia, Coto Brus, Turrialba y Pérez Zeledón; Naranjo, Dota, Tarrazú, y Sabanilla (Alajuela); Poás; Tres Ríos y San Ramón.



**Figura 21.** Agrupamiento de los aislamientos de *Ceratocystis* spp. en cantones según variables morfológicas, patogénicas y climáticas (lluvia-temperatura-humedad) correspondientes al I y II semestre año 2014-2015.

En la figura 21 se muestra que el cluster 1 se forma por una relación más directa entre precipitación (mm) - humedad relativa (%) y en menor grado la variable de Índice de Agresividad. En el cluster 2 las variables Índice de Agresividad precipitación y temperatura son los que representan una mayor similitud. Para el cluster 3, se obtiene una relación menos fuerte entre las tres variables; el cluster 4 presenta la misma situación que el cluster 3, con un cambio en la variable humedad relativa donde se muestra una mayor similitud. Y, el cluster 5 presenta una mayor similitud por variables temperatura-Índice con valores menores de cercanía.

Del análisis de las variables morfológicas y de Índice de Agresividad, se realizó la identificación molecular de los aislamientos LS4, T43, LS63, PZ67.

El aislamiento LS4, correspondiente a Santa María de Dota, se localizó a una altura de 1779 m.s.n.m, y presentó los mayores valores para el diámetro del peritecio (297,8  $\mu\text{m}$ ) y tamaño del ostiolo (63,3  $\mu\text{m}$ ), presentó un color olivo amarillo con una distribución de los peritecios en todo el medio y un Índice de Agresividad de 55254 (dentro del 50 % del total de la población) (Fig. 22).

El aislamiento LS63 correspondiente a Santa María de Dota, se localizó a una altura de 1784 m.s.n.m, y presentó uno de los mayores valores para la base del peritecio (56,4  $\mu\text{m}$ ) y uno de los menores para el tamaño del cuello del peritecio (435  $\mu\text{m}$ ), presenta un color olivo pálido con una distribución de los peritecios en forma de anillos concéntricos y el mayor Índice de Agresividad con 166 362 (dentro del 10 % del total de la población) (Fig. 23).

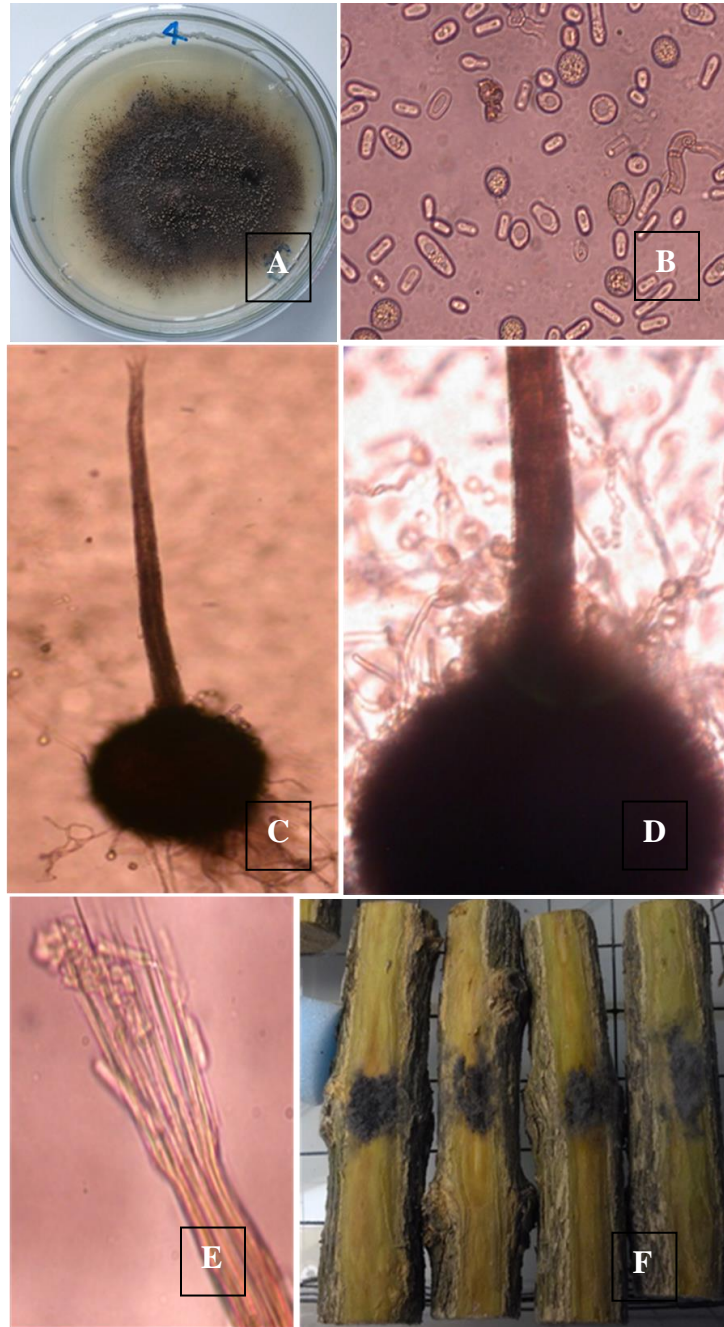
El aislamiento T43 correspondiente a Santa Cruz de Turrialba, se localizó a una altura de 1188 m.s.n.m, y presentó uno de los mayores valores para la base del peritecio (59,1  $\mu\text{m}$ ) y uno de los menores para el tamaño del ostiolo (33,6  $\mu\text{m}$ ), presentó un color amarillo con una distribución de los peritecios en todo el medio y un Índice de Agresividad de 113326 (dentro del 33 % del total de la población) (Fig. 24).

El aislamiento PZ67 correspondiente a Cajón de Pérez Zeledón, se localizó a una altura de 630 m.s.n.m, y presentó uno de los mayores valores para la base del peritecio (56,9  $\mu\text{m}$ ) y uno de los menores para el tamaño del cuello del peritecio (469,4  $\mu\text{m}$ ) y tamaño del ostiolo (32,8  $\mu\text{m}$ ), presentó un color marrón con una distribución de los peritecios en todo el medio de cultivo con un Índice de Agresividad de 80 066 (dentro del 50 % del total de la población) (Fig. 25).

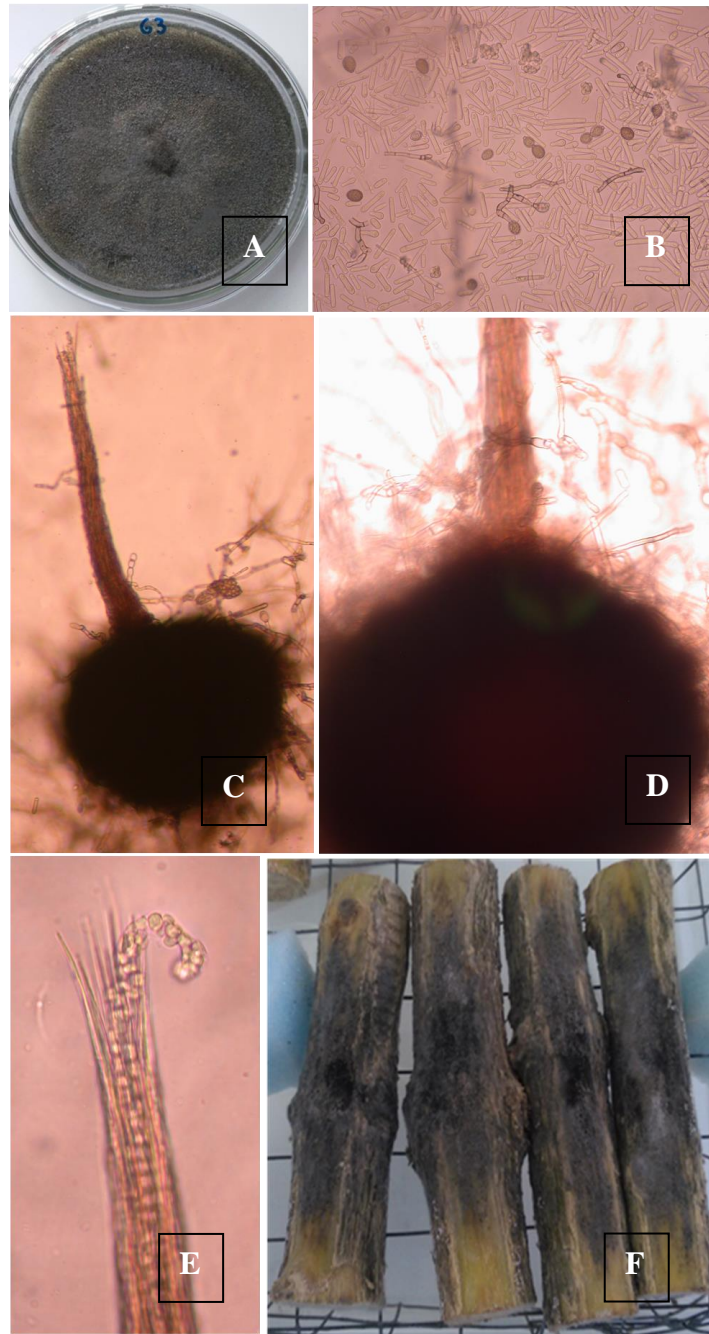
De esta forma, en el cuadro 5 se muestra un resumen de las variables morfológicas y de agresividad por las cuales fueron selecciones dichos aislamientos para la identificación molecular.

