

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

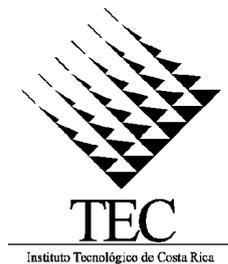
ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**ESTUDIO DE AISLAMIENTOS DEL HONGO FITOPATÓGENO DEL CAFÉ
*CERATOCYSTIS FIMBRIATA.***

Guiselle Meneses Rojas

CARTAGO, 2008



**ESTUDIO DE AISLAMIENTOS DEL HONGO FITOPATÓGENO DEL CAFÉ
CERATOCYSTIS FIMBRIATA.**

***Guiselle Meneses Rojas**

RESUMEN

El hongo *Ceratocystis fimbriata* es el causante de la enfermedad “Llaga macana” en el cafeto, la cual ocasiona la muerte completa de la planta antes de que los síntomas sean visibles, ocasionando grandes pérdidas económicas. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la patogenicidad de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* y su control en variedades comerciales de café. Con este fin se inocularon estacas de café de las variedades Caturra y Catuai con aislamientos del hongo, se realizaron evaluaciones morfológicas y de sensibilidad al fungicida Butrol 31.5 EC *in vitro* de los mismos y se evaluó la inhibición de *C. fimbriata* en suelo utilizando el hongo *Trichoderma* sp. No se estableció una relación entre las características morfológicas, la tasa de crecimiento en las estacas, la producción de peritecios o el lugar de procedencia de los aislamientos, aunque hubo diferencias relevantes de patogenicidad. Se realizó la descripción morfológica de los aislamientos en PDA, los mismos mostraron un rango medio de sensibilidad al Butrol 31.5 EC. *Trichoderma* sp. tuvo la capacidad de invadir suelo colonizado por *Ceratocystis fimbriata*, por lo que se podría utilizar en control biológico preventivo, lo que elevaría el valor agregado del grano de café.

*INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2008.

**ESTUDIO DE AISLAMIENTOS DEL HONGO FITOPATÓGENO DEL CAFÉ
*CERATOCYSTIS FIMBRIATA.***

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal



MSc. Vladimir Villalba Velásquez,
Profesor Asesor-ITCR



MSc. Miguel Barquero Miranda
Asesor empresa



MSc. Dora Flores Mora,
Lectora

DEDICATORIA

*A mis padres, por ser el riel en
mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Deseo destacar la colaboración en la trayectoria de este trabajo de:

El personal del CICAPE, por abrirme sus puertas y haber creado un ambiente ideal de trabajo.

Miguel Barquero Miranda por su paciencia, dedicación y constante positivismo.

Fabián Echeverría y Sebastián Fournier por haberme recibido y por su confianza en mi desempeño.

Moiso por sus buenas ideas, su positivismo y por ser mi compañero incondicional.

Vladimir Villalba y Dora Flores por establecer las bases del conocimiento y por su guía.

Mis amigos, Tavo y Eduardo por su colaboración y apoyo directo en este proyecto.

Mi familia, especialmente a mis padres, Guiselle y Roger y mis hermanos, Paulo y Esteban, por su interés integral en mí y sus buenas intenciones.

INDICE GENERAL

Título	Pág.
RESUMEN	i
<i>DEDICATORIA</i>	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE GENERAL	v
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE ANEXOS	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
El Café en Costa Rica	3
Importancia de la “Llaga macana” en café	3
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	4
Taxonomía y Hospederos	4
Síntomas en Café	5
Morfología	7
Penetración y Dispersión	9
Ensayos con <i>Ceratocystis fimbriata</i>	10
Aislamiento y Evaluación	10
Detección	11
Patogenicidad	12
Morfológicos	12
Control	13
Cultural	13
Químico	14
Biológico	16
OBJETIVOS	19
Objetivo General	19
Objetivos específicos	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Evaluación morfológica de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	20
Establecimiento de los aislamientos	20
Evaluación y Análisis	23
Evaluación de la agresividad de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en estacas de café	23
Aislamientos	23
Preparación de las estacas de café	24
Preparación del inóculo	25
Evaluación y Análisis	26
Evaluación de la sensibilidad de <i>Ceratocystis fimbriata</i> a Butrol 31.5 EC	26
Establecimiento de los aislamientos	26
Preparación de medios	27
Evaluación y Análisis	27
Evaluación de productos biológicos y químicos	27
Preparación del suelo y plantas	27
Preparación del inóculo	28

Evaluación y análisis	29	
RESULTADOS	30	
Evaluación morfológica de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	30	
Evaluación de la patogenicidad de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en estacas de café.....	32	
Evaluación de la sensibilidad de <i>Ceratocystis fimbriata</i> a Butrol 31.5 EC.....	37	
Evaluación de productos biológicos y químicos	39	
DISCUSION DE RESULTADOS	44	
Evaluación morfológica de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	44	
Evaluación de la patogenicidad de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en estacas de café.....	45	
Evaluación de la sensibilidad de <i>Ceratocystis fimbriata</i> a Butrol 31.5 EC.....	51	
Evaluación de productos biológicos y químicos	51	
CONCLUSIONES.....	54	
RECOMENDACIONES	55	
BIBLIOGRAFÍA	56	
ANEXOS	65	
Anexo 1	65	
Análisis de Regresión del crecimiento de aislamientos de <i>Cerarocystis fimbriata</i> en medio PDA.	65	
Anexo 2	7171	Eliminado: 70
Análisis de Regresión del crecimiento de aislamientos de <i>Cerarocystis fimbriata</i> en estacas de la variedad de café Caturra.	7171	Eliminado: 70
Anexo 3	7676	Eliminado: 75
Análisis de Regresión del crecimiento de aislamientos de <i>Cerarocystis fimbriata</i> en estacas de la variedad de café Catuai rojo.	7676	Eliminado: 75

INDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1	Colección de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i> del CICAFFE utilizados en la investigación.....	22
2	Coefficientes de regresión del crecimiento de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en medio PDA	31
3	Características de los aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i> observadas en medio PDA	31
4	Coefficientes de regresión del crecimiento de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en estacas de café var. Caturra.....	34
5	Coefficientes de regresión del crecimiento de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en estacas de café var. Catuaí rojo.....	35
6	Dosis de Butrol 31.5 EC requerida para la inhibición del 50% y 90% del crecimiento de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	38
7	Observaciones del crecimiento de diluciones de suelo bajo diferentes tratamientos en rodajas de zanahoria, en distintos días de evaluación.....	40

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Ascosporangios de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en un tallo de café observados al estereoscopio (3x).	6
2	Morfología de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	8
3	Peritecios de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en tronco de café observados al estereoscopio (3x).....	8
4	Cámara húmeda utilizada para promover el crecimiento de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	20
5	Troncos de café infectados con <i>Ceratocystis fimbriata</i>	21
6	Crecimiento de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en una rodaja de zanahoria.....	21
7	Estructuras típicas de <i>C. fimbriata</i> vistas al microscopio (40X).....	24
8	Estacas de café descortezadas a la mitad.....	24
9	Cámara húmeda utilizada para promover el crecimiento de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en estacas de café, se identifica la distribución de las variedades....	25
10	Heridas en forma de U invertida realizadas a tallos de plantas de café.	29
11	Gráfico de la tendencia del incremento del diámetro de aislamientos de <i>C. fimbriata</i> creciendo en medio PDA.....	30
12	Gotas observadas en el crecimiento en PDA del aislamiento CF67 de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	32
13	Desarrollo de micelio secundario sobre peritecios y micelio inicial de <i>Ceratocystis fimbriata</i> creciendo en PDA.....	32
14	Diagramas de patrones de crecimiento de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en PDA codificado en el cuadro 3 como 2, 3 y 4 de izquierda a derecha respectivamente.....	32
15	<i>Ceratocystis fimbriata</i> creciendo sobre estas de café.....	33
16	Gráfico de las líneas de tendencia del crecimiento del micelio de aislamientos de <i>C. fimbriata</i> en estacas de café var. Caturra.	33
17	Gráfico de las líneas de tendencia del crecimiento del micelio de aislamientos de <i>C. fimbriata</i> en estacas de café var. Catuaí rojo.....	35
18	Ascosporangios de <i>Ceratocystis fimbriata</i> sobre una estaca de café.....	36

19	Porcentaje relativo de peritecios de aislamientos de <i>C. fimbriata</i> en estacas de café var. Caturra.	36
20	Porcentaje de peritecios de aislamientos de <i>C. fimbriata</i> en estacas de café var. Catuaí.....	37
21	Dosis de i.a de Butrol 31.5 EC necesario para inhibir el 50% del crecimiento de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	38
22	Dosis de i.a de Butrol 31.5 EC necesario para inhibir el 90% del crecimiento de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	39
23	Desarrollo típico de <i>C. fimbriata</i> en rodajas de zanahoria inoculadas con suelo.....	40
24	Desarrollo típico de <i>Trichoderma</i> sp. en rodajas de zanahoria inoculadas con suelo.....	41
25	Estructuras típicas de <i>Ceratocystis fimbriata</i> observadas al microscopio óptico (40x) provenientes del crecimiento del hongo en rodajas de zanahoria.....	41
26	Estructuras típicas de <i>Trichoderma</i> sp. observadas al microscopio óptico (40x) provenientes del crecimiento del hongo en rodajas de zanahoria.....	41
27	Plantas de café con clorosis en las hojas a los 15 días de inoculadas con <i>C. fimbriata</i>	42
28	Plantas de café con marchitamiento de hojas bajas a los 15 días de inoculadas con <i>C. fimbriata</i>	42
29	Tallo de café con desarrollo de micelio gris en una herida y tallo con una herida cubierta con papel parafilm.....	43
30	Planta de café con marchitamiento total de hojas a los 15 días de inoculadas.....	43
31	Tasas de crecimiento diaria de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en estacas de café variedad Caturra.....	49
32	Tasas de crecimiento diaria de aislamientos de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en estacas de café variedad Catuaí rojo.....	49

INDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Análisis de Regresión del crecimiento de aislamientos de <i>Cerarocystis fimbriata</i> en medio PDA.....	65
2	Análisis de Regresión del crecimiento de aislamientos de <i>Cerarocystis fimbriata</i> en estacas de la variedad de café Caturra.....	71
3	Análisis de Regresión del crecimiento de aislamientos de <i>Cerarocystis fimbriata</i> en estacas de la variedad de café Catuai rojo.....	76

INTRODUCCIÓN

Al igual que en el resto de cultivos comerciales, en el café (*Coffea arabica*) existen relaciones fitopatológicas causantes de enfermedades que provocan pérdidas económicas. La incidencia de plagas y enfermedades en este cultivo es muy amplia y durante mucho tiempo se ha investigado para lograr el control de las mismas, sin embargo esta es una actividad que parece no tener un fin próximo (Sayago, 1999).

La principal enfermedad del tallo del café es ocasionada por el hongo cosmopolita *Ceratocystis fimbriata*, se considera que en Costa Rica se encuentra en todos los suelos del país, por lo que su daño se extiende a una gran cantidad de especies vegetales; en café ocasiona la enfermedad llamada “Llaga macana”. Por tradición el café es uno de los productos de mayor importancia comercial, tanto de exportación como para consumo nacional, por lo que esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas económicas para el sector cafetalero (Vargas, 1996).

En nuestro país no se han realizado investigaciones recientes sobre *C. fimbriata*, por lo que no se dispone de información específica de su comportamiento en el ámbito nacional cafetalero. El problema es que las especies comerciales de *Coffea arabica* como Caturra, Típica, Borbón y Catuaí son susceptibles al ataque de este hongo y Costa Rica es el único país en donde, por decreto presidencial (N°19302-MAG, 4 de diciembre de 1989), solamente las variedades arábica pueden ser sembradas (Castro *et al.*, 2003; Rodríguez, 2001).

Por otro lado, el periódico El Financiero publicó en el 2008 que el negocio de los “Coffee Tour” se está incrementando enormemente, en el 2007 recibieron 42.300 turistas y se espera un gran aumento para este año. En ellos se promociona el café orgánico de Costa Rica por el que es conocido en el mercado mundial, que además refuerza la imagen de país conservador del medio ambiente. Es en este sentido que el control biológico de la “Llaga macana” sería un paso importante en la producción de café orgánico no sólo de exportación, si no para atraer turismo (Camacho, 2008).