**Cuadro 5.** Aislamientos de *Ceratocystis* spp. de las regiones cafetaleras de Costa Rica y sus variables morfológicas y patogénicas determinadas para la selección en las pruebas de identificación molecular

Aislamiento	Región	Cantón/	Altura (m.snn.m)	Variable de selección						
				Diámetro del peritecio (µm)	Base del peritecio (µm)	Cuello del peritecio (µm)	Tamaño del ostiolo (µm)	Color micelio	Distribución de peritecios en PDA	Índice de agresividad
LS4	Los Santos	Santa María	1779	297,8	-	-	63,3	Olivo amarillo	Todo el medio	55 254 moderadamente bajo
LS63	Los Santos	Santa María	1784	-	56,4	435	-	Olivo pálido	Anillos concéntricos	166362 alto
T43	Turrialba	Santa Cruz	1188	-	59,1	-	33,6	Amarillo	Todo el medio	113326 moderadamente alto
PZ67	Pérez Zeledón	Cajón	630	-	56,9	469,4	32,8	Marrón	Todo el medio	80066 moderadamente bajo

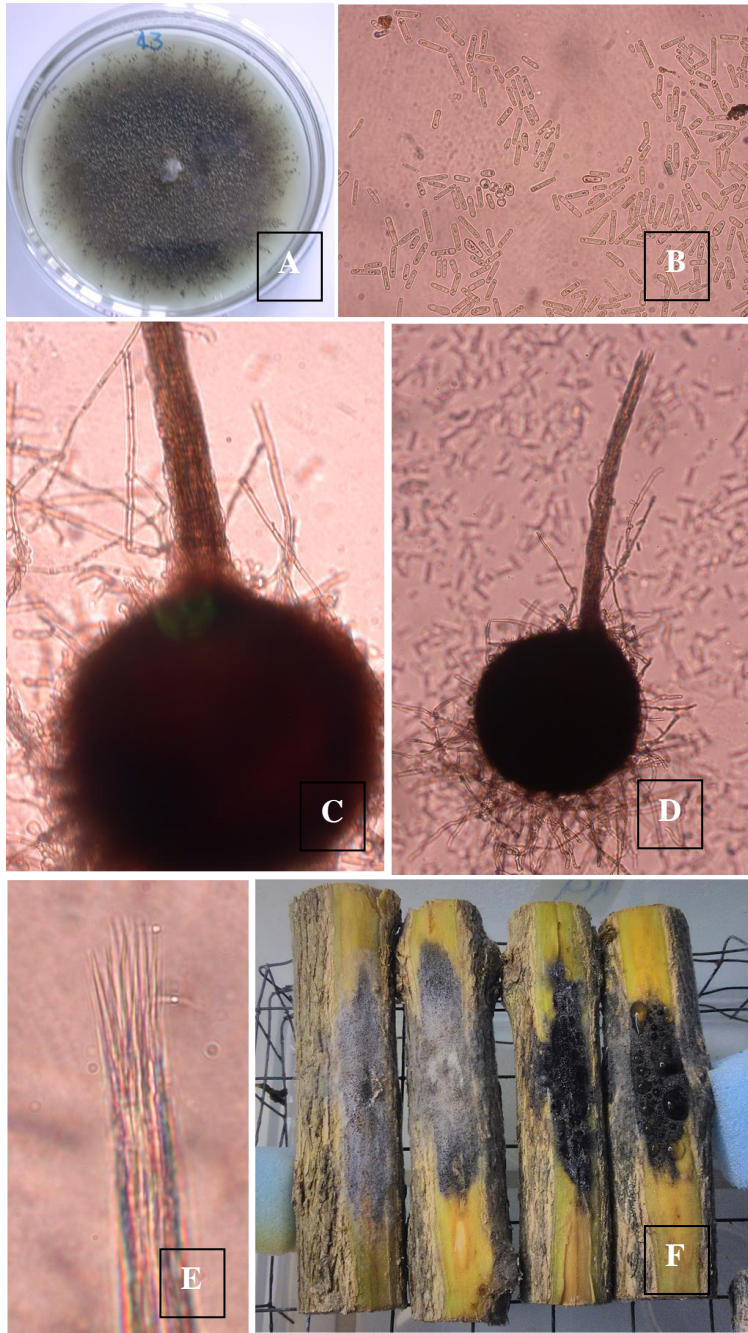


**Figura 22.** Características morfológicas del aislamiento LS4; crecimiento en medio nutritivo (A); ascosporas, conidias y clamidiósporas cilíndricas (B); peritecio (C), base del peritecio (D), hifas ostiolar divergentes con salida de ascosporas (E), tamaño de lesión final promedio (H).



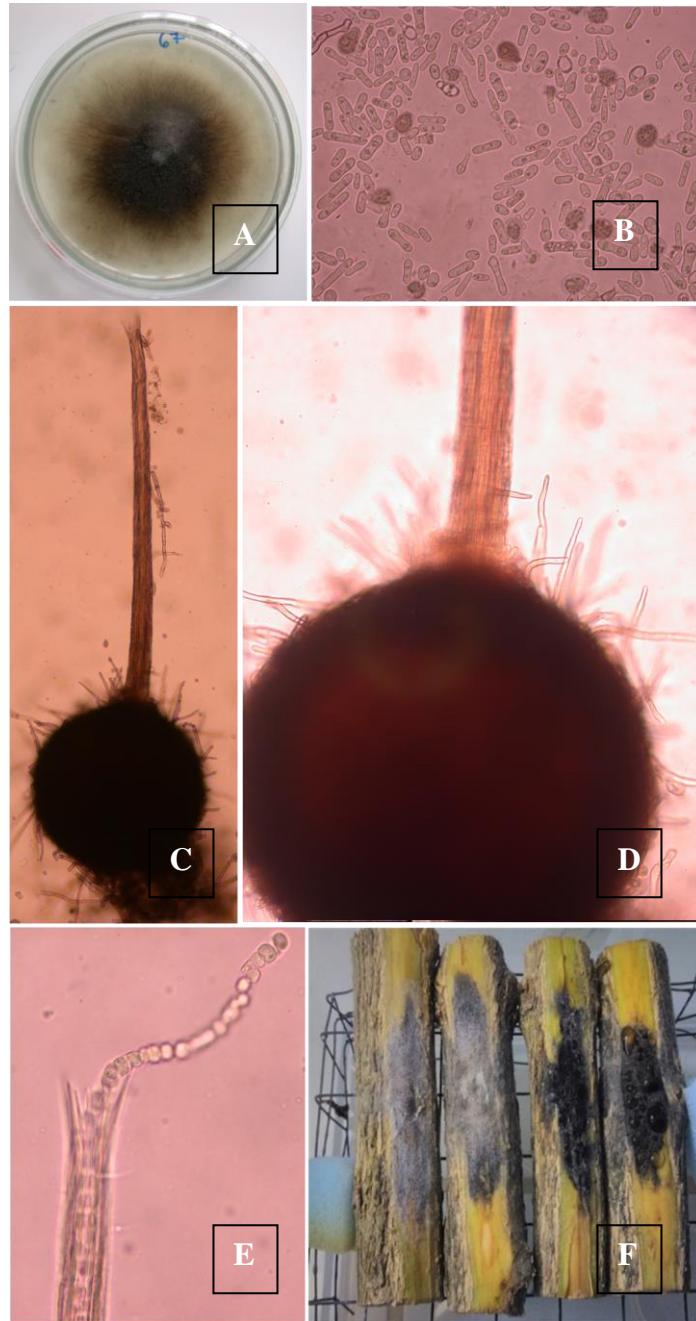
**Figura 23.** Características morfológicas del aislamiento LS63; crecimiento en medio nutritivo (A); ascosporas, conidias y clamidiósporas cilíndricas (B); peritecio (C), base del peritecio (D), hifas ostiolar divergentes con salida de ascosporas (E), tamaño de lesión final promedio (H).





**Figura 24.** Características morfológicas del aislamiento T43; crecimiento en medio nutritivo (A); ascosporas, conidias y clamidiósporas cilíndricas (B); base del peritecio (C), peritecio (D), hifas ostiolar divergentes (E), tamaño de lesión final promedio (H).