El Centro de Investigaciones en Café (CICAFE) fue creado en mayo de 1977 por el Instituto del Café de Costa Rica. Esta entidad tiene como objetivo el desarrollo y divulgación de tecnología en las diferentes áreas de la actividad cafetalera. Además, desarrolla investigaciones en café mediante ensayos de campo en mejoramiento genético, pruebas químicas para el respaldo de la calidad, entre otras actividades en los laboratorios de Control Biológico, Producción de *Beauveria bassiana*, laboratorio de química y fitopatología (Rodríguez, 2001).

El laboratorio de fitopatología del CICAFE fue creado recientemente para la investigación de las enfermedades que atacan dicho cultivo, así como para buscar soluciones de control para las mismas. Es por esto que el CICAFE ha mostrado gran interés en el desarrollo del control de la “Llaga macana”, con el fin de dar a los caficultores una alternativa de control para la enfermedad y de esta manera reducir los costos de producción y problemas en campo por la misma (Rodríguez, 2001).

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de fitopatología del CICAFE, entre el 1 de julio del 2007 y el 31 de enero del 2008. En el trabajo de investigación se describe una serie de ensayos que permitieron determinar la acción patogénica de aislamientos del hongo *Ceratocystis fimbriata* en las variedades de café comercial Caturra y Catuaí rojo; éstas dos son las variedades principales que se siembran en nuestro país. También se describen ensayos para la determinación de la sensibilidad química, el control biológico y descripción morfológica de este hongo.

El objetivo de esta investigación fue realizar el estudio de diferentes aislamientos del hongo *Ceratocystis fimbriata* en distintos aspectos, para evaluar sus características y comportamiento.

REVISIÓN DE LITERATURA

El Café en Costa Rica

El café ha sido por tradición uno de los productos de exportación más importantes para Costa Rica, existen más de 78.000 productores y se cosechan más de 100.000 hectáreas de café por año, constituyendo una de las actividades productivas más importantes del país por su impacto cultural y económico. Recientemente se publicó que el quintal de café subió su precio un 15% en la Bolsa de Comercio de Nueva York, siguiendo una tendencia alcista desde hace años, lo cual beneficia a los productores costarricenses ya que venden el 50% del café hasta a un 17% más a los de la mencionada Bolsa. Además, los productores lograron vender por adelantado un 45% de su cosecha para el periodo 2007-2008, lo que demuestra un sólido posicionamiento del producto tico (Rodríguez, 2001; Barquero, 2007a; Barquero, 2007b).

El café es afectado por una amplia variedad de fitopatógenos como hongos, bacterias, virus, insectos, nematodos y malezas. Dentro de las enfermedades ocasionadas por hongos *Ceratocystis fimbriata* causa la “Llaga macana”, una de las principales; en Costa Rica esta enfermedad también tiene importancia en cítricos y cacao además de café (Vargas, 1996; Vázquez, 1999; Duque *et al.*, 2003; FNCC, 2007).

Importancia de la “Llaga macana” en café

El café es uno de los cultivos de importancia más susceptibles a “Llaga macana”, según Castro y Rivillas (2003) es la enfermedad más importante a nivel de tallo y ramas en el cafeto y su presencia en los cafetales es cada vez más frecuente. Vargas (1996) encontró *C. fimbriata* en 3 de los 4 tipos de suelo muestreado en diferentes cafetales de Costa Rica, demostrando que la presencia de este hongo es bastante común. Además, se correlaciona la enfermedad “Llaga macana” con toxicidad por hierro, manganeso o aluminio, porque hacen que las raíces exuden más, atrayendo patógenos. Se menciona que *Ceratocystis* ataca las raíces debido a que el estrés disminuye la concentración de ácido clorogénico, el cual le confiere resistencia a las plantas de café (Thorpe *et al.*, 2005).

La densidad de siembra es fundamental para obtener una productividad de café óptima y es en este sentido que “Llaga macana” juega un papel primordial, debido a las consecuencias de su ataque. *Ceratocystis fimbriata* causa la muerte de los árboles de café completos, en ataques severos puede reducir entre 20 y 40% de la densidad de plantas de un cafetal, ocasionando grandes pérdidas en todas las zonas cafetaleras de nuestro país y el mundo (Castro *et al.*, 2003; FNCC, 2007).

Ceratocystis fimbriata

Taxonomía y Hospederos

Originalmente *Ceratocystis fimbriata* fue descrito en camote (*Ipomoea batatas*), por lo que al patógeno aislado de este hospedero se le conoce como *Ceratocystis fimbriata sensu stricto*. Desde entonces este hongo ha sido clasificado en diversos grupos filogenéticos, actualmente se considera que pertenece, dentro del reino Fungi a la división Myxomicota, subdivisión Ascomycotina, clase Pyrenomycetes y familia Ceratocystaceae. En las plantas de café causa la enfermedad comúnmente conocida como “Llaga macana” pero también se le conoce como “mal del machete”, “marchitez de chupones”, “macana”, “cáncer del cafeto” o “cáncer del tallo o tronco”. Además, se le identifica con otros nombres científicos como *Ceratostomella fimbriata*, *Endoconidiophora fimbriata*, *Ophiostoma fimbriatum*, *Sphaeronema fimbriata* o *Rostrella coffea* (CABI, 2004; Agrios, 2005; Johnson *et al.*, 2005; BAYER CropScience, 2007).

Se ha confirmado que *C. fimbriata* infecta al menos 31 especies de plantas en 14 diferentes familias de importancia económica, todas ellas dicotiledóneas excepto una (Aracea). Estudios de inoculación cruzada han demostrado que este hongo presenta una alta especificidad tanto para sus hospederos como el área geográfica en la que se distribuye. Por ejemplo, *C. fimbriata forma especiales platani* (*C. fimbriata* f.sp. *platani*) ataca únicamente al plátano en el hemisferio norte; así como la variedad que ataca el pimiento (*Pimenta officinalis* Lind I.) no ataca cacao, café o camote. Se ha determinado que *C. fimbriata* es un complejo de diferentes variedades, cada una con un rango de hospederos y un área geográfica determinada, pero muy relacionadas. Se

sugiere que existen muchas especies crípticas aún no descritas (Baker *et al.*, 2003; Marín *et al.*, 2003; CABI, 2004; Engelbrecht y Harrington 2005; Johnson *et al.*, 2005; Thorpe *et al.*, 2005).

Engelbrecht y Harrington (2005) exponen que la especialización geográfica y de hospederos que presenta este hongo puede estar dirigiéndose hacia una especiación, porque en cada subespecie geográfica existen linajes asociados a un hospedero específico, que son especies crípticas. De hecho, gracias a análisis filogenéticos utilizando ITS del ADN ribosomal, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), minisatélites y RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) se han identificado tres diferentes subgrupos geográficos, 1) Norte América incluye los linajes *Prunus* spp., *Quercus* spp., *Populus* spp. y *Carya* spp., 2) Latinoamérica incluye *Platanus* spp. (*C. platani*), *Xanthosoma/Syngonium*, *Theobroma* (*C. cacaofunesta*), *Eucalyptus*, *Mangifera*, *Coffea* (Costa Rica) y *Coffea/Citrus* (Colombia) y 3) Asia para *Ficus*, *Colocasia* y recientemente se han descrito los patógenos *C. pirilliformis* en África y Australia y *C. polychroma* de Indonesia (Baker *et al.*, 2003; Marín *et al.*, 2003; CABI, 2004; Johnson *et al.*, 2005; Thorpe *et al.*, 2005).

La interesterilidad existente en *C. fimbriata* puede ser un carácter filogenético que ayude a identificar especies, pero también permitir encontrar barreras de flujo de genes entre especies, lo que a su vez puede identificar diferentes linajes. Por otro lado, *C. fimbriata* es la forma perfecta del hongo, su anaforma es conocida como *Chalara* y la teleoforma como *Thielaviopsis* (Marín *et al.*, 2003; Engelbrecht y Harrington, 2005).

Síntomas en Café

C. fimbriata es un habitante común del suelo, especialmente en suelos con un mal drenaje, penetra en la planta en cualquier etapa de desarrollo únicamente por heridas en el tallo o la raíz. Es un hongo endovascular por lo que una vez que ingresa en la planta llega al sistema vascular y lo obstruye, impidiendo el transporte de nutrientes y agua al resto de la planta, lo que conlleva a la muerte completa de la misma de manera descendente. Los síntomas visibles son la clorosis de hojas y pérdida de turgencia o marchitamiento irreversible de la planta, pero esto se observa una vez que la planta ha

muerto. La infección se da en el tronco y las ramas, al levantar la corteza se observan lesiones longitudinales irregulares con forma de cuña de color marrón-café oscuro, negro o azul-violáceo que son resultado de la pudrición del tejido. En la superficie del tronco o ramas se pueden observar llagas en donde se ha producido el desarrollo del hongo, aunque esto es más común en especies diferentes del café (Bolaños, 1991; Castro, 1991; Fundación DANAC, 2002; Castro *et al.*, 2003; CABI, 2004; Ferreira *et al.*, 2005; BAYER CropScience, 2007; CABI y EPPO, s.f).

C. fimbriata se mueve a través del xilema a menudo concentrándose en el sistema vascular causando una mancha donde crece, es decir, se mueve de forma sistémica por la planta causando muerte vascular y afectando mayormente el parénquima. Causa la muerte del cambium y el tejido de la corteza, creando una llaga en el tallo o la rama. El hongo esporula principalmente en la superficie del corte de las ramas infectadas produciendo ascosporangios (figura 1), cuerpos fructíferos de masas de esporas pegajosas para la dispersión por insectos. Esa masa fúngica produce un olor similar a banano que atrae insectos que se alimentan de hongos, los cuales funcionan como vectores. Algunos de estos insectos pertenecen al género *Xyleborus*, los cuales penetran por las ramas y el tronco formando galerías (Harrington, 2000; CABI, 2004).

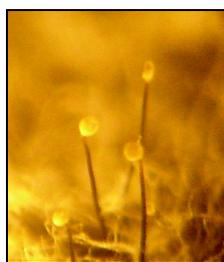


Figura 1. Ascosporangios de *Ceratocystis fimbriata* en un tallo de café observados al estereoscopio (3x).

El avance de la infección del hongo alrededor del tronco es más lento que a lo largo del mismo, el proceso desde la infección hasta la muerte de la planta puede durar entre 8 y 24 meses. Una de las dificultades en el diagnóstico de esta enfermedad, aparte de que los síntomas iniciales no son externos, es que no presenta un patrón de distribución en el cafetal. La enfermedad ocasionada por *C. fimbriata* también es llamada “marchitez de chupones” debido a que cuando la infección ocurre durante la deshija, la lesión avanza

hasta los nuevos brotes o “chupones”, ocasionándoles la muerte; una vez que la planta está infectada no produce brotes (Castro, 1991; Castro *et al.*, 2003).

Morfología

C. fimbriata presenta poca variación morfológica pero se han encontrado diferencias dentro de una misma especie. Puede sobrevivir de 7 a 15 días en la superficie de una herida y en fragmentos de madera en agua de río y en el suelo por 3 meses, puede crecer a temperaturas de entre 10 y 45°C, la temperatura óptima de crecimiento está entre 18-28°C. No se le conoce periodo de incubación, pero puede permanecer viable hasta por 105 días en el suelo, aunque no tolera temperaturas mayores a 35°C en el mismo (CABI, 2004; Thorpe *et al.*, 2005; CABI y EPPO s.f).

El crecimiento de *C. fimbriata* se da adecuadamente en la mayoría de los medios de cultivo comunes, en medio PDA (Agar Papa Dextrosa) tiene una tasa de crecimiento de 0.3-0.5 cm por día a 24°C, inicialmente el micelio es hialino y más o menos denso, luego se observa de color blanco y más adelante gris-verdoso, despidiendo un olor a fruta fermentada (banano, pera, melón, manzana y limón), el cual varía según el medio de cultivo. Por ejemplo, en medio a base de amaranto despide un olor a piña, el de bagazo de yuca produce aroma a manzana y el de soya un olor fuerte a fruta (Bramorski *et al.*, 1998; EPPO, 2003; CABI, 2004; Engelbrecht y Harrington, 2005).