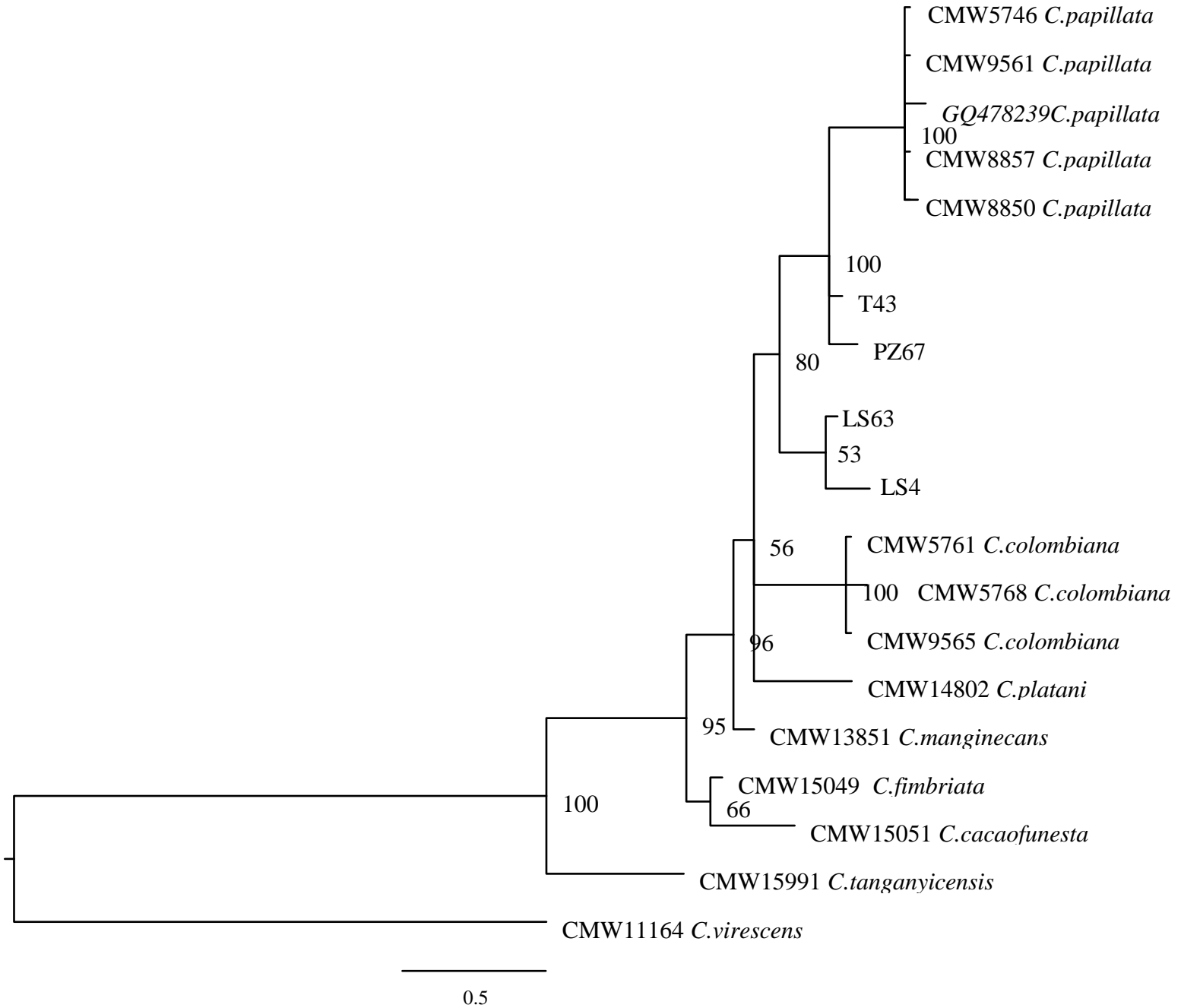


**Figura 25.** Características morfológicas del aislamiento PZ67; crecimiento en medio nutritivo (A); ascosporas, conidias y clamidiósporas cilíndricas (B); base del peritecio (C), peritecio (D), hifas ostiolar divergentes con salida de ascosporas (E), tamaño de lesión final promedio (H).

#### 4. Identificación molecular

Se obtuvo amplificación de ~ 500 pb para la región ITS y la  $\beta$ - tubulina y ~ 800 pb para el Factor de Elongación 1- $\alpha$ . Para desarrollar el árbol filogenético se utilizaron secuencias de aislamientos de *C. fimbriata*, *C. papillata*, *C. colombiana*, *C. platani*, *C. manginecans*, *C. cacaofunesta*, *C. tanganyicensis* y *C. virescens* como especie más lejana (Anexo 4).

Se mostraron polimorfismos entre los aislamientos de *Ceratocystis* spp. obtenidos de plantas enfermas de café en las distintas regiones cafetaleras de Costa Rica. Los aislamientos LS63 y LS4 muestran valores de bootstrap entre ellos de 53 separándose de los aislamientos T43 y PZ67 con un valor de 80. Los aislamientos T43 y PZ67 muestran valores de bootstrap de 100 con la especie *C. papillata*, no obstante, los agrupa se agrupan en ramas distintas.



**Figura 26.** Árbol filogenético de consenso basado en los criterios de análisis Bayesiano que ilustra la relación de los aislamientos de *Ceratocystis* spp. asociados a la “Llaga macana” en café de Costa Rica y demás especies de *Ceratocystis* spp encontrados en café, cacao, cítricos en Colombia. El árbol se generó mediante la combinación de secuencias provenientes de las regiones ITS, *B*-tubulina y el Factor de Elongación 1- $\alpha$ .

# DISCUSIÓN

## 1. Muestreo

En cada una de las regiones cafetaleras se realizó una verificación visual de fincas con síntomas a nivel de planta de la presencia de patógeno *Ceratocystis* sp. Los síntomas a nivel de planta fueron clorosis y marchitamiento generalizado, síntomas similares a los provocados por el complejo de llagas de cafeto donde se incluyen a los patógenos *Rosellinia bunodes* y *R. pepo*. (Bianchini, 1955; Castro-Caicedo, 1999) y demás patógenos de suelo como *Fusarium* spp. (en mayor frecuencia) y *Nectria* sp. Lo anterior y la confusión en la de visualización de lesiones ocasionadas por *Ceratocystis* spp. dificultó la localización de muestras positivas. Debido a lo anterior, se analizaron un total de 74 muestras (entre 6-10 muestras por región cafetalera), de las cuales únicamente 30 fueron positivas (Cuadro 1).

Plantas con la presencia de *Ceratocystis* spp. se presentan en fincas donde existían problemas con prácticas culturales o en podas bajas. Waller et al. 2007 hacen mención que la mayor incidencia se da en plantas de café viejas o de más de tres años, lo que concuerda con el muestreo ya que en su mayoría eran plantaciones viejas (más de 10 años) y en podas bajas; lo anterior recalca que las primeras prácticas culturales o inadecuados manejos son los principales causantes de la entrada del patógeno al hospedero. De esta forma, se encontró en plantas aisladas, en plantas con poda reciente o en parches en donde existe daño del tallo por cuchillo o motoguadaña (Fig. 27).



**Figura 27.** Muestreo de plantas con presencia de *Ceratocystis* sp., plantas enfermas de forma aislada (A), en podas (B) y en parches (C).

Debido a que la principal causa de entrada de *Ceratocystis* spp. a la planta es mediante heridas, unas de las principales características para poder reconocer la presencia de la enfermedad es verificar, a nivel de tallo (en los primeros 20 cm de la base en contacto con el suelo), la presencia de una herida y realizar un raspado de la corteza en dicha área, de esta forma se puede observar la presencia de una lesión marrón grisácea irregular como lo muestra la figura 28.



**Figura 28.** Lesión irregular marrón- grisácea en tronco característica de *C. fimbriata*, Costa Rica, 2015-2016.

Existen regiones donde *Ceratocystis* spp., presenta una mayor incidencia, como en el Valle Central con 9 aislamientos, seguido por Los Santos con 6, Pérez Zeledón con 5, Turrialba con 4, Valle Occidental con 4 y Coto Brus con 2 (Cuadro 3). Los aislamientos del Valle Central corresponden a los cantones de Sabanilla, Poás, Alajuela, Barva, Santa Bárbara y Tres Ríos con alturas entre los 1249 m.s.n.m y 1552 m.s.n.m. En el caso de la región de los Santos, corresponden a los cantones de Santa María de Dota, Tarrazú y León Cortés con alturas entre los 1451 m.s.n.m y 1875 m.s.n.m. En Pérez Zeledón, las muestras positivas fueron de los distritos de San Pedro, General Viejo y Cajón con alturas entre los 585 m.s.n.m y 673 m.s.n.m. En el cantón de Turrialba, se obtuvieron muestras de los distritos de Dulce Nombre, Santa Rosa y San Cruz con alturas entre los 951 y 1188 m.s.n.m. En el Valle Occidental se localizó el patógeno en los cantones de Naranjo, San Ramón y Grecia en los 1219 m.s.n.m y 1474 m.s.n.m. Y, por último, en Coto Brus, se obtuvieron en los cantones de San Vito y Sabalito con altura de 998 m.s.n.m y 1132 m.s.n.m.

Castro -Caicedo (1999) hace referencia a la presencia del patógeno en los diversos suelos de área tropicales y zonas templadas en el mundo en altitudes que abarcan entre los 800 m.s.n.m y 2 000 m.s.n.m., sin embargo, en este estudio se determinó su presencia en alturas mínimas de 585 m.s.n.m y máximas de 1875 m.s.n.m.

Además, las regiones donde se presentó el patógeno, muestran características de suelos distintos. Considerando en macro los órdenes de suelo, encontramos que la región de muestreo del Coto Brus y el Valle Central pertenecen al orden de los Andisoles (suelos de origen volcánico); la región de Los Santos, Pérez Zeledón y Valle Occidental pertenecen al orden de los Ultisoles (suelos más viejos y meteorizados del país) y los suelos del orden Inceptisoles de la región de Turrialba (Mata, 1991; Bertsch, 1995). De esta forma, se recalca que *Ceratocystis* spp. no muestra una especialización por un tipo específico de suelo, siendo capaz de permanecer en suelos poco nutritivos, baja materia orgánica y con características de compactación. Es importante considerar que *Ceratocystis* spp. penetra exclusivamente por heridas, por lo tanto, la mayor incidencia de la enfermedad en la Región del Valle Occidental va dirigida principalmente a problemas en las prácticas culturales realizadas en plantaciones, en su mayoría viejas (mayores a los 20 años),

llevando esto a un mayor número de podas, deshieras y deshijas, favoreciendo el ataque del patógeno.

## 2. Morfología

Desde 1967, Webster y Butler reconocen que existe variabilidad entre aislamientos de *C. fimbriata s.l.* Estos autores mencionan que desde este año existían diferencias en el tipo de colonia, patogenicidad y tasa de crecimiento de distintos aislamientos, aun así, mantenían las características de crecimiento, morfología del peritecio y el comportamiento sexual semejantes. Sin embargo, muestran la inquietud de que el amplio rango de hospederos, regiones geográficas y diferencias en la morfología representan indicios de una fuerte variabilidad de la especie, reconociendo a *C. fimbriata s.l.* como un complejo de especies crípticas. Muchas de las nuevas especies existentes por muchas décadas formaron parte del complejo de especies crípticas y en los últimos años con la implementación de nuevas herramientas se les reconoció como distintas (Johnson et al. 2005; Engelbrecht y Harrington 2005; Van Wyk et al. 2010).