Las colonias pueden producir tres tipos de conidias y usualmente peritecio (figura 2a), 1) las clamidiósporas o aleuroconidias son originadas por conidióforos especializados, ocasionan el color café verdoso en la parte inferior de las colonias, se producen a los 5 días y son esporas asexuales muy numerosas en madera infectada, de pared delgada, bulbosas, miden entre 11-19 μm por 9-15 μm , se encuentran en cadenas cortas o solas (figura 2d), son las conidias de sobrevivencia más comunes debido a su pared delgada y durabilidad que les permite permanecer en el suelo y en los insectos por más tiempo. 2) Las conidias o endoconidias generan un color gris blancuzco en la superficie del cultivo, son hialinas, usualmente de color café claro, de 5-40 μm por 3-6 μm , unicelulares, cilíndricas con la orilla aplanada, en cadenas de un largo variable (figura 2c), son características de *Chalara*. Los endoconidióforos se desarrollan lateralmente de la hifa

vegetativa, dispersos o agrupados, septados, con 60-90 μm de largo y son producidas en ciclos de un día aproximadamente. 3) Las ascósporas tienen una forma característica en casco, son hialinas y miden 4.5-8 μm de largo por 2.5-5.5 μm de ancho (figura 2b) (EPPO, 2003; Marín *et al.*, 2003; CABI, 2004; Engelbrecht y Harrington, 2005; Halfeld y Nechet, 2005).

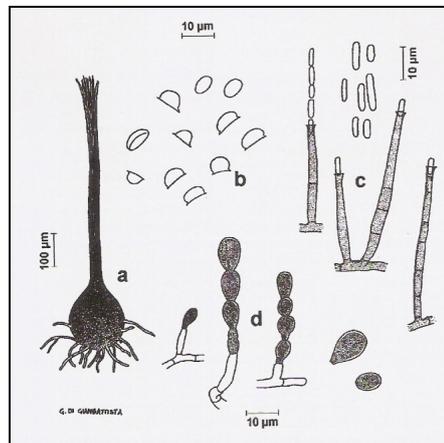


Figura 2. Morfología de *Ceratocystis fimbriata*. a) peritecio, b) ascósporas, c) conidias, d) clamidiósporas. **Fuente:** EPPO, 2003.

Los peritecios o ascocarpos presentan una base oscura, son globosos y miden 130-210 μm de diámetro con un cuello muy largo de 400-890 μm (figura 3), aunque algunas cepas no los producen. Las ascósporas emergen en el extremo de los peritecios donde se observan como una masa pegajosa de color anaranjado. La abertura en la punta del cuello posee de 8 a 15 hifas ostiolares, con un largo de 50-90 μm , son divergentes, de color café claro a hialina, no septada (EPPO, 2003; CABI, 2004; Engelbrecht y Harrington, 2005; Halfeld y Nechet, 2005).

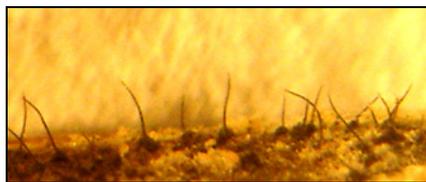


Figura 3. Peritecios de *C. fimbriata* en tronco de café observados al estereoscopio (3x).

Ceratocystis fimbriata presenta dos idioformas, los aislamientos MAT-1 son infértiles, solo producen peritecios cuando se unen a un aislamiento MAT-2, los aislamientos

MAT-2 por su lado son fértiles y representan la mayoría en los aislamientos de campo (CABI, 2004; Engelbrecht y Harrington, 2005).

Penetración y Dispersión

La enfermedad “mal del machete” es llamada así porque el patógeno ingresa por las heridas causadas accidentalmente por este instrumento, ya que el hongo puede sobrevivir hasta una semana en las herramientas o puede ingresar por heridas las expuestas. El machete se utiliza para realizar la poda de las ramas bajas, brotes, deshija o deshierba, en los cafetales con mucha pendiente los trabajadores ocasionan heridas en las plantas al apoyarse o majar la base de las mismas para no caer, por las cuales puede ingresar el patógeno. También puede ingresar por heridas naturales como rajaduras ocasionadas por el viento, sequía o frío o por aberturas naturales como hidátodos o lenticelas (Tawil *et al.*, 1982; Castro, 1991; Castro *et al.*, 2003; Marín *et al.*, 2003; FAO, 2006; FNCC, 2007).

“Llaga macana” es diseminada de varias maneras, una de ellas es con el agua de riego o lluvia, especialmente en la época lluviosa que arrastra restos vegetales infectados o suelo con esporas y micelio del hongo, o el mismo salpique de la lluvia en el suelo puede infectar las heridas de las plantas. El hongo es fácilmente transportado en las herramientas y en partículas de suelo que se adhieren a los zapatos de los agricultores (Castro, 1991; Castro *et al.*, 2003; Marín *et al.*, 2003; CABI, 2004; FAO, 2006).

Por otro lado, *C. fimbriata* es utilizado para la producción de aromas frutales a partir de desechos agroindustriales, esta capacidad de producir estos aromas combinado con las ascósporas pegajosas que produce este hongo le permite utilizar a los insectos a los que está asociado como vectores, especialmente escarabajos de la familia Nitidulidae, especies de *Xyleborus* e *Hypocryphalus*, así como ácaros que promueven su dispersión. El transporte aéreo del hongo se da solamente cuando el aserrín y heces con conidias adheridas de los insectos que hacen galerías, es arrastrado por el viento hacia otras plantas. Se cree que este hongo penetra por las galerías hechas en el tronco por algunos insectos de los géneros *Platypus* y *Xyleborus* ya que las conidias pueden sobrevivir al paso por el intestino de estos insectos. Se sabe que el madero negro (*Gliricidia sepium*)

utilizado para dar sombra en algunos cafetales, hospeda a *C. fimbriata* (Vázquez, 1999; Fundación DANAC, 2002; Marín *et al.*, 2003; CABI, 2004; Castro *et al.*, 2004; Beavers, 2005).

La forma de dispersión más grave se da por la introducción de plantas, material propagativo o materiales de empaque de madera infectados entre un país y otro, e inclusive entre continentes. Sin embargo, no existe evidencia de plántulas enfermas que provengan de semillas de plantas infectadas (Grosclaude *et al.*, 1988; CABI, 2004; Thorpe *et al.*, 2005; CABI y EPPO, s.f).

Ensayos con *Ceratocystis fimbriata*

Aislamiento y Evaluación

A partir de fragmentos de callos tomados de árboles de Álamo (*Populus*) colocados en cámara húmeda a 30°C, Gremmen y de Kam (1977) obtuvieron peritecios característicos de *C. fimbriata* una semana después, los cuales fueron transferidos a agar malta para una determinación más detallada.

Marín *et al.* (2003) realizaron un estudio molecular y patogénico de las relaciones entre 50 aislamientos de 11 diferentes regiones cafetaleras en Colombia; tomaron muestras de suelo y las colocaron sobre estacas jóvenes de café sin corteza, de 5 cm de largo en cámara húmeda. Para realizar los aislamientos de fragmentos de tronco infectado, los colocaron entre rodajas de zanahoria en condiciones de alta humedad, una vez que producían ascósporas éstas eran trasladadas a agar V8 con tiamina (100 µg/l), y antibióticos (100 mg/l tetraciclina, 200 mg/l cloranfenicol y 200 mg/l penicilina). *C. fimbriata* posee una gran variabilidad patogénica entre aislamientos relacionada con la longitud y/o ancho de las lesiones y la velocidad de ocasionar la muerte vegetal, variables utilizadas para evaluar la patogenicidad de un hongo (Castro *et al.*, 2004).

Grosclaude *et al.* (1988) publicaron una nueva técnica para examinar y aislar *C. fimbriata* a partir de plantas de plátano, el cual cuenta con 2 variantes. La primera es para muestras de tamaño intermedio, consiste en tomar fragmentos de la planta a ser

evaluada y fragmento de tronco sano, colocarlos en un recipiente de 1 l que contenga 650 ml de agua y un dispositivo de aireación autoclavados. En cada recipiente se coloca una estaca sana sumergida 2 tercios de su longitud y la estaca que se desea probar completamente sumergida, después de 3 semanas a temperatura ambiente si el parásito está presente en la estaca sumergida, se verá la aparición de una mancha negra y peritecios en la parte no sumergida de la estaca sana, aunque se pueden encontrar peritecios en la parte sumergida pero en menor cantidad. Es una técnica bastante sensible que también puede ser aplicada a muestras de suelo o aserrín. La segunda variante se utiliza para muestras pequeñas, se toma una estaca y se corta a la mitad longitudinalmente, se colocan con la cara plana en un recipiente húmedo, luego se coloca una rodaja pequeña de un tronco que desee ser evaluado en la parte superior de las estacas sanas. Después de 2 semanas a temperatura ambiente, si el fragmento a evaluar está infectado con *C. fimbriata*, se observan peritecios en la cara superior del fragmento de tronco sano (Grosclaude *et al.*, 1988).

Johnson *et al.* (2005) lograron aislar varias especies de *Ceratocystis* realizando heridas en el tallo principal con un largo de 6x6 cm de diferentes hospederos del hongo, utilizando un bisturí flameado. Diez días después se tomaron muestras de la herida y se inocularon en discos de zanahoria colocados en cámara húmeda. Una vez establecidos, se tomaron aislamientos representativos de cada colección para secuenciar su ADN y análisis de alosimas, análisis de inoculación y de intersterilidad. Carvalho y Carmo (2003) también utilizaron rodajas de zanahoria para inocular 2×10^4 conidias/ml, Thorpe *et al.* 2005 reportan el uso de discos de zanahoria para el aislamiento de este hongo.

Detección

Para la detección de *C. fimbriata* se puede hacer uso de las características morfológicas más que de las sintomatológicas, por ejemplo, Ferreira *et al.* (2005) presentan una manera bastante rápida para la detección de *C. fimbriata* en eucalipto, pero que también se aplica a otras especies leñosas como el café. El método es bastante simple y consiste en realizar un corte histopatológico de tallo con navajilla en un estereoscopio, y luego buscar ascósporas en los vasos del xilema, médula y rayos medulares en un microscopio óptico común. Esto se puede realizar en aproximadamente 3.5 min, lo cual es más

rápido que realizar un corte tagencial o el uso de los métodos convencionales como el aislamiento en PDA, colocación de fragmentos de tronco entre rodajas de zanahoria o troncos de leño colocados en cámara húmeda, que toma de 4 a 5 días.

Patogenicidad

Halfeld y Nechet (2005) realizaron pruebas en plantas de lechuga con heridas y sin heridas de 35 días de edad, a las cuales se les inoculó una alícuota de 40 µl de una suspensión de conidias de 8×10^4 conidias/ml de *C. fimbriata*, depositada en la base de la planta. Las heridas fueron realizadas con una aguja utilizando 6 repeticiones y un control con agua destilada. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron en cámara húmeda por 24 horas y posteriormente en invernadero por 4 días, luego de los cuales se reaisló *C. fimbriata*. De manera similar, Tsopelas y Angelopoulos (2004) realizaron heridas en ramas de plantas de plátano de 2 años e inocularon micelio de *C. fimbriata* f.sp. *platani*, observando lesiones de 3 a 4 cm 5 semanas después, de las cuales lograron reaislar dicho patógeno.

Castro y Montoya (1997) realizaron un estudio para determinar el tiempo que una herida realizada en la deshija, permanece susceptible al ataque de *C. fimbriata* durante época seca y lluviosa. Estos autores concluyeron que las heridas ocasionadas durante la poda predisponen a la planta a ser infectada en un 80%, aunque en época seca este porcentaje disminuye; los primeros 5 días después de podar son críticos para el ingreso de este hongo en la planta.