Pérez (2009) hace referencia que la clasificación de especies dentro de un complejo (por ejemplo, el complejo *C. coerulescens*) se requieren comparaciones entre las secuencias ITS, isoenzimas, morfología y el hospedante al cual ataca. De esta forma, se requiere aunar en todas estas variables para determinar la variabilidad existente, ya que una sola variable puede ser insuficiente dentro de un grupo tan poco variable.

La identificación a nivel morfológico representa la base para la diferenciación e identificación de nuevas especies en diversos estudios taxonómicos sobre la diversidad de los hongos existentes. Por ejemplo, las especies *Ophiostoma europioides* (E.F. Wright y Cain) y *O. huntii* (Rob-Jeff) fueron determinadas como especies distintas mediante estudios morfológicos, encontrando diferencias en ascosporas y dimensiones de los peritecios, esto demostró la importancia de la evaluación de dichas variables en los estudios taxonómicos (Jacobs et al. 1998). Barnes et al. (2003) hacen mención de la presencia de una nueva

especie presente en *Eucalyptus nitens* en Australia conocida como *C. pirilliformis*. Esta especie presenta tamaño de peritecios, ascosporas y conidios semejantes a los observados en *C. fimbriata* y *C. albofundus*, especies encontradas en *Eucalyptus nitens*. No obstante, existen diferencias importantes que las dividen. En este caso *C. albofundus* posee color claro, hifas ostiolares divergentes y carecen de clamidiósporas; *C. pirilliformis* y *C. fimbriata* son muy semejantes entre sí, con la única diferencia en la forma de las bases de los peritecios. *C. fimbriata* posee bases globosas y las *C. pirilliformis* son piriliformes, además, las colonias de estas tres especies difieren entre ellos: en *C. albofundus* son pálidas, en *C. fimbriata* varía entre verduzco a marrón y en *C. pirilliformis* las colonias se forman con un micelio aéreo grisáceo y en el centro verduzco, después de cierto tiempo.

*Ceratocystis fimbriata*, agente causal de la enfermedad conocida como “mal de machete” presenta variables morfológicas características de dicho género (Barker y Thomas, 2001; Lui et al. 2015). Crece en medio de cultivo PDA, desarrolla un micelio hialino que con el posterior desarrollo se torna marrón verdoso oscuro. Además, especies de ese grupo presentan formas morfológicas “chalara” (Hunt, 1956) o más recientemente “thielaviopsis” (Paulin-Mahady et al. 2002) los cuales desarrollan células conidiógenas tubulares simples que se estrechan hacia sus ápices y producen cadenas de conidios rectangulares o conidios secundarios con forma de barril y pueden tener tamaños entre los 11-16  $\mu\text{m}$  de largo por 4-5  $\mu\text{m}$  de ancho. Los conidióforos especializados forman clamidiósporas de paredes gruesas consideradas como las estructuras de resistencia de *Ceratocystis*. Estas presentan tamaños entre 9-16  $\mu\text{m}$  de largo y 6-13  $\mu\text{m}$  de ancho (CABI, 2017).

La morfología en el género *Ceratocystis* se caracteriza, además, por la presencia de ascomatas color marrón oscuro a negro (cuerpos frutíferos, peritecios), los cuales poseen bases redondeadas con tamaños entre los 130-200  $\mu\text{m}$ . Dichas bases forman cuellos largos y delgados hasta los 800  $\mu\text{m}$  de largo con terminación en hifas ostiolares (8-15) que varían entre los 50 – 90  $\mu\text{m}$  por donde se da la exudación de masas de ascosporas pegajosas hialinas y de forma de sombrero con tamaños entre 4.5-8  $\mu\text{m}$  de largo por 2.5-5.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Las ascosporas pueden tener formas redondeadas, en forma de sombrero, ovoides y elipsoides. Existen especies que forman clamidiósporas simples, las cuales permiten la



permanencia en los suelos como estructuras de resistencia (Jacobs *et al.*, 1998; De Beer *et al.*, 2014; CABI, 2017; Pérez, 2009; Lui *et al.* 2015).

Marín *et al.* (2003) realizan una primera investigación donde aislan a *Ceratocystis fimbriata* de 50 muestras de suelos infectados y plantas con síntomas en 11 provincias de Colombia para realizar una caracterización morfológica y patogénica con el fin de obtener una base en el desarrollo de variedades de café resistentes. En los resultados en morfología se determina que presentan las características típicas descritas para *C. fimbriata* (Webster y Butler, 1967), no obstante, mencionan que se obtiene una mayor diversidad morfológica, pero no tiene la capacidad de realizar agrupaciones con estas variables. La mayoría de aislamientos, un total de 35, mostraron colonias verde olivo, 22 aislamientos se presentaron en anillos concéntricos, 14 en grupos centrales y 14 en todo el medio. 18 de los aislamientos de *Ceratocystis* en café de Costa Rica muestra en su mayoría colonias de color olivo con una distribución distinta, donde 57 % se ubican en todo el medio, el 40 % forman anillos concéntricos y únicamente el 1% muestra un grupo central.

Van Wyk *et al.* (2010), continuando con el trabajo de Marín *et al.* (2003), realizó un estudio morfológico y molecular de estos aislamientos, donde encontró diferencias morfológicas específicas permitiendo la separación de dos nuevas especies del complejo *C. fimbriata* s.l.: *Ceratocystis papillata* y *Ceratocystis colombiana*, especies nuevas reconocidas como patógenos en el cultivo del café. Ambas especies presentan diferencias en la temperatura óptima de crecimiento, *C. papillata* presenta bases de peritecios con ápices papilares a diferencia de las bases globosas de *C. colombiana*; *C. papillata* muestra hifas ostiolares más grandes y sus conidios en forma de barril son más pequeños. La diferencia más considerable entre *C. papillata* y el complejo *C. fimbriata* s.l. es la característica de la morfología “cap-like” en las bases del cuello del peritecio. Estas presentan cuellos e hifas ostiolares más largas. Las características morfológicas como la base de los cuellos, presencia de conidióforos primarios –secundarios y tamaño del cuello de los peritecios de *C. papillata* presenta similitudes y diferencias que los separara de otras especies como *C. caryae*, *C. smalleyi*, *C. variospora* y *C. populicola*. En el caso de *C. colombiana*, presenta

conidióforos y conidios secundarios que no presenta *C. fimbriata* s.s., además, las bases de los peritecios y los cuellos de *C. colombiana* son más pequeños.

Los individuos de *Ceratocystis* spp. en Costa Rica presentan una morfología característica del complejo *C. fimbriata* s.l. Además, los valores obtenidos para las variables tamaños de las ascosporas y conidias concuerdan con las especies *C. papillata* y *C. colombiana*. No obstante, sí se observan diferencias en otras características como se observa en el cuadro 6. Para el tamaño de las clamidósporas, se muestra más similitud con *C. papillata* como por ejemplo, en el tamaño máximo de las clamidósporas con 16,53  $\mu\text{m}$ ; para el tamaño de diámetro del peritecio, la población de *Ceratocystis* en Costa Rica presenta más similitud con las especies *C. colombiana* con valores mayores de diámetro que los obtenidos por *C. papillata*; en cuanto a la base del peritecio, se muestra una mayor relación con la especie *C. papillata*, mostrando valores más cercanos a su máximo tamaño, pero con mediciones mayores que este individuo (70  $\mu\text{m}$  máximo valor). Aunque existe similitudes morfológicas, *Ceratocystis* spp. no presenta la característica de presencia de ápices papilares de *C. papillata*. Para el caso del tamaño del cuello de los peritecios de la especie *C. papillata* muestra una mayor similitud que los del presente estudio y, con respecto al tamaño del ostiolo, se presenta una mayor similitud con esta misma especie de origen colombiano (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Aislamientos de *Ceratocystis* spp. de las regiones cafetaleras de Costa Rica, especie *C. papillata* y *C. colombiana* y la medición de sus variables morfológicas comparativas

Especie	Tamaño (µm)						
	Áscosporas	Conidias	Clamidiósporas	Diámetro peritecio	Base del peritecio	Cuello del peritecio	Ostiolo
<i>Ceratocystis fimbriata</i> s.l <sup>1</sup>	4.5-8	11-16	9-16	130-200	No reportado	hasta los 800	50-90
<i>Ceratocystis colombiana</i> <sup>2</sup>	3-7	12-29	11-14	140-294	24-43	375-676	28-52
<i>Ceratocystis papillata</i> <sup>2</sup>	3-6	17-29	10-16	169-258	30-58	472-753	44-78
<i>Ceratocystis</i> spp. (Costa Rica) <sup>3</sup>	5-6.9	20-29	13-16	147-294	34-72	307-717	24-63

1. CABI, 2017
2. Van Wyk et al. 2010
3. Presente estudio

Con los anteriores resultados, podemos concluir, que los tamaños encontrados en las características morfológicas muestran semejanzas a las nuevas especies encontradas en plantas enfermas de café de Colombia. No obstante, existen diferencias entre ellos por lo que se requiere visualizar el resultado en el análisis molecular (ver punto 4 de resultados).

### 3. Agresividad

La agresividad de un patógeno, es considerada como el componente cuantitativo de la patogenicidad. Pariaud et al. 2009 hacen referencia que las selecciones por la agresividad, pueden validarse con parámetros climáticos y que los cambios poblaciones o en las estructuras sexuales o asexuales pueden explicar la variación en agresividad y que esta agresividad puede favorecer a la especificidad en el ataque a un hospedero específico en la región donde se establezca. Dichos autores hacen referencia al efecto directo de factores climáticos en los procesos de infección, no obstante, el género *Ceratocystis* presenta

estructuras de resistencia (clamidósporas) las cuales permiten el establecimiento en suelo por largos periodos aún en condiciones climáticas desfavorables. Además, Pariaud et al. 2009 mencionan que la variación dentro de una población en la agresividad es parte fundamental en el proceso de adaptación, por lo cual, se hace referencia a la importancia del estudio de los patotipos individuales y no considerar toda la población como iguales.