Morfológicos

Engelbrecht y Harrington (2005) cultivaron aislamientos de *C. fimbriata* a 22-24°C y observaron esporas y micelio en un microscopio compuesto conectado a una cámara digital y un software para realizar mediciones. Se utilizaron análisis de varianza para comparar la variación morfológica entre aislamientos y poblaciones. Los aislamientos de las 3 especies de hospederos fueron indistinguibles morfológicamente, aunque sí filogenéticamente, aunque hubo pequeñas diferencias en cuanto a la presencia o

ausencia de conidias doliformes o con forma de barril y entre el tamaño de la base y cuello del peritecio.

Johnson *et al.* (2005) realizaron el cultivo de *Ceratocystis* en medio MYEA (Agar Malta-Extracto de Levadura) al igual que Thorpe *et al.* 2005, incubando a una temperatura aproximada de 23°C y luz natural. De 4 a 7 días después realizaron mediciones de endoconidias y endoconidióforos, de 7 a 10 días después midieron los peritecios y ascósporas y de 7 a 20 días las aleuroconidias. El material se observó adicionando lactofenol en un microscopio interferencial con la ayuda de un software.

Control

Cultural

Este tipo de control se refiere a las actividades agrícolas ordinarias, técnicas u opciones de manejo realizadas adecuadamente y con planeación previa, requiere de gran conocimiento. Son manipulaciones del ambiente o del sistema de producción para mejorar la obtención del cultivo, creando un ambiente menos favorable, disminuyendo o eliminando el ataque por organismos que afectan el desarrollo de la plantación (Ferro, 1996).

Control Cultural de *Ceratocystis fimbriata*

En el caso específico de la “Llaga macana” se recomienda no realizar la deshija en invierno ya que se pueden ocasionar heridas que permanecen propicias para la infección hasta por 25 días, mientras que en verano ese periodo es de 15 días. Cuando se realice esta práctica se recomienda aplicar 12 ml/l del fungicida Derosal. Se deben reemplazar los árboles jóvenes que mueren por esta enfermedad y tomar en cuenta el uso de variedades tolerantes a la enfermedad (Castro y Rivillas, 2003; Castro *et al.*, 2003).

Además se recomienda utilizar plantas provenientes de lugares donde la ocurrencia de la enfermedad sea nula o muy baja y utilizar métodos de propagación limpios. Todas las

herramientas deben ser desinfectadas con alcohol antes de iniciar las actividades, también se puede realizar con cloro al 5%, formol o formalina al 10%, 4 g/litro de Benomyl (Benlate) o Carbendazim (Bavistin), 4 cc/litro de Thiabendazol (Mertec) o Carbendazim (Derosal); se pueden aplicar antes de comenzar a utilizar las herramientas en áreas no afectadas por esta enfermedad y en las regiones afectadas desinfectando entre cada planta (Cadena *et al.*, 1985; Castro, 1991; Castro y Rivillas, 2003; CABI, 2004; FNCC, 2007; CABI y EPPO, s.f; Enríquez, s.f).

Para reducir el daño que causan los insectos en el tronco se recomienda hacer bien los cortes de la poda, cubrir las heridas y cortes con pasta bordelesa (una parte de sulfato de cobre y seis partes de cal). Una vez que ataca la enfermedad los árboles enfermos se deben eliminar con todo y raíz, siendo quemados o expuestos a los rayos solares por 3 meses. Otra opción es quemar la planta afectada en el sitio, aplicar 2 kg/m² de cal en el hoyo y desinfectar las herramientas utilizadas. Finalmente, se sugiere darle un adecuado drenaje al suelo y aplicar cobres en la base de las plantas como prevención (Bolaños, 1991; FONAIAP, 1994; Sayago, 1999; Fundación DANAC, 2002).

Químico

El control de este tipo en la agricultura se refiere al uso directo y exclusivo de sustancias químicas que sean tóxicas para el fitopatógeno que se desea combatir, es el método más utilizado. Pueden actuar inhibiendo la germinación, crecimiento o reproducción del organismo y se pueden clasificar en fungicidas, bactericidas, nematocidas, insecticidas, viricidas y herbicidas dependiendo del organismo que eliminan. Los compuestos pueden ser desde tóxicos para todos los tipos de patógenos hasta específicos para uno de ellos (Agrios, 2005).

Fungicidas

Los fungicidas se pueden clasificar basándose en varios criterios, uno de ellos es por el grupo químico al que pertenecen, por ejemplo el grupo de los fosfonatos son sistémicos, por lo que actúa dentro de la planta penetrando por los órganos de la misma por lo que tienen acción específica y no requiere de alta cobertura. Los benzotiazoles son de

contacto o residuales, se depositan sobre la superficie de la planta, son de acción multisitio, son de amplio espectro pero pueden ser lavados por la lluvia o riego (Sarmiento, 2004).

Control Químico de *Ceratocystis fimbriata*

Castro y Montoya (1994) realizaron un experimento donde aplicaron dosis de diferentes fungicidas al suelo y 15 días después podaron e inocularon 60×10^2 células/ml de *C. fimbriata* en plantas de café en campo de 5 años de edad. También evaluaron los fungicidas aplicándolos en el área de corte inmediatamente después del corte e inoculación del hongo. El primer método no fue efectivo en el control de esta enfermedad y el segundo sí.

Para la desinfección del suelo o sustrato y tallo de plantas de café se ha utilizado el fungicida-bactericida de amplio espectro Butrol 31.5 EC, cuyo ingrediente activo es 2-(tiocianometiltio) benzotiazol (TCMTB) de la empresa Buckman Laboratories S.A. de C.V., en dosis de 8cc/l llenando todo el hoyo en el suelo antes de la siembra, o al momento de sembrar a 40 gramos/m^2 a la era ya preparada (Thompson, 1996; Rojas, 2005).

Este fungicida fue inscrito en 1996, es un fungicida orgánico de contacto por lo que permanece fuera de la planta protegiéndola de nuevas infecciones, no tiene efectos curativos, más bien preventivos y la duración es corta debido a su exposición al ambiente. Pertenece al grupo químico del Benzotiazol, el modo de acción es por reacción del TCMTB con grupos SH- como proteínas, inactivándolas e inhibiendo el desarrollo del hongo (Kegley *et al.*, 2007; Jardí, 2008).

El fungicida Tris-o etil-fosfonato de aluminio cuyo nombre comercial es Aliette 80 WP de la empresa BAYER CROPSCIENCE, tiene como ingrediente activo el Fosetil-aluminio (Fosetil-Al), pertenece al grupo de las sales del ácido fosfónico o alcohol fosfonato o fosfonatos. Se recomienda utilizarlo para el control de hongos oomicetes en dosis de 4.5 g/l en las hojas de las plantas, su modo de acción es sistémico tanto ascendente por el floema como descendente por el xilema; se reporta que estimula el

sistema de defensa de la planta, es decir, la resistencia sistémica adquirida, evitando la aparición de cepas resistentes, además presenta acción curativa y preventiva (BAYER CROPS SCIENCE, 2002).

El modo de acción del Fosetil-AI es complejo ya que afecta varias dianas bioquímicas, entre ellas el sistema de transporte y penetración del hongo debido a que el fosfato compite con el fosfito del hongo por los mismos transportadores de la membrana celular, el fosfato bloquea al fosfito; interfiere con el metabolismo de fosfato en el hongo, generando la acumulación de polifosfato y pirofosfato en las células, lo cual desvía el ATP de otras vías metabólicas y disminuye la respiración y el crecimiento; posee una acción fungicida directa impidiendo la formación de esporangios, la liberación de esporas y bloqueando la esporulación, además de inhibir varias enzimas clave para el crecimiento y desarrollo fúngico. Además, complementa su acción con la estimulación de la producción de sustancias de defensa de la planta actuando sobre el sistema hormonal, lo que genera la acumulación de fitoalexinas, compuestos fenólicos y enzimas líticas, lo cual unido a la lignificación de las paredes celulares y reacciones de hipersensibilidad frenan la progresión del micelio (Márquez, 2005; Landschoot y Cook, 2007).

Biológico

El control biológico es básicamente el uso de un organismo para controlar otro, es una práctica más que todo preventiva y tiene como objetivo la disminución de las plagas y enfermedades sin eliminar la población completa, logrando un equilibrio con el medio ambiente utilizando los enemigos naturales de los fitopatógenos. Éstos mantienen el nivel de la población de patógenos bajo, de manera denso-dependiente y sin ningún tipo de contaminación, es por tanto, una alternativa al control químico de las plagas y enfermedades. Es decir, el control biológico consiste en manipular ese fenómeno natural de depredación por enemigos naturales para el control de plagas y enfermedades de los cultivos (Lampkin, 1998; Vero y Mondito, 1999).

Hongos Antagonistas

Dentro de las estrategias de control biológico se encuentra el uso de hongos antagonistas, los cuales son hongos que atacan a otros organismos, incluyendo hongos fitopatógenos. Los hongos antagonistas fúngicos utilizan diferentes mecanismos de antagonismo como micoparasitismo, inducción de tolerancia a la planta y tolerancia al estrés, competencia por nutrientes y espacio, secreción de inactivadores del sistema de infección del patógeno y enzimas que hidrolizan las paredes de estos, secreción de antibióticos y sideróforos y sus receptores (Vero y Mondito, 1999; Pérez, 2005).

Trichoderma

El hongo antagonista que ha sido más ampliamente estudiado como biocontrolador ha sido *Trichoderma* sp., éste género pertenece a la clase Deuteromicete u hongo imperfecto, por tanto solamente se conoce su reproducción asexual por conidios, en su estado imperfecto presenta micelio simple y haploide. Es anaerobio facultativo, se encuentra naturalmente en la mayoría de los suelos agrícolas, especialmente en los que poseen un alto contenido de materia orgánica (Piedra, 2002; Páez *et al.*, 2006).

Trichoderma ha sido ampliamente utilizado debido a que presenta una serie de características que lo hacen ideal para su uso como bioantagonista, es hiperparásito, su tasa de crecimiento y desarrollo es rápida, produce gran cantidad de enzimas inducidas por hongos fitopatógenos, tiene la habilidad de desarrollarse en distintos sustratos, tolerancia a condiciones de estrés ambiental y a químicos, así como una gran variabilidad. Hasta el momento no se han reportado casos de ataque a plantas por parte de este hongo, su modo de acción consiste en extraer los nutrientes de los hongos que degrada, así como celulosa y lignina de materiales orgánicos, requiere de bastante humedad para germinar. Existen más de 30 especies de este hongo, las más conocidas son *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* (ORIOUS, 2004; Páez *et al.*, 2006).

Control Biológico de *Ceratocystis fimbriata*

En general el control de la “Llaga macana” es básicamente preventivo, tanto del tipo cultural, químico y biológico. Como control biológico de esta enfermedad se ha utilizado con éxito de 5 a 10 g de TRICHO-D WP por litro de agua, que es una formulación del hongo antagonista *Trichoderma harzianum*, se recomienda aplicar después de podar a la base del tallo. Este producto no es compatible con fungicidas, no es fitotóxico y no expira (Castro y Rivillas, 2003; ORIUS, 2004).

Castro y Rivillas (2003) publicaron un ensayo en el cual realizaron la deshija de plantas de Caturra, aplicaron 0.17 ml del fungicida Derosal (12 ml/l) en el sitio de corte y 0.17 ml/corte de Tricho-D (10 g/l) en otras plantas cortadas. Las estacas cortadas se colocaron en cámara húmeda por 48 horas después de aplicar el fungicida y el hongo antagonista, luego se inoculó 200 µl por estaca de 8.500 ascósporas/ml de *C. fimbriata*. Después de 6 meses retiraron la corteza de las plantas en campo, se evaluaron los síntomas y se llevaron muestras al laboratorio donde confirmaron la presencia de *C. fimbriata* inoculándolas en rodajas de zanahoria. Determinaron que la incidencia de la enfermedad en campo fue de un 9.1% al aplicar Derosal, 6.8% con Tricho-D y 44.4% en el testigo; en las estacas infectadas en laboratorio fue de 6.8% con Derosal, 18.1% con Tricho-D y 83 y 56.8% en los testigos, evidenciando la utilidad del control preventivo con *T. harzianum*.

OBJETIVOS

Objetivo General

➤ Evaluar la patogenicidad de aislamientos del hongo *Ceratocystis fimbriata* y su control químico y biológico, en las variedades comerciales de café Caturra y Catuaí rojo.