Barnes et al. 2001 mencionan que, en ensayos de patogenicidad, existen aislamientos de *Ceratocystis* que pueden llegar a ser específicos de un huésped. Al realizar inoculaciones en plantas de papa, café y cacao con un aislamiento considerado como *C. fimbriata* aislado de pimiento no se presentó indicios de infección. Pontis (1951) encontró que al inocular café con aislamientos de *Ceratocystis* obtenidos de plantas de cafeto y de papa, únicamente el aislamiento obtenido de plantas de caféto logró provocar infección.

Hamid et al. (1982) encontraron diferencias considerables en la eficacia de infección, la longitud de la lesión y la capacidad de esporulación del ascomicete *Cochliobolus carbonum* que afecta sorgo, con diferencias del 91 % entre el menos y el más agresivo. Milus et al. (2006), en un estudio realizado en los Estados Unidos, encontró que dos aislamientos de *Puccinia striiformis* f., mostraron diferencias en la temperatura óptima de crecimiento: uno a 12 °C y otro a 18 °C. Carlisle et al. (2002) encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento de la lesión, período de latencia, tasa de esporulación y capacidad de infección de 17 aislamientos de *Phytophthora infestans* en Irlanda del Norte; aún con estas diferencias en la patogenicidad, estos individuos comparten un genotipo multilocus idéntico, presentan sensibilidad al mismo fungicida y pueden superar el gen de resistencia R1 (similares genéticamente).

Las especies *C. papillata* y *C. colombiana* aisladas de plantas de café, cacao y cítricos, en donde se inocularon todos los aislamientos entre los distintos huéspedes, se obtuvo que todos son patogénicos, aún en los huéspedes de los que no fueron aislados. En conclusión, no se observa una especificidad de ninguna de estas dos especies de *Ceratocystis spp.* Van Wyk y colaboradores en trabajos realizados en los años 2009 y 2010 concluyen que existen especies dentro del complejo de *Ceratocystis* con distintos tipos de hospederos, ejemplo de

esta inespecífica relación es *C. albifundus*, el cual se ha aislado de nueve distintos hospederos. Caso semejante ocurre con las especies *C. atrox*, *C. pirilliformis*, *C. negleta* y la más reciente descubierta de estas, *C. fimbriatoma*, especies encontradas en árboles de *Eucalyptus*.

Sin embargo, Van Wyk et al. 2010 también mencionan que el complejo de *C. fimbriata* s.l., se conocen especies que presentan alta especificidad a sus huéspedes. Pérez (2009) y Johnson et al. 2005 mencionan que la patogenicidad de *C. platani* (causante del cancro en *Platanus* spp.) y *C. cacaofunesta* (causante del marchitamiento vascular en cacao) difiere de *C. fimbriata*.

Ferreira et al. (2010) mencionan, que la población de estudio *Ceratocystis* en Brasil, no presentan sólo diferencias por las regiones geográficas, sino además, en la agresividad mostrada en los diferentes hospederos exóticos en los que logran ser patogénico.

Por tanto, dentro del complejo de *C. fimbriata* s.l. existen diferencias en la patogenicidad, morfología, tipos de hospederos y regiones geográficas (Webster y Butler, 1967; Barnes et al. 2001). Esto sucede con los aislamientos de *Ceratocystis* spp. en el cafeto de Costa Rica, que muestran esa variabilidad en su morfología y patogenicidad, dando como resultado una población muy diversa ya que, aunque al área cafetalera es pequeña en comparación con países como Colombia y Brasil, se presenta una alta diversidad agroecológica tanto en condiciones climáticas, suelos, alturas y edades de los cultivos.

Los resultados de la tasa de crecimiento diaria varía entre los aislamientos de *Ceratocystis* spp. en el cafeto de Costa Rica, no obstante, presentan relación con los datos de crecimiento final de la lesión. Estos aislamientos no presenta una relación entre agresividad y cada una de las regiones de muestreo, ejemplo de esto lo muestra que el aislamiento más agresivo LS63 perteneciente a Santa María de Dota, ubicado a una altura de 1784 m.s.n.m y uno de los aislamiento menos agresivos correspondiente a LS4, localizado a una altura de 1779 m.s.n.m, comparten las mismas características de la región, condiciones climáticas semejantes, con la única diferencia que son aislamientos de fincas distintas, con posibles diferencias en el manejo de la plantación. Todos los aislamientos fueron capaces de infectar

nuevamente al mismo hospedero con distinta tasa de crecimiento e índice de agresividad, donde, un porcentaje considerable de la población (10 %) presentó valores altos de Índice ( $\geq 160\ 000$ ). Marín et al (2003) hace mención que la variabilidad en la patogenicidad mostrada por *Ceratocystis* en Colombia, puede deberse a una alta variabilidad genética y un endemismo del hongo en la región de muestreo, además, la presencia de otros tipos de posibles huéspedes del patógeno como es el caso de cacao o cítricos en asocio con el cultivo de café puede favorecer nuevas fuentes de virulencia del patógeno como resultado de las distintas interacciones huésped-patógeno. No obstante, en los lugares de muestreo, no se observaba el asocio con especies de cacao y cítricos, sin embargo, es difícil predecir si en algún momento existió este asocio y el tipo de uso del suelo antes de cultivar café.

De esta forma, considerando la agresividad y factores climáticos (precipitación, humedad relativa y temperatura), los aislamientos correspondientes a los cantones de Grecia, Coto Brus, Turrialba y Pérez Zeledón muestran similitudes importantes para las variables de Índice Agresividad, precipitación y humedad relativa. Para los demás cantones, se muestra relaciones con variables climáticas, no así con el Índice de Agresividad; lo anterior muestra, que para este patógeno, las diversas condiciones climáticas de las regiones cafetaleras no interfieren en la capacidad infectiva, por lo que lo más importante es evitar heridas a nivel de troncos.

Los individuos con mayor capacidad de agresividad, poseen una ventaja evolutiva en los patosistemas (Pariaud et al. 2009), de esta forma, es importante reconocer el comportamiento de estos individuos, los cuales, tiene que ser la base en los estudios de combate químico, biológico y no menos importante en la búsqueda de materiales con resistencia o tolerancia a dichas enfermedades (Van Wyk et al. 2009). Y como recomendaciones, evitar trasladar el patógeno de la zona más agresiva, a zonas donde el patógeno es menos virulento (Marín et al. 2003).

#### 4. Identificación molecular

Barnes et al. (2001) mencionan que las características morfológicas y patogénicas son de suma importancia en los estudios de identificación de especies, sin embargo, hace hincapié en la necesidad de implementar las técnicas moleculares con el conocimiento existente en las huellas de ADN en poblaciones de hongos. Dichos autores mencionan en su estudio, que los resultados obtenidos con el uso de algunos microsatélites en la identificación del género *Ceratocystis*, podrían estar subestimando la diversidad genética mostrada.

De esta forma Van Wyk et al. (2007a) hacen mención que la variabilidad en los aislamientos de *C. fimbriata*, la amplia gama de hospederos y la extensa distribución geográfica, hacen concluir que dicho patógeno puede representar un complejo de especies. Los estudios basados en técnicas de ADN han representado una herramienta para la distinción de taxones en las distintas especies de hongos. El análisis multigenes representa una herramienta útil para la distinción entre complejos de especies como *Colletotrichum*, *Diplodia* y *Lasiodiplodia*, *Fusarium*, *Mycosphaerella*, *Phomopsis* y *Ceratocystis* (Van Wyk et al., 2010).

Ferreira et al. (2010) concluyen, en un estudio realizado sobre la diversidad y variabilidad entre poblaciones de *Ceratocystis fimbriata* en Brasil, la dificultad de distinguir aislamientos de *C. fimbriata sensu stricto*, y que mediante la utilización de microsatélites específicos, se logró diferenciar a *C. platani* y *C. cacaofunesta* de *C. fimbriata*. Estos autores concluyen que, aislamientos de una misma región pueden presentar diferencias dentro de las mismas poblaciones, por la localización geográfica y por el tipo de hospedero, resultados que podrían relacionarse a las población de aislamientos de *Ceratocystis* spp. encontradas en plantas de café de Costa Rica.

Pérez et al. (2011) aseguran que las secuencias de *Ceratocystis* de las regiones ITS de los genes rADN han sido utilizadas desde hace algunos años en la determinación de las relaciones filogenéticas entre los hongos ophiostomatoides (incluye a *Ceratocystis fimbriata sensu lato*), herramienta que presenta una mayor ventaja considerando que las

características morfológicas son muy semejantes. De esta forma, mencionan que con base en sus características morfológicas, *Ophostoma rigrocorpum* es similar al complejo de *O. stenoceras*, no obstante, en comparaciones de las secuencias de ADN se muestran ciertas diferencias.

Morris et al. (1993), en uno de los primeros trabajos con la utilización de técnicas moleculares, hace la descripción de que el hongo que provocaba la marchitez en *Acacia mearnsii* en el Sur de África, reconocida inicialmente como *C. fimbriata*, pertenecía a un taxón distinto al cual se le conoció como *C. albifunus*, iniciando el estudio de la amplia variabilidad presentada por aislamientos de *C. fimbriata*.

Barnes et al. (2003), con los resultados en diferencias morfológicas previas, realizaron un análisis molecular utilizando las regiones ITS1, 5.8 S y la ITS2 dando como resultado la separación entre las especies *C. fimbriata*, *C. albofundus* y *C. pirilliformis*.