Objetivos específicos

➤ Establecer cultivos axénicos de doce aislamientos de *Ceratocystis fimbriata*, realizando subcultivos en medio PDA acidificado.

➤ Establecer una matriz líquida axénica de diez aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* realizando subcultivos en medio líquido de levadura.

➤ Evaluar la patogenicidad de diez aislamientos del hongo *Ceratocystis fimbriata*, infectando estacas de las variedades comerciales de café Caturra y Catuaí rojo.

➤ Caracterizar morfológicamente doce aislamientos de *Ceratocystis fimbriata in vitro*, realizando mediciones y observaciones del crecimiento del hongo en medio PDA.

➤ Determinar la sensibilidad al fungicida Butrol 31.5 EC (TCMTB) de doce aislamientos de *Ceratocystis fimbriata in vitro*, realizando mediciones del crecimiento del hongo en medio PDA con distintas concentraciones del fungicida.

➤ Evaluar el control que ejerce *Trichoderma* sp. en *Ceratocystis fimbriata* realizando inoculaciones en suelo.

➤ Seleccionar un aislamiento de *Ceratocystis fimbriata* para determinar su infección, inoculando plantas de la variedad de café Caturra.

➤ Definir diversas formas de inhibición del crecimiento del aislamiento seleccionado de *Ceratocystis fimbriata*, probando formulaciones de *Trichoderma* sp., Aliette 80 WP (Fosetil-Al) y Butrol 31.5 EC (TCMTB).

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de fitopatología y el invernadero del Centro de Investigaciones en Café (CICAFE), ubicadas en San Pedro de Barva de Heredia, desde el 1 de julio del 2007 al 30 de enero del 2008.

Evaluación morfológica de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata*

Establecimiento de los aislamientos

Para establecer el cultivo puro del aislamiento CF81 se tomaron troncos infectados con *C. fimbriata* traídos de campo, se lavaron con agua del tubo y se les removió la corteza utilizando un cuchillo hasta observar manchas negras características de la enfermedad. Se colocaron los troncos en una cámara húmeda que consistía en una caja plástica de 21 cm de ancho por 29 cm de largo por 7 cm de alto, con una servilleta humedecida con 100 ml de agua destilada en el fondo, un soporte de cedazo y tapa plástica (figura 4), la cual se colocó en un cuarto a $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para favorecer el desarrollo de *C. fimbriata*.

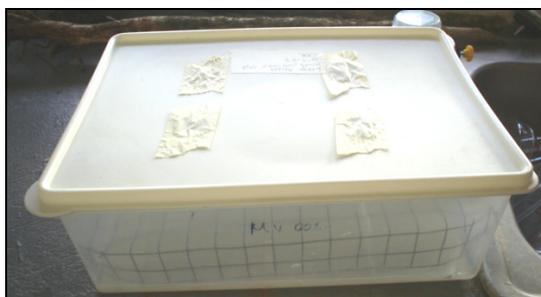


Figura 4. Cámara húmeda utilizada para promover el crecimiento de *Ceratocystis fimbriata*.

Dos días después de colocar los fragmentos de tronco en cámara húmeda se observó el crecimiento de micelio gris y lesiones negras en los mismos (figura 5), una semana después se observó la aparición de ascosporangios característicos de *C. fimbriata*, lo cual se confirmó al estereoscopio (Figura 1). Se tomaron ascosporangios de los troncos con un asa micológica estéril y se inocularon en placas conteniendo PDA (Agar Papa

Dextrosa) suplementado con antibiótico, las cuales inicialmente se inoculaban fuera de la cámara de transferencia, pero se obtenía una contaminación muy alta debido a bacterias y otros hongos.



Figura 5. Troncos de café infectados con *Ceratocystis fimbriata*.

Se repitió el procedimiento realizado a los troncos, esta vez se inocularon los ascosporangios dentro de la cámara de transferencia, en rodajas de zanahoria la cual había sido lavada con agua y jabón antibacterial y flameada, se colocaron en una cámara húmeda, cinco días después se observó el crecimiento de *C. fimbriata* (Figura 6). Luego se trasladaron los ascosporangios desarrollados en la zanahoria a placas con PDA con antibiótico utilizando un asa micológica estéril dentro de una cámara de transferencia, se sellaron las placas y se llevaron a un cuarto de crecimiento a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y 75-85% HR durante una semana.



Figura 6. Crecimiento de *Ceratocystis fimbriata* en una rodaja de zanahoria.

Con excepción del aislamiento CF81, los demás aislamientos fueron tomados de la colección del laboratorio de Fitopatología del CICAPE (cuadro 1), los cuales se encontraban contaminados, por lo que se inocularon en rodajas de zanahoria de la misma manera que se realizó para el aislamiento de CF81. Se preparó medio PDA de

distintas maneras, dentro de una cámara de transferencia agregando 39 g de PDA por litro de agua destilada, 1) a pH 5.6 sin antibiótico, donde los aislamientos presentaron una alta cantidad de contaminación debido a bacterias y levaduras, 2) acidificado con ácido láctico a pH 5.1 y con 3 gotas de oxitetraciclina una vez que el PDA estaba solidificado en las placas, aunque se continuaba presentando contaminación con bacterias y 3) a pH 5.1 agregando 250 mg/l del antibiótico amoxicilina cuando el PDA se encontraba aproximadamente a 25°C, antes de verterlo en las placas. Todas las formulaciones se autoclavaron por 25 minutos, se dispensaron 25 ml en placas petri estéril y se dejaron solidificar.

Cuadro 1. Colección de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* del CICAPE utilizados en la investigación.

Código	Fecha colecta	Provincia	Cantón	Distrito	Localidad	Altura
CF10	26/09/2006	Heredia	Santa Bárbara	Puraba	Guararí	1655
CF11	26/09/2006	Heredia	Santa Bárbara	Puraba	Guararí	1655
CF12	27/09/2006	Alajuela	Poás	Sabana Redonda	Centro	1450
CF13	27/09/2006	Alajuela	Poás	Sabana Redonda	Centro	1450
CF14	27/09/2006	Alajuela	Poás	Sabana Redonda	Centro	1450
CF15	27/09/2006	Alajuela	Poás	Sabana Redonda	Centro	1450
CF26	26/09/2006	Alajuela	Central	Sabanilla	Finca Alsácea	1360
CF30	26/09/2006	Alajuela	Central	Carrizal	Carretera	1400
CF53	27/10/2006	San José	Pérez Zeledón	San Pedro	Centro	800
CF54	27/10/2006	San José	Pérez Zeledón	San Pedro	Centro	800
CF67	14/11/2006	Cartago	Unión	Tres Ríos	Escuela Juan XXIII	1450
CF81	05/08/2007	Heredia	Barva	Getsemaní	Centro	1300

Fuente: CICAPE, 2007.

Una vez obtenidos ascospangios en zanahoria de los aislamientos se trasladaron a PDA con amoxicilina, de esta manera se logró obtener el cultivo puro de todos los aislamientos. Una vez establecidos los aislamientos en PDA se tomaron círculos de 0.95 cm de diámetro de medio conteniendo micelio de cada uno de los doce

aislamientos, utilizando un sacabocados, se colocó un círculo por placa con PDA suplementado con antibiótico, realizando seis repeticiones por aislamiento. Se sellaron las placas y se colocaron en un cuarto a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y 75-85% HR (Humedad Relativa) durante veinte días.

Evaluación y Análisis

Los aislamientos se evaluaron midiendo el crecimiento radial, para lo que se utilizó una regla común, tres días por semana durante dos semanas, también se determinó el color micelial y el patrón de producción de ascosporangios de cada uno. Se realizó un análisis de regresión de los resultados con el programa Microsoft Excel.

Evaluación de la agresividad de *Ceratocystis fimbriata* en estacas de café

Aislamientos

Para estandarizar la edad de los cultivos se tomaron ascosporangios o micelio de los aislamientos CF11, CF12, CF13, CF15, CF26, CF30, CF53, CF54, CF67 y CF81, se colocaron en PDA utilizando una asa micológica estéril, cada aislamiento en placas separadas. Se llevaron a un cuarto de crecimiento a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y 75-85% HR hasta observar el desarrollo de *C. fimbriata*.

Una vez establecidos los aislamientos en PDA se realizó el cultivo del hongo en medio líquido compuesto por 1 g de extracto de levadura y 4 g de sacarosa por cada 50 ml de agua destilada, a pH 5.1 agregando ácido láctico, los cuales se autoclavaron por 25 minutos y se dejaron enfriar. En una cámara de flujo laminar se tomó una asada de micelio o ascosporangios de cada aislamiento establecido en PDA, utilizando una asa micológica estéril y se colocó en un erlenmeyer conteniendo el medio líquido de levadura, finalmente se colocó cada frasco (uno por aislamiento) en agitación a 1500 r.p.m. en un agitador orbital (Lab-line) durante cinco días.

Inicialmente cuando se observaron los aislamientos de *C. fimbriata* en el microscopio se detectó la presencia de bacterias, las cuales impedían el adecuado crecimiento del

hongo, lo cual se evidenciaba inclusive en el color del medio líquido, en donde los medios no contaminados presentaban un color café con apariencia translúcida, mientras que los contaminados se veían de un color café claro con una apariencia lechosa. Una vez que se obtuvo el cultivo puro de los aislamientos en PDA, se logró el crecimiento adecuado en medio líquido y se observaron las estructuras de las conidias y esporas típicas de *C. fimbriata* al microscopio (Figura 7).

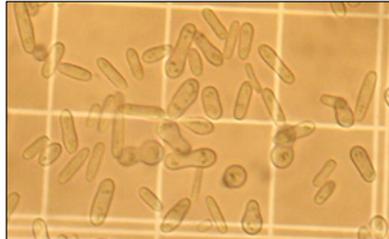


Figura 7. Estructuras típicas de *C. fimbriata* vistas al microscopio (40X).

Preparación de las estacas de café

Se cortaron 66 estacas de hijos de plantas adultas de las variedades de café Caturra y Catuai rojo, para un total de 198 estacas, utilizando tijeras de podar previamente desinfectadas con alcohol al 70%. Las plantas utilizadas corresponden a la colección mantenida en las fincas del CICAPE en San Pedro de Barva de Heredia, las cuales tienen edades de entre 8 y 15 años. Cada estaca medía 15 cm de largo y 1 cm de diámetro, se retiró la corteza de la mitad de cada estaca (figura 8) con un cuchillo desinfectado con alcohol al 70%, se colocaron 6 estacas de cada variedad en una cámara húmeda utilizando una cámara por aislamiento y un control, para un total de once cámaras.



Figura 8. Estacas de café descortezadas a la mitad.

Las cámaras húmedas consistían de cajas plásticas transparentes de 37 cm de largo por 26.5 cm de ancho por 15.5 cm de profundidad, tapadas y con un papel toalla en el fondo, al cual se le agregó 200 ml de agua destilada para proporcionar humedad. Se pusieron dos niveles de rejillas metálicas (cedazo) sobre los que se colocaron las estacas, el primero de 2.5 cm de alto por 33.5 cm de largo por 21.5 cm de ancho, el segundo de 7.5 cm de alto por 33.5 cm de largo por 24 cm de ancho (Figura 9).

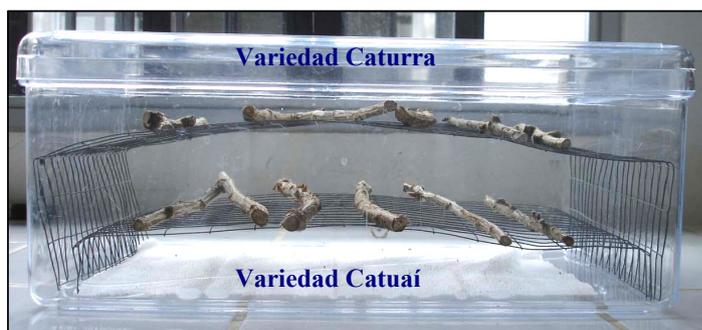


Figura 9. Cámara húmeda utilizada para promover el crecimiento de *Ceratocystis fimbriata* en estacas de café, se identifica la distribución de las variedades.

Preparación del inóculo

Para determinar el número de esporas y conidias (células) del hongo por mililitro de matriz líquida, se tomaron muestras de 1.5 ml de las mismas dentro de la cámara de flujo laminar, utilizando micropipetas de 1000 μ l, se depositó el líquido en tubos para microcentrifuga (eppendorf) estériles, uno para cada aislamiento. Luego, se tomaron 20 μ l de cada tubo y se depositaron en una cámara de Neubauer utilizando una micropipeta, la cual se colocó en un microscopio óptico (Olimpos CX31), utilizando el aumento 40x se contaron las células del retículo central (cuatro esquinas y el centro). Realizando lo mismo para cada aislamiento, luego se determinó el número de células 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.

Una vez determinada la concentración de cada aislamiento se estandarizó a 2.75×10^5 células/ml para todos los aislamientos, en un tubo eppendorf estéril agregando agua destilada estéril. La cantidad de inóculo y de agua específica para cada aislamiento que se agregó se calculó con la fórmula:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Donde, C_1 = Concentración de la matriz líquida

V_1 = Volumen de matriz líquida

C_2 = Concentración del inóculo

V_2 = Volumen del inóculo.

Se inocularon seis estacas de cada variedad con 10 μ l de medio líquido del aislamiento respectivo en la parte descortezada una vez que estaban colocadas en la cámara húmeda, utilizando una micropipeta y puntas estériles.

Evaluación y Análisis

Se realizaron mediciones periódicas tres días por semana durante dos semanas donde se midió la longitud de crecimiento del micelio del hongo en la estaca, utilizando una regla común y se determinó el porcentaje relativo de peritecios en cada estaca. Este ensayo se realizó por duplicado, para evaluar la patogenicidad de cada aislamiento se determinó la tasa de crecimiento diaria utilizando un análisis de regresión con el programa Microsoft Excel.

Evaluación de la sensibilidad de *Ceratocystis fimbriata* a Butrol 31.5 EC

Establecimiento de los aislamientos

A partir de los aislamientos preestablecidos en PDA se cortaron bocados de 0.95 cm de medio de cada aislamiento de *C. fimbriata* utilizando un sacabocados, se colocó un bocado de cada aislamiento en el centro de una placa, realizando 2 repeticiones para

cada concentración de Butrol 31.5 EC, las cuales fueron de 0, 0.1, 1, 10 y 100 ppm, se sellaron las placas y se colocaron en un cuarto a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y 75-85% HR.

Preparación de medios

Primero se realizaron los cálculos de la cantidad de Butrol 31.5 EC y de medio de cultivo requeridos en cada erlenmeyer estéril, uno para cada concentración del producto, utilizando la fórmula $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$. Luego se preparó PDA con amoxicilina dentro de la cámara de transferencia donde se dispensó la cantidad de Butrol 31.5 EC calculada en los erlenmeyer, luego se vertió el PDA, se agitaron vigorosamente y se dispensaron 25 ml de cada concentración en placas petri.

Evaluación y Análisis

La evaluación se realizó 3 días por semana durante 2 semanas midiendo el crecimiento radial utilizando una regla común. Para realizar el análisis de los datos se utilizó una hoja de cálculo de Microsoft Excel para calcular la dosis de inhibición del 50% (EC 50) y del 90% (EC 90) del crecimiento de los 12 aislamientos de *C. fimbriata*.

Evaluación de productos biológicos y químicos

Preparación del suelo y plantas

Para realizar la evaluación del control de *C. fimbriata* utilizando *Trichoderma* sp. en suelo, se tomó tierra de la finca del CICAFFE en San Pedro de Barva de Heredia y se homogenizó utilizando un tamiz de 4 mesh, se pesaron 450 g en cada una de 12 bolsas autoclavables transparentes, se cerraron con “masking Tape”, se autoclavaron por 40 minutos con 15 minutos de secado y se dejaron enfriar.

Con el fin de evaluar los productos Butrol 31.5 EC, Aliette 80 WP y *Trichoderma* sp. en plantas de café infectadas con *C. fimbriata*, se colocaron 102 plantas sanas de 8 meses de edad provenientes de un almácigo en Pérez Zeledón en un invernadero y se

mantuvieron con riego tres veces por semana durante todo el ensayo. Cuando las plantas tenían nueve meses de edad se preparó una solución de 1 cc de Butrol 31.5 EC en 1 l de agua destilada y se asperjaron 4.5 ml de la solución directamente en el tallo de un total de 20 plantas, 10 macetas de bolsa plástica con 2 plantas cada una. También se preparó una solución de 4.5 g/l de Aliette 80 WP y se asperjaron 4.5 ml de la solución en las hojas de otras 20 plantas. Dos días después de aplicados los fungicidas se preparó un inóculo de *Trichoderma* sp. 3×10^5 células/ml y se inocularon 4 ml en el tallo de otras 10 plantas. Diez días después de inoculadas las plantas con los químicos se asperjó nuevamente Butrol 31.5 EC y Aliette 80 WP a las plantas que se habían tratado con estos fungicidas, de la misma manera en que se describió en esta sección.

Preparación del inóculo

Se inoculó *Trichoderma* sp. en PDA acidificado y con amoxicilina dentro de una cámara de transferencia casera, que consiste de una caja de cartón forrada en su interior con papel aluminio. Por otro lado se inoculó *C. fimbriata* en PDA acidificado y con amoxicilina en una cámara de flujo laminar, los inóculos se dejaron en un cuarto a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y 75-85% HR durante cinco días. Se prepararon medios líquidos de levadura como se describió anteriormente, en los cuales se inoculó *Trichoderma* sp. en la cámara de transferencia casera y *C. fimbriata* en la cámara de flujo laminar.

Para el tratamiento del suelo se dejaron 4 bolsas sin inocular (C = controles) de un total de 12, se llevaron 8 de esas bolsas a una cámara de transferencia donde se les agregó 25 ml del inóculo de *C. fimbriata* a una concentración de 3.5×10^5 células/ml (Tratamiento CF), utilizando una pipeta. Una semana después se tomaron 3 bolsas que habían sido inoculadas con *C. fimbriata* y se inocularon con 25 ml de *Trichoderma* sp. a una concentración de 3.5×10^5 células/ml en una cámara de transferencia casera (Tratamiento CF + T).

A las plantas de café, 9 días después de la aplicación de los agroquímicos y 7 de la aplicación de *Trichoderma* sp., se les realizaron heridas en forma de U invertida en el tallo (figura 10) utilizando un bisturí estéril, aproximadamente a 3 cm de la base, luego se inoculó 20 μl de una solución de 8.5×10^5 esporas/ml de *C. fimbriata* (CF15) en la

herida y se cubrieron con papel parafilm (figura 29). Posteriormente se tomaron 6 plantas y se inocularon con *Trichoderma* sp. 3×10^5 células/ml como se describió anteriormente, removiendo primero el parafilm que cubría las heridas, para luego de la inoculación volverlo a colocar.



Figura 10. Heridas en forma de U invertida realizadas a tallos de plantas de café.

Evaluación y análisis

Para evaluar el crecimiento fúngico en suelo, dentro de la cámara de transferencia se tomó aproximadamente 1 g de suelo bajo los tres tratamientos, se realizó una dilución 1/10 utilizando agua destilada estéril de cada uno. Seguidamente se tomó 20 μ l de cada dilución y se inocularon rodajas de zanahoria flameada dentro de placas petri, utilizando una micropipeta, se llevaron las placas selladas a un cuarto de crecimiento a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y 75-85% HR. Se realizaron observaciones periódicas para determinar crecimiento fúngico en las rodajas, si había dicho crecimiento se hacía un raspado a la misma con un asa bacteriológica y se colocaba en un portaobjetos para observar al microscopio óptico. Todo el procedimiento de esta sección se repitió dos veces más.

Con respecto a las plantas infectadas se llevó un registro semanal de la muerte de las mismas y de la aparición de síntomas de la enfermedad “Laga macana”.

RESULTADOS

Evaluación morfológica de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata*

A partir del análisis del crecimiento radial de los aislamientos en PDA, se obtuvo el siguiente gráfico que muestra las líneas de tendencia del crecimiento de aislamientos de *C. fimbriata*.

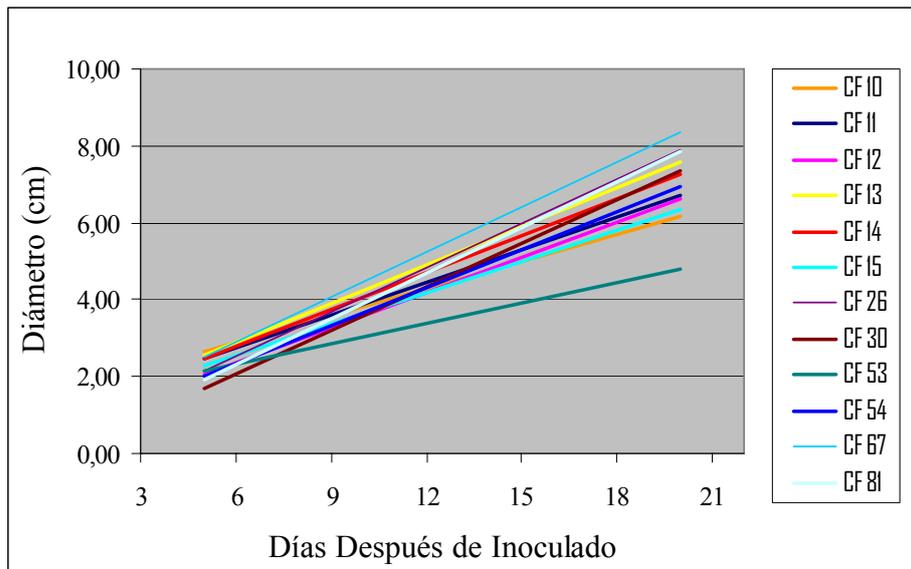


Figura 11. Tendencia del incremento radial de aislamientos de *C. fimbriata* en medio PDA.

En este gráfico se observa que el crecimiento de todos los aislamientos tiene una tasa lineal, el aislamiento que presentó la tendencia de crecimiento mayor fue CF67 al final de la evaluación, sin embargo todos los aislamientos mostraron una tendencia de crecimiento bastante similar excepto CF53, el cual tuvo una tendencia bastante más baja que los demás. El cuadro 2 resume los coeficientes de regresión del análisis de regresión realizado (Anexo 1), donde se presenta el intercepto con el eje y, el valor de x de la ecuación de la línea de tendencia del crecimiento o Tasa de Crecimiento Diaria (TCD) en cm, el coeficiente de regresión lineal y la probabilidad para cada uno de los aislamientos evaluados.

Cuadro 2. Coeficientes de regresión del crecimiento de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* en PDA.

Aislamiento	Intercepto	TCD	R ²	P
CF10	1,5098	0,2322	0,8771	0,0019
CF11	1,0805	0,2810	0,9487	0,0002
CF12	0,5144	0,3060	0,8961	0,0012
CF13	0,8562	0,3370	0,9409	0,0003
CF14	0,8723	0,3194	0,9509	0,0002
CF15	0,9246	0,2711	0,8953	0,0013
CF26	0,2116	0,3847	0,9620	0,0001
CF30	-0,2200	0,3791	0,9933	0,0000
CF53	1,2318	0,1790	0,8233	0,0048
CF54	0,3698	0,3276	0,9424	0,0003
CF67	0,5810	0,3877	0,9033	0,0010
CF81	-0,0353	0,3936	0,9600	0,0001

TCD = Tasa de Crecimiento Diaria

El aislamiento CF81 presentó la mayor TCD, seguido de CF67 y CF26, los cuales presentaron una tasa bastante similar entre ellos; la menor TCD la presentó CF53. El coeficiente de correlación para todos los aislamientos es cercano a 1. En el cuadro 3 se resume el color del micelio, producción de ascosporangios y su distribución y la presencia o ausencia de gotas (Figura 12) de los aislamientos evaluados en PDA.

Cuadro 3. Características de los aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* observadas en medio PDA.