Van Wyk et al. (2007a) utilizaron los primers ITS,  $\beta$ -tubulina y EF-1 $\alpha$  para la identificación de 43 aislamientos de *Ceratocystis* spp. obtenidos de mango (*Mangifera indica*) en Oman y Pakistan; el patógeno que afectaba este cultivo era conocido como *C. fimbriata*, ya que sus características morfológicas eran muy similares a las descritas para dicho patógeno (considerando que pertenecían al mismo taxón en el pasado), sin embargo, con dichos resultados se obtuvo que la especie presente era *C. manginecans* (bootstrap = 88%), patógeno virulento, con capacidad de matar rápidamente los árboles de mango. Además, se concluyó que el aislamiento obtenido de mango en Brasil se separaba de dicho grupo de aislamientos (bootstrap = 66%), los cuales requerían más estudio para verificar su separación.

Van Wyk et al. (2009) determinaron, mediante la utilización de los primers ITS,  $\beta$ -tubulin y EF 1-  $\alpha$ , que existía una nueva especie de *Ceratocystis* presente en árboles de *Eucalyptus* en Venezuela: *C. fimbriatomina* (bootstrap = 100).

Para la diferenciación de *C. cacaofunesta* de *C. fimbriata* se determinaron variables morfológicas, patogenicidad hacia dicho hospedero y la identificación molecular utilizando el factor de transcripción (ITS)-rADN (Engelbrecht et al. 2007). Lo anterior con la



finalidad de incursionar en la búsqueda de materiales resistentes hacia dicha enfermedad la cual en los últimos años, ha reemergido debido al sistema de reproducción por esquejes de este cultivo.

En Colombia, mediante la implementación de dicha herramienta, con la utilización de los primers del presente estudio, se demostró que *C. fimbriata s.l.* en café descende de dos lineamientos filogenéticos distintos (Barnes et al., 2001, Marin et al., 2003; Van Wyk et al., 2010). En Costa Rica, los primeros estudios sobre la enfermedad fueron realizados por Echandi (1955), donde, mediante el aislamiento del patógeno, pruebas morfológicas y la verificación de los postulados de Koch, se determinó la presencia del agente causal conocido como *C. fimbriata* en Colombia, Venezuela y Guatemala. De esta forma, se le reconoció como *Ceratocystis fimbriata* hasta la actualidad, sin embargo, con el descubrimiento de las pruebas moleculares, se incursionó en la búsqueda de la especificidad de la especie previo a diferencias morfológicas observadas (Van Wyk et al. 2004; Van Wyk et al. 2007a; Van Wyk et al. 2007b; Van Wyk et al. 2009).

Los aislamientos de *Ceratocystis* spp. de plantas de café en las distintas regiones cafetaleras de Costa Rica mostraron diferencias en su morfología y patogenicidad. Se encontraron polimorfismos fijos (diferencias genéticas) en las regiones estudiadas entre aislamientos de este estudio y las especies *C. colombiana* y *C. papillata*, determinadas como nuevas especies patógenas del cultivo del café. Los resultados en el presente estudio muestran la similitud genética entre los aislamientos LS63 y LS4 con valores de bootstrap de 53 y los aislamientos PZ67 y T43 muestran una similitud genética con valores de bootstrap de 100, presentando similitud con la especie *C. papillata*. No se logró incluir secuencias con similitudes en el Blast ya que no se encontraban aislamientos con las tres regiones secuenciadas más que las del estudio realizado por Van Wky et al. (2010). En conclusión, existe una similitud entre los aislamientos LS4 y LS63 y estos con los aislamientos T43 y PZ67, sin embargo, no son iguales, por lo que se requiere el secuenciamiento de todos los aislamientos para determinar la presencia de nuevas especies. Además, a pesar que los aislamientos T43 y PZ67 presentan una mayor similitud con la especie *C. papillata*, estos se ubican en dos ramas separadas, probablemente debido a distintas condiciones

geográficas u otra presión ejercida sobre el patógeno, por lo que es importante incluir más secuencias para verificar una mayor separación. Además, ninguno de los 4 aislamientos del presente estudio muestran una alta similitud con las demás especies comparadoras incluyendo a *C. fimbriata* descrita por Van Wyk et al. (2010).

En el caso de los aislamientos LS63 y LS4 que presentan similitud genética, esto no se observa en sus características morfológicas y patogénicas; en el caso de los aislamientos PZ67 y T43, si muestran similitud para el tamaño de la base del peritecio y del ostiolo, mostrando una separación con los individuos de la región de Los Santos. Además, con lo que respecta a la agresividad, todos los aislamientos presentan categorías de Índice de Agresividad distintos.

De esta forma, los aislamientos considerados como más cercanos genéticamente, no necesariamente lo son para variables morfológicas y de agresividad. Con lo que se concluye, que existe diversidad entre la población de *Ceratocystis* a nivel de país.

Fourie et al. (2015) y Oliveira et al. (2015) mencionan que se han encontrado dos tipos de ITS para un mismo aislamiento de *Ceratocystis* en mango, determinados como especies distintas, por lo que, recalcan la importancia de utilizar otras regiones genéticas alternativas para apoyar los resultados o diferir entre el género *Ceratocystis*. Se cuentan con regiones genéticas alternativas para análisis filogénicos: proyectos AFTOL y FBoL, tipos de secuencias de apareamiento (MAT1-1-2), otras secuencias de ITS, genes codificadores de co-proteínas, la proteína de procesamiento pre-Rard (Tsr1), el complejo de proteínas de mantenimiento de minicromosomas (Mcm7), la proteína ribosomal L37 (FG1093), la proteína beta de la subunidad de la proteína de unión a nucleótidos guanina (MS204) y los polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs).

Por lo tanto, aunque las regiones utilizadas en el presente estudio nos permiten determinar diferencias genéticas entre aislamientos, existen aún más preguntas sobre aislamientos con diferencias más específicas, donde Oliveira et al. (2015) hacen mención si se puede tratar de nuevas especies o más bien patotipos distintos de la especie.

## CONCLUSIONES

- Los síntomas ocasionados por patógenos de suelo como *Rosellinea* spp. y *Fusarium* spp. son similares a *Ceratocystis* spp. por lo que la verificación de una herida y la presencia de una lesión irregular es una característica específica del género *Ceratocystis*.
- Existe una mayor presencia de la enfermedad en la región del Valle Central.
- Los aislamientos LS4, LS63, T43 y PZ67 presentan diferencias morfológicas entre ellos, pero mantienen las características similares del género y todos muestran similitud con la especie *C. papillata*.
- Los aislamientos LS4, LS63, T43 y PZ67 presentan diferencias en su agresividad y no se muestra una relación directa de esta variable con aislamientos de la misma región geográfica cafetalera del país. El aislamiento más agresivo corresponde LS63 y el menos agresivo al aislamiento LS4, ambos de la región de Los Santos.
- A nivel genético, se muestra diferencias genéticas entre los aislamientos LS4 y LS63 con los aislamientos T43 y PZ67, mostrando una similitud con la especie *C. papillata*.
- Existen diferencias en la morfología, agresividad y genética de los aislamientos de *Ceratocystis* spp. en la regiones cafetalera de Costa Rica.
- Se tiene al aislamiento más agresivo para estudios en mejoramiento de plantas con resistencia u tolerancia a este patógeno.

## RECOMENDACIONES

- A nivel de campo, capacitar a los técnicos sobre la lesión característica de *Ceratocystis* spp. e incentivar las buenas prácticas culturales para evitar la presencia de heridas.
- Realizar un estudio genético de todos los aislamientos de *Ceratocystis* spp. del presente estudio.
- Utilizar el aislamiento más agresivo en los proceso de mejoramiento de plantas por parte de las instituciones interesadas.
- Realizar este tipo de estudio para otros patógenos en café de los cuales se conoce poco de su comportamiento, distribución y agresividad.
- Conocer la biología de los organismos que afectan la caficultura en nuestra región y no trasladar y hacer como verdadera, cualquier información del comportamiento de los patógenos en otras regiones.

## LITERATURA CITADA

- ALVARADO, M; ROJAS, G. 2007. El cultivo y beneficiado del café. Editorial de la Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. 145 p.
- ARAUJO, L; SILVA, W; CACIQUE, I; CRUZ, M; RODRIGUES, F. 2014. Histopathological aspects of mango resistance to the infection process of *Ceratocystis fimbriata*. Plant Pathology. Doi: 10.1111/ppa.12208.
- BAKER, F.; THOMAS, H. 2001. *Ceratocystis fimbriata*. Available. En línea: <http://www.public.iastate.edu/~tcharrin/CABIinfo.html>. Consultado el 22/3/2017.
- BAKER, C; HARRINGTON. T; KRAUSS, U; ALFENAS, A. 2003. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. Phytopathology. 93 (10): 1274-1284.
- BAKER, C; HARRINGTON T. 2005. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. Mycologia. 97 (1): 57-69.
- BARNES, I; GAUR, A; BURGESS, T; ROUX, J; WINGFIELD, B; WINGFIELD, M. 2001. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. Molecular Plant Pathology. 2(6): 319-325.
- BARNES, I; ROUX, J; WINGFIELD, B; DUDZINSKI, M; OLD, K; WINGFIELD, M. 2003. *Ceratocystis pirilliformis*, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia. Mycologia. 95(5):865-871.
- BERTSCH, F. 1995. La fertilidad de los suelos y su manejo. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. 4 pp.

- BIANCHINI, C. 1955. Las llagas del café en Costa Rica. *Revista Biología Tropical*. 3(2): 203-235.
- BISPO, W; ARAÚJO, L; BERMÚDEZ-CARDONA, M; CACIQUE, I; DAMATTA, F; RODRIGUES, F. 2015. *Ceratocystis fimbriata*-induced changes in the antioxidative system of mango cultivars. *Plant Pathology*. 64: 627-637.
- CABI. 2017. Cookies on invase species *compendium* (2017). En línea. Última revisión 2 de abril del 2017. Disponible en: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/12143>.
- CADENA, G; GAITÁN, A. 2006. Las enfermedades del café: logros y desafíos para la caficultura colombiana del siglo XXI. *Cenicafé. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. No. 77.
- CARLISLE, D; COOKE, L; WATSON, S; BROWN, A. 2002. Foliar aggressiveness of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans* on detached leaflets of three potato cultivars. *Plant Pathology*. 51: 424–434.
- CASTRO-CAICEDO, B; DUQU-ORREGO, H; MONTOYA-RESTREPO, E. 2003. Pérdidas económicas ocasionadas por la llaga macana del cafeto. *Cenicafé*. 54 (1): 63-76.
- CASTRO-CAICEDO, B. 1999. Las llagas del cafeto. *Avances Técnicos* 268. *Cenicafé*. 8 p.
- CASTRO, C; DUQUEO, H; MONTOYA, R. 2003. Pérdidas económicas ocasionadas por la Llaga macana del cafeto. *Cenicafé*. 54 (1): 63-76.
- CASTRO-TORO, Á; RIVILLAS-OSORIO, A. 2003. Manejo sostenible de la llaga macana en cafetales renovados por zoca. *Cenicafé. Avances Técnicos* 312. 8 p.
- CASTRO-CAICEDO, B; CORTINA-GUERRERO, H. 2009. Evaluación de resistencia a *Ceratocystis fimbriata* Ell Halst. Hunt. en progenies F<sub>5</sub> de café Borbón resistente x caturra. *Cenicafé* 60 (2):115-125.

- CASTRO-CAICEDO, B; CORTINA-GUERRERO, H. ROUX, J; WINGFIELD, M. 2013. New coffee (*Coffea arabica*) genotypes derived from *Coffea canephora* exhibiting high levels of resistance to leaf rust and *Ceratocystis* canker. *Tropical Plant Pathology*. 38(6):485-494.
- CASTRO, B; ZULUAGA, C. 2012. Evaluación de coadyuvantes para el control de llaga macana (*Ceratocystis fimbriata*) en zocas de café. *Fitopatología Colombiana*. 36 (1): 27-32.
- CASTRO, B; CORTINA, H; ROUX J; WINGFIELD, M. 2013. New coffee (*Coffea arabica*) genotypes derived from *Coffea canephora* exhibiting high levels of resistance to leaf rust and *Ceratocystis* canker. *Tropical Plant Pathology*. 38 (6): 485-494.
- DE BEER, Z; DUONG, T; BARNES, I; WINGFIELD, B; WINGFIELD, M. 2014. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. *Studies in Mycology*. 79: 187-219.
- ECHANDI, E. 1955. Trunk and stem canker of coffee trees. *Revista Biología Tropical*. 3(2): 237-241.
- ENGELBRECHT, C; HARRINGTON, T. 2005. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycologia*. 97:57–69.
- ENGELBRECHT, C; HARRINGTON, T; ALFENAS, A. 2007. *Ceratocystis* wilt of cacao-disease of increasing importance. *Phytopathology*. 97: 1648-1649.
- FERREIRA, E; HARRINGTON, T; THORPE, D; ALFENAS, A. 2010. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil. *Plant Pathology*. 59: 721-735.
- FOURIE, A; WINGFIELD, M; WINGFIELD, B; BARNES, I. 2015. Molecular markers delimit cryptic species in *Ceratocystis sensu stricto*. *Mycological Progress*. 11: 1020.

- GARCÍA, O; LÓPEZ, E; JOSÉ, J; CORREA, J; GUIMARAES, G. 2016. *Ceratocystis* wilt pathogens: history and biology—highlighting *C. cacaofunesta*, the causal agent of wilt disease of cacao. Springer International Publishing Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-24789-2\_12.
- GLASS, N; DONALDSON, G. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 61 (4):1323-1330.
- GROSCLAUDE, C; OLIVIER, R; PIZZUTO, J; ROMITI, C. 1991. Coloured canker of plane. *PHM Revue Horticole.* 317: 42-44.
- HAMID, A; AYERS, J; HILL, R. 1982. Host × isolate interaction in corn inbreds inoculated with *Cochliobolus carbonum* race 3. *Phytopathology.* 72:1169–1173.
- HUNT, J. 1956. Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia.* 19: 1–58.
- INSTITUTO DE CAFÉ DE COSTA RICA (ICAFFE). Productores. (en línea) Consultado el 19 de setiembre, 2014. Disponible en [http://www.icafe.go.cr/nuestro\\_cafe/estructura%20del%20sector/productores.html](http://www.icafe.go.cr/nuestro_cafe/estructura%20del%20sector/productores.html)
- JACOBS, K; BERGDAHL, D; WINGFIELD, M; HALIK, S; SEIFERT, K; BRIGHT, D; WINGFIELD, B. 2004. *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycologica Resear.* 108:411–418.
- JACOBS, K; WINGFIELD, M; WINGFIELD, B; YAMAOK, Y. 1998. Comparison of *Ophiostoma huntii* and *O. europhioides* and description of *O. aenigmaticum* sp. nov. *Mycological Research.* 102 (3): 289-294.
- JOHNSON, J; HARRINGTON, T; ENGELBRECHY, C. 2005. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. *Mycologia.* 97 (5): 1067-1092.



- LUI, F; MBENOUN, M; BARNES, I; ROUX, J; WINGFIELD, M; LI, G; LI, J; CHEN, S. 2015. New *Ceratocystis* species from *Eucalyptus* and *Cunninghamia* in South China. Springer. 107:1451-1473.
- MARÍN, M; CASTRO, B; GAITAN, A; PREISIG, O; WINGFIELD, B; WINGFIELD, M. 2003. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian coffee-growing regions based on molecular data and pathogenicity. Phytopathology. 151: 395-405.
- MATA, R. 1991. Los órdenes de suelos de Costa Rica. Taller de Erosión. Memoria. Heredia, MADE, UNA.
- MENESES, G. 2008. Estudio de aislamientos del hongo fitopatogeno del café *Ceratocystis fimbriata*. Informe de trabajo final de graduación. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 76 p.
- MILUS, A; SEYRAN, E; MCNEW, R. 2006. Aggressiveness of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* isolates in the south-central States. Plant Disease. 90: 847–852.
- MORRIS, M; WINGFIELD, M; DE BEER; C. 1993. Gummosis and wilt of *Acacia mearnsii* in South Africa caused *Ceratocystis fimbriata*. Plant Pathology. 42: 814-817.
- MUNSELL COLOR (FIRM). 2010. Munsell soil color charts : with genuine Munsell color chips. Grand Rapids, MI :Munsell Color.
- OIC (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION). La Historia de café. (en línea) Consultado el 12 de junio, 2017. Disponible en <http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf>
- OLIVEIRA, L; HARRINGTON, T; FERREIRA, M; DAMACENA, M; AL-SADI, A; AL-MAHMOOLI, I; ALFENAS, A. 2015. Species or Genotypes? Reassessment of four recently described species the *Ceratocystis* wilt pathogen, *Ceratocystis fimbriata*, on *Mangifera indica*. The American Phytopathological Society. 105 (9): 1229- 1244.

- PARIAUD, B; RAVIGBÉ, V; HALKETT, F; GOYEAU, H; CARLIER, J; LANNOU, C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology*. 58:409-424.
- PAULIN-MAHADY, A; HARRINGTON, T; MCNEW, D. 2002. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*. *Mycologia*. 94: 62–72.
- PÉREZ, O. 2009. Caracterización morfológica, molecular e histopatología de hongos ophiostomatoides asociados al pino de las alturas (*Pinus hartwegii* Lindl). Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias. Texcoco, México. 105 p.
- PÉREZ, O; ALVARADO, D; CIBRIÁN, D; EQUIHUA, A; CÁEDENAS, E. 2011. Hongos ophiostomatoides de galerías de *Dendroctonus adjunctus* Blandford en *Pinus hartwegii* Lindl. *Revista Ciencia Forestal en México*. 2 (8): 36-46.
- PLIAKHNEVICH, M; IVANIUK, V. 2008. Aggressiveness and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* strains in Belarus. *Zemdirbyste-Agriculture* 95(3): 379-387.
- PONTIS, R. 1951. A canker disease of the coffee tree in Colombia and Venezuela. *Phytopathology*. 41, 179–184.
- ROUX\*†, J; VAN WYK, M; HATTING, H; WINGFIELD, M. 2004. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. *Plant Pathology* 53: 414–421.
- ROUX\*†, J; WINGFIELD, M. 2009. *Ceratocystis* species: emerging pathogens of non-native plantation *Eucalyptus* and *Acacia* species. *Southern Forests*. 71 (2):115-120.
- THORPE, D.; HARRINGTON, T. y UCHIDA, J. 2005. Pathogenicity, internal transcribed spacer-rDNA variation, and human dispersal of *Ceratocystis fimbriata* on the family Araceae. *Phytopathology* 95(3): 316-323.
- VAN WYK, M; ROUX, J; BARNES, I; WINGFIELD, B; LIEW E; ASSA, B; SUMMERELL, B; WINGFIELD, M. 2004. *Ceratocystis polychroma* sp. nov., a

- new species from *Syzygium aromaticum* in Sulawesi. *Studies Mycology*. 50:273–282.
- VAN WYK, M; VAN DER MERWE, N; ROUX, J; WINGFIELD, B; KAMGAN, G; WINGFIELD, M. 2006. Population genetic analyses suggest that the eucalyptus fungal pathogen *Ceratocystis fimbriata* has been introduced into South Africa. *South African Journal of Science* 102:259–263.
- VAN WYK, M; AL ADAWI, A; KHAN, I; DEADMAN, M; AL JAHWARI, A; WINGFIELD, B; PLOETZ, R; WINGFIELD, M. 2007a. *Ceratocystis manginecans* sp. nov., causal disease of a destructive mango wilt disease in Oman and Pakistan. *Fungal Divers.* 27:213–230.
- VAN WYK, M; PEGG, G; LAWSON, S; WINGFIELD, M. 2007b. *Ceratocystis atrox* sp. nov. associated with *Phoracantha acanthocera* infestations on Eucalyptus in Australia. *Australas. Plant Pathology*. 36:407–414.
- VAN WYK, M; WINGFIELD, B; MOHALI, S; WINGFIELD, M. 2009. *Ceratocystis fimbriatomima*, a new species in the *C. fimbriata* sensu lato complex isolated from Eucalyptus trees in Venezuela. *Fungal Diversity* 34:173–183
- VAN WYK, M; WINGFIELD, B; MARIN, M; WINGFIELD, M. 2010. New *Ceratocystis* species infecting coffee, cacao, citrus and native trees in Colombia. *Fungal Diversity*. 40: 103-117.
- WALLER, J; BIGGER, M; HILLOCKS, R. 2007. Coffee pests, diseases and their management. CABI. 423 p.
- WALDEMAR, J. 2012. Caracterización biológica del hongo *Mycena citricolor* Berk & Curt, con aislamientos obtenidos de cultivares de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de las diferentes zonas cafetaleras de Guatemala, C.A. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 51 p.