Aislamiento	Color	Ascosporangios	Distribución micelial	Gotas
CF10	Blanco grisáceo	A	3	A
CF11	Blanco grisáceo	A	3	A
CF12	Gris verdoso	P	1-2	A
CF13	Gris verdoso	P	1-2	A
CF14	Blanco grisáceo	A	3	A
CF15	Gris verdoso	P	2	P
CF26	Gris verdoso	P	1-2	A
CF30	Gris verdoso	P	1-2	A
CF53	Café grisáceo	A	4	A
CF54	Café grisáceo	A	1-4	A
CF67	Gris verdoso	P	1-2	P
CF81	Gris verdoso	P	1-2	A

A= Ausencia; P= Presencia; 1= Crecimiento de micelio sobre peritecios y micelio inicial (figura 13); 2, 3 y 4= Ver figura 14.



Figura 12. Gotas observadas en el crecimiento en PDA del aislamiento CF67 de *C. fimbriata*.



Figura 13. Desarrollo de micelio secundario sobre peritecios y micelio inicial de *C. fimbriata* creciendo en PDA.

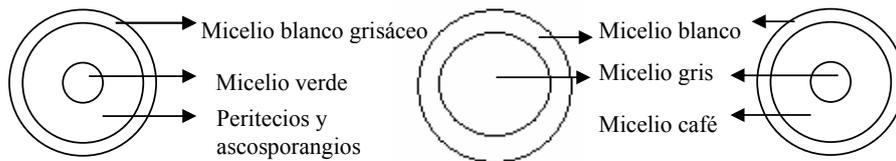


Figura 14. Diagramas de patrones de crecimiento de *C. fimbriata* en PDA codificado en el cuadro 3 como 2, 3 y 4 de izquierda a derecha respectivamente.

Evaluación de la patogenicidad de *Ceratocystis fimbriata* en estacas de café

Al tercer día después de inoculados (DDI) los aislamientos en las estacas, se observó el desarrollo de micelio blanco (figura 15A), el cual posteriormente se tornaba gris (figura 15B) para la mayoría de los aislamientos, excepto CF11, el cual permaneció de color blanco. Posteriormente se dió el desarrollo de ascosporangios y luego se observó nuevamente el crecimiento de micelio blanco sobre las demás estructuras (figura 15C), las cuales finalmente perdían viabilidad.

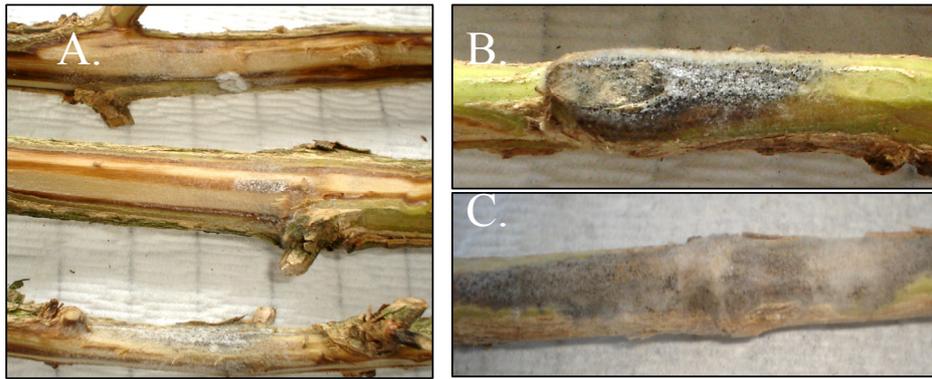


Figura 15. *Ceratocystis fimbriata* sobre estacas de café, A) micelio blanco inicial; B) posterior desarrollo de micelio gris; C) micelio blanco sobre estructuras iniciales.

Del análisis del crecimiento del micelio en las estacas se desprende el siguiente gráfico que muestra las líneas de tendencia del crecimiento de la lesión (micelio) ocasionada por aislamientos de *C. fimbriata* en estacas de café var. Caturra.

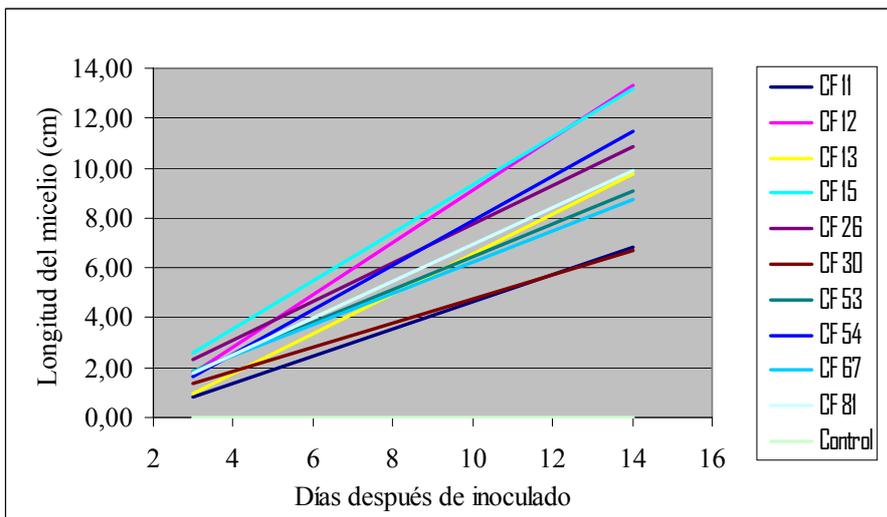


Figura 16. Líneas de tendencia del crecimiento del micelio de aislamientos de *C. fimbriata* en estacas de café var. Caturra.

En la figura 16 se observan 4 grupos de tendencia de crecimiento, el primero conformado por los aislamientos CF12 y CF15 que presentan un crecimiento más activo. Los aislamientos CF54 y CF26 se agrupan en un segundo lugar de crecimiento, luego CF81, CF13, CF53 y CF67 en un tercer lugar y finalmente CF11 y CF30 en el

último grupo con el menor crecimiento. El cuadro 4 resume los coeficientes del análisis de regresión realizado, el cual se puede apreciar completo en el Anexo 2, el intercepto de la línea de tendencia con el eje y , el valor de x de la ecuación de esa línea de tendencia el cual representa la TCD en cm, el coeficiente de correlación lineal (R^2) y la probabilidad (P) para cada aislamiento.

Cuadro 4. Coeficientes de regresión del crecimiento de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* en estacas de café var. Caturra.

Aislamiento	Intercepto	TCD	R^2	P
CF11	-0,8521	0,5501	0,9795	0,0002
CF12	-1,3888	1,0493	0,9583	0,0007
CF13	-0,4859	0,7236	0,9885	0,0000
CF15	-0,3139	0,9642	0,9716	0,0003
CF26	0,0080	0,7763	0,9697	0,0003
CF30	-0,1146	0,4884	0,9589	0,0006
CF53	-0,1381	0,6590	0,9705	0,0003
CF54	-1,0521	0,8932	0,9876	0,0001
CF67	-0,0641	0,6272	0,9706	0,0003
CF81	-0,4158	0,7360	0,9828	0,0001

TCD = Tasa de Crecimiento Diaria

El aislamiento CF12 presenta la mayor TCD, seguida de CF15 con una diferencia de 0.08 cm. La menor tasa de crecimiento la tuvo CF30 junto con CF11, que presenta una tasa de tan solo 0.06 cm mayor. El coeficiente de correlación es bastante cercano a 1 para todos los aislamientos. La tendencia del crecimiento del micelio de aislamientos de *C. fimbriata* para la variedad Catuaí rojo se observa en la figura 17.

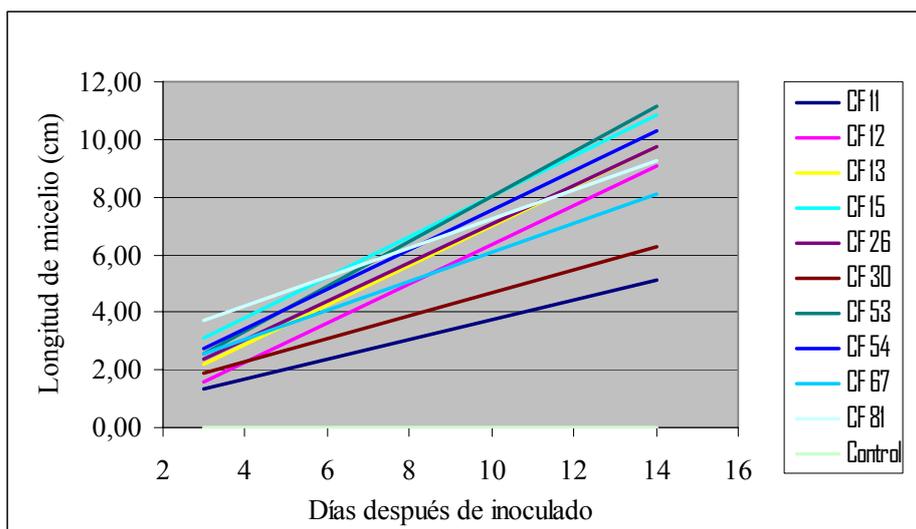


Figura 17. Líneas de tendencia del crecimiento del micelio de aislamientos de *C. fimbriata* en estacas de café var. Catuaí rojo.

En la figura 17 se observa que el aislamiento CF53 presentó lo mayor tendencia de crecimiento. Además se podrían separar 2 grupos de crecimiento, CF30 y CF11 presentan la menor tendencia de crecimiento y el resto de los aislamientos que presentan un crecimiento significativamente más alto que los dos anteriores. El cuadro 5 presenta los coeficientes del análisis de regresión realizado (Anexo 3), donde se muestra el intercepto, la TCD (cm) o valor de x , el coeficiente de correlación lineal (R^2) y la probabilidad de los aislamientos de *C. fimbriata* para la variedad Catuaí rojo.

Cuadro 5. Coeficientes de regresión del crecimiento de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* en estacas de café var. Catuaí rojo.

Aislamiento	Intercepto	TCD	R^2	P
CF11	0,2883	0,3442	0,8827	0,0054
CF12	-0,4905	0,6817	0,9860	0,0001
CF13	0,1146	0,6887	0,9280	0,0020
CF15	0,9741	0,7064	0,9826	0,0001
CF26	0,3427	0,6716	0,9615	0,0006
CF30	0,6576	0,4017	0,9592	0,0006
CF53	0,2195	0,7814	0,9786	0,0002
CF54	0,6675	0,6882	0,9632	0,0005
CF67	1,0374	0,5047	0,9297	0,0019
CF81	2,1802	0,5067	0,7637	0,0228

TCD = Tasa de Crecimiento Diaria

El aislamiento CF53 presenta la mayor tendencia de crecimiento, CF11 fue el de menor crecimiento seguido de CF30 que tiene una TCD tan sólo 0.05 cm mayor que CF11.

A partir del tercer DDI se observó el desarrollo de peritecios y ascosporangios en las estacas de café como se observa en la figura 18. Con respecto al porcentaje relativo de peritecios que se desarrollaron en cada variedad de café se presentan las figuras 19 y 20.



Figura 18. Ascosporangios de *Ceratocystis fimbriata* sobre una estaca de café.

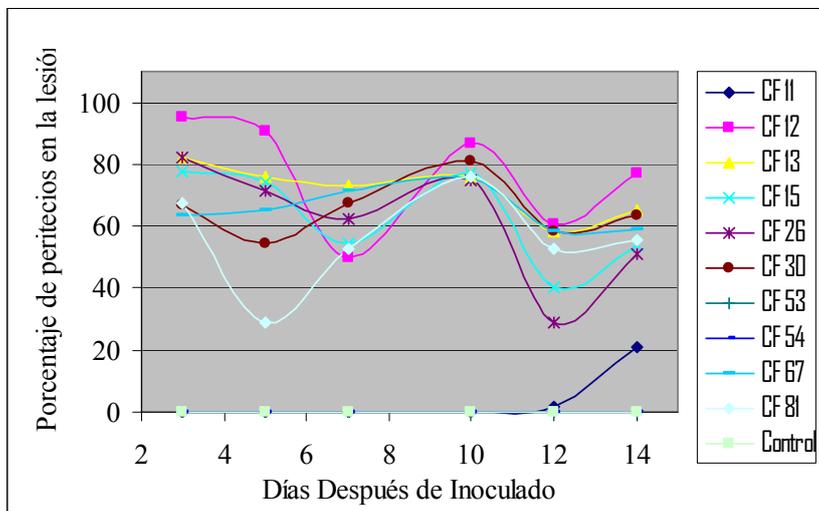


Figura 19. Porcentaje relativo de peritecios de aislamientos de *C. fimbriata* en estacas de café var. Caturra.

En la figura 19 se observa que CF12 inició y finalizó presentando el mayor porcentaje relativo de peritecios en la lesión de las estacas, pero presentó, al igual que los demás aislamientos, una alta fluctuación en el porcentaje de los mismos durante las evaluaciones. El control y los aislamientos CF54 y CF53 no presentaron peritecios en las lesiones, en CF11 se visualizaron a partir del día 12 de evaluación. En la figura 20 se observa el porcentaje de peritecios en las estacas de Catuai rojo.

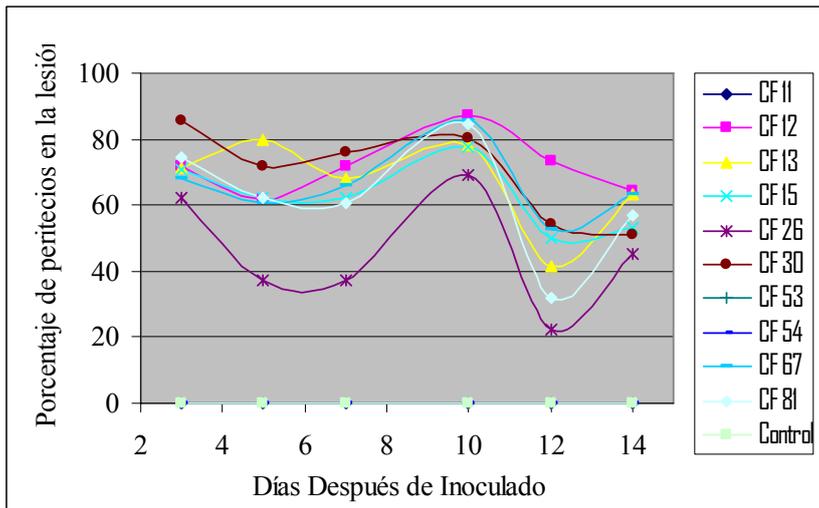


Figura 20. Porcentaje de peritecios de aislamientos de *C. fimbriata* en estacas de café var. Catuaí rojo.

En la figura 20 se observa que CF30 inició con el mayor porcentaje relativo de peritecios en la lesión, pero para las últimas 3 evaluaciones CF12 presentó el mayor porcentaje de peritecios; el control y los aislamientos CF53, CF54 y CF11 no presentaron peritecios.

Evaluación de la sensibilidad de *Ceratocystis fimbriata* a Butrol 31.5 EC

Después de analizar los datos de la sensibilidad de los aislamientos a Butrol 31.5 EC, se determinó la dosis necesaria para inhibir el 50 (EC 50) y 90% (EC 90) del crecimiento de doce aislamientos de *C. fimbriata*, así como el coeficiente de correlación los cuales se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Dosis de Butrol 31.5 EC en ppm requerida para la inhibición del 50% y 90% del crecimiento de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata*.

Aislamiento	EC ₅₀	EC ₉₀	R ²
CF10	5,69	26,21	0,87
CF11	6,46	32,53	0,91
CF12	11,29	36,48	0,90
CF13	13,06	37,92	0,89
CF14	12,60	37,38	0,89
CF15	4,59	27,92	0,87
CF26	4,72	25,63	0,87
CF30	12,97	26,02	0,79
CF53	12,19	34,99	0,90
CF54	4,71	26,25	0,88
CF67	10,67	33,60	0,90
CF81	47,99	107,82	0,79

El aislamiento que requiere de una menor cantidad de Butrol 31.5 EC para inhibir su crecimiento en un 50% es CF15, ya que como se observa en el cuadro 6 requiere de 4.59 ppm, el que necesita de una mayor cantidad es CF81 con 47,99 ppm. En cuanto a la inhibición del 90% del crecimiento CF26 es el que requiere la menor cantidad, 25.63 ppm y CF81 es también el mayor, ya que necesita 107,82 ppm. El R² está entre 0.79-0.91. Seguidamente se presenta el gráfico que muestra en qué rangos de dosis de i.a (ingrediente activo) se encuentra la población analizada para inhibir el 50% y 90% del crecimiento de la población de aislamientos.

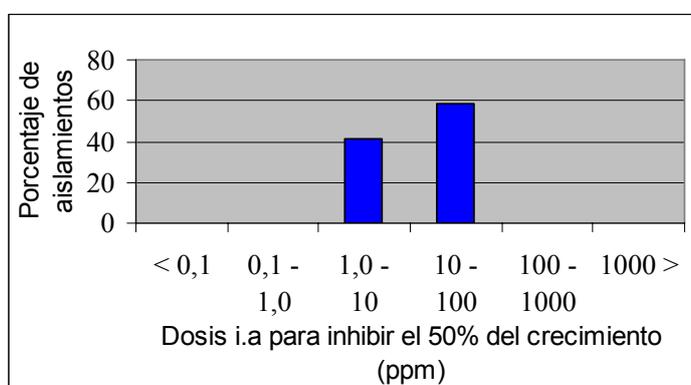


Figura 21. Dosis de i.a de Butrol 31.5 EC necesario para inhibir el 50% del crecimiento de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata*.

En la figura 21 se muestra que el 58% de la población de aislamientos de *C. fimbriata* requiere de 10-100 ppm de i.a para inhibir el 50% del crecimiento de los mismos. El 42% restante se encuentra en el rango de 1.0-10 ppm. La figura 22 presenta las dosis que necesitan los aislamientos del hongo para inhibir el 90% de su crecimiento.

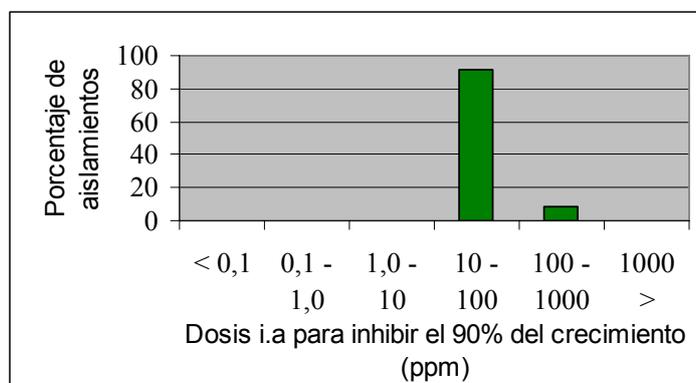


Figura 22. Dosis de i.a de Butrol 31.5 EC necesario para inhibir el 90% del crecimiento de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata*.

En la figura 22 se observa que el 92% de los aislamientos evaluados requieren de dosis de 10-100 ppm para que se inhiba el 90% de su crecimiento, el restante 8% requiere de 100 a 1000 ppm.

Evaluación de productos biológicos y químicos

Con respecto a la evaluación del control de *C. fimbriata* con *Trichoderma* sp. en suelo, se presenta el cuadro 7 que resume las observaciones realizadas a las rodajas de zanahoria inoculadas con diluciones de suelo.

Cuadro 7. Observaciones del crecimiento de diluciones de suelo bajo diferentes tratamientos en rodajas de zanahoria.

DDI	Tratamiento		
	Control	CF	CF + T
11	Sin crecimiento fúngico	ascosporangios y micelio gris	-
15	Sin crecimiento fúngico	ascosporangios y micelio gris	ascosporangios y micelio gris
17	Sin crecimiento fúngico	ascosporangios y micelio gris	ascosporangios y micelio gris (Figura 23)
20	Sin crecimiento fúngico	ascosporangios y micelio gris	Micelio verde (Figura 24A)
26	Sin crecimiento fúngico	ascosporangios y micelio gris	Micelio verde y blanco (Figura 24B)

DDI= días después de inoculado el suelo; CF= Suelo inoculado con *C. fimbriata*; CF+T Suelo inoculado con *C. fimbriata* y a los 6 días con *Trichoderma* sp.

Como se aprecia en el cuadro 7 en las rodajas de zanahoria inoculadas con la tierra control, no hubo crecimiento fúngico. En el tratamiento CF, suelo inoculado con *C. fimbriata*, hubo crecimiento de este hongo, como se evidencia en la figura 23; en el tratamiento CF + T, suelo inoculado con *C. fimbriata* y *Trichoderma*, se observó el crecimiento de *C. fimbriata* hasta el día 17, luego se evidencia el desarrollo y predominancia de *Trichoderma* en la figura 24.



Figura 23. Desarrollo típico de *C. fimbriata* en rodajas de zanahoria inoculadas con suelo.

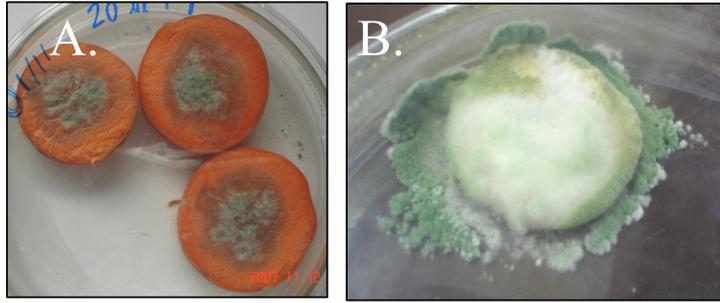


Figura 24. Desarrollo típico de *Trichoderma* sp. en rodajas de zanahoria inoculadas con suelo
A) a los 20 días de inoculado, B) a los 26 días de inoculado.

Cuando se observó el crecimiento fúngico en las rodajas de zanahoria se realizó un raspado para ser visto al microscopio, donde se observaron estructuras típicas de los hongos. En las rodajas de zanahoria con micelio gris y ascosporangios se observó lo que se muestra en la figura 25, en las rodajas de zanahoria con crecimiento de micelio verde y blanco se observó lo que se presenta en la figura 26.

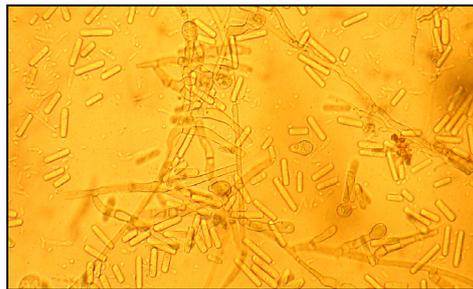


Figura 25. Estructuras típicas de *Ceratocystis fimbriata* observadas al microscopio óptico (40x) provenientes del crecimiento del hongo en rodajas de zanahoria.

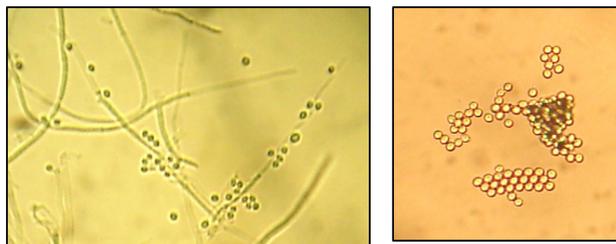


Figura 26. Estructuras típicas de *Trichoderma* sp. observadas al microscopio óptico (40x) provenientes del crecimiento del hongo en rodajas de zanahoria.

Con respecto al tratamiento de las plantas de café se observaron síntomas de clorosis (figura 27), marchitamiento parcial de hojas (figura 28), desarrollo de micelio gris en el tallo (figura 29) y marchitez total de la planta (figura 30). Al último día de evaluación se contaron 4 plantas con marchitez total y 61 plantas con los demás síntomas mencionados.



Figura 27. Plantas de café con clorosis en las hojas a los 15 días de inoculadas con *C. fimbriata*.



Figura 28. Plantas de café con marchitamiento de hojas bajas a los 15 días de inoculadas con *C. fimbriata*.



Figura 29. Tallo de café con desarrollo de micelio gris en una herida y tallo con una herida cubierta con papel parafilm.



Figura 30. Plantas de café con marchitamiento total de hojas a los 15 días de inoculadas con *C. fimbriata*.

DISCUSION DE RESULTADOS

Evaluación morfológica de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata*

Al realizar esta evaluación los platos petri se colocaron en un cuarto a 22°C y 75-85% HR, ya que esas