- WEBSTER, R; BUTLER, E. 1967. A morphological and biological concept of the species *Ceratocystis fimbriata*. Canadian Journal of Botany. 45:1457–1468.
- WINGFIELD, M; DE BEER, C; VISSER, C; WINGFIELD, B. 1996. A new *Ceratocystis* species defined using morphological and ribosomal DNA sequence comparisons. Systematic Applied Microbiology. 19:191-202.
- WHITE, T; BRUNS, T; LEE, S; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a sequencing guide to methods and applications. Academic Press. 315–322 p.
- ZAUZA, E; ALFENAS, A; HARRINGTON, T; MIZUBUTI, E; SILVA, J. 2004. Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. Plant Disease. 88(7): 758-760.

## ANEXO

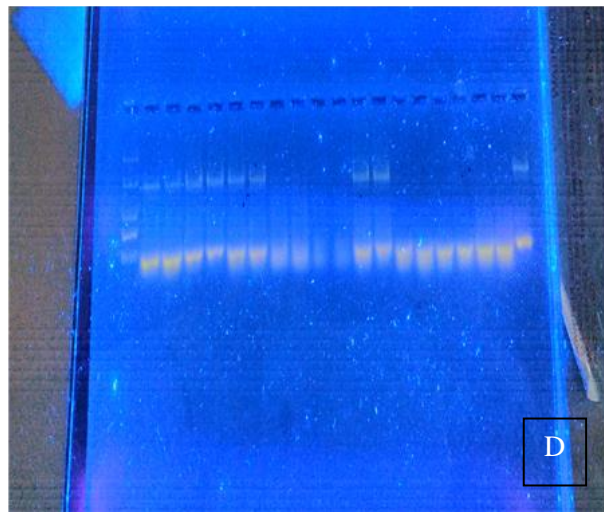
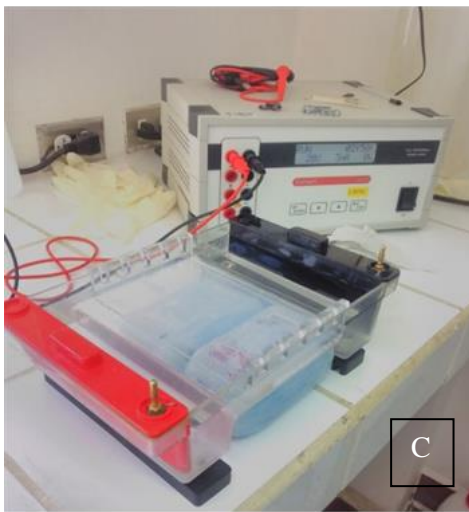
**ANEXO 1.** Variable morfológica color mediante la utilización de la Tabla Munsell de los aislamientos de *Ceratocystis* spp. obtenidos en las distintas regiones cafetaleras en el país

Aislamiento	Hoja tabla Munsell	Valor en la hoja	Color respectivo
VC1	10YR	5/2	Marrón grisáceo
VC3	5Y	5/3	Olivo
LS4	5Y	5/4	Olivo
LS10	5Y	4/3	Olivo
LS12	5Y	4/4	Olivo
VC14	5Y	5/4	Olivo
VC15	10YR	5/2	Marrón grisáceo
VC16	5Y	4/3	Olivo
VC18	5Y	5/4	Olivo
VC19	5Y	5/4	Olivo
VC21	5Y	5/3	Olivo
VC22	5Y	5/3	Olivo
VC23	5Y	5/4	Olivo
PZ28	5Y	5/4	Olivo
VO34	5Y	4/2	Gris olivo
T39	10YR	5/4	Marrón amarillento
T40	5Y	5/4	Olivo
T41	5Y	5/4	Olivo
T43	10YR	5/4	Amarillo
PZ46	5Y	4/4	Olivo
PZ51	5Y	5/3	Olivo
VO52	5Y	3/2	Gris olivo oscuro
VO56	5Y	5/4	Olivo
CB57	5Y	6/2	Gris olivo claro
LS63	5Y	6/3	Olivo pálido
LS64	5Y	6/3	Olivo pálido
LS65	10YR	4/2	Pardo grisáceo oscuro
PZ67	10YR	5/3	Marrón
VO68	5Y	6/4	Olivo pálido
CB72	5Y	5/3	Olivo

**ANEXO 2.** Variables morfológicas para implementación de índice de Agresividad: 0 día de la inoculación (A), 2 días después de la inoculación con aparición de lesión (B), 4-6 días después de la inoculación aparición de peritecios (C) lesión final 15 días después de la inoculación (D), desarrollo de peritecios sobre la lesión en herida realizada (E), medición de la cantidad de peritecios mediante el conteo en un área conocida su equivalencia al área total final de la lesión a los 15 días después de la inoculación (F)



**ANEXO 3.** Extracción de ADN mediante el macerado micelio (A-B), PCR y electroforesis con gel de agarosa 1 % para verificación de amplificación de PCR (C-D)



**ANEXO 4.** Aislamiento de *Ceratocystis* spp. y números de accesiones del GenBank utilizados para generar el árbol filogenético en el presente trabajo

Especie	Número de Aislamiento	Número de accesión en el GenBank	Hospedero	Región geográfica	Referencia
<i>C. cacaofunesta</i>	CMW15051	DQ520636 EF070427 EF070398	Theobroma caao	Costa Rica	Van Wyk,M., Van der Merwe,N.A., Roux,J., Wingfield,B.D., Kamgan,G.N. and Wingfield,M.J.(2006)
<i>C. manginecans</i>	CMW13851	AY953383 EF433308 EF433318	Mangifera indica	Oman	Van Wyk,M., Al-Adawi,A.O., Wingfield,B.D., Al-Subhi,A.M., Deadman,M.L. and Wingfield,M.J. (2005)
<i>C. tanganyicensis</i>	CMW15991	EU244997 EU244969 EU244929	Acacia mearnsii	Tanzania	Heath,R.N., Wingfield,M.J., Wingfield,B.D., Meke,G., Mbaga,A. and Roux,J (2009)
<i>C. virensis</i>	CMW11164	DQ520639 EF070441 EF070413	Quercus robur	USA	Van Wyk,M., Van der Merwe,N.A., Roux,J., Wingfield,B.D.,
<i>C. platani</i>	CMW14802	EF070425 EF070396 DQ520630	Platanus occidentalis	USA	Van Wyk,M., Al Adawi,A.O., Khan,I.A., Deadman,M.L., Al Jahwari,A.A., Wingfield,B.D., Ploetz,R. and Wingfield,M.J. (2007)
<i>C. fimbriata</i>	CMW15049 CBS141.37	EF070442 EF070394 DQ520629	Ipomoea batatas	USA	Van, M; Wingfield, B; Marin, M; Wingfield, M (2010)
<i>C. papillata</i>	CMW8860	GQ478241 GQ478237 GQ478239	Theobroma caao	Colombia	Van, M; Wingfield, B; Marin, M; Wingfield, M (2010)
<i>C. papillata</i>	CMW5746	EU241480 EU241482 EU241479	Coffea arabica	Colombia	Van, M; Wingfield, B; Marin, M; Wingfield, M (2010)
<i>C. papillata</i>	CMW9561	GQ478242 GQ478238 GQ478240	Theobroma caao	Colombia	Van, M; Wingfield, B; Marin, M; Wingfield, M (2010)
<i>C. papillata</i>	CMW8850 CBS121794	AY233875 EU241485 AY233866	Citrus x tangelo	Colombia	Van, M; Wingfield, B; Marin, M; Wingfield, M (2010)
<i>C. papillata</i>	CMW8857	AY233878 EU241483 AY233868	Annona muricata	Colombia	Van, M; Wingfield, B; Marin, M; Wingfield, M (2010)
<i>C. colombiana</i>	CMW5768	AY177222 EU241491 AY177235	Coffea arabica	Colombia	Van, M; Wingfield, B; Marin, M; Wingfield, M (2010)
<i>C. colombiana</i>	CMW5761 CB121791	AY177224 EU241492 AY177234	Coffea arabica	Colombia	Van, M; Wingfield, B; Marin, M; Wingfield, M (2010)
<i>C. colombiana</i>	CMW9565 CB121790	AY233870 EU241487 AY233864	Soil in coffe planttion	Colombia	Van, M; Wingfield, B; Marin, M; Wingfield, M (2010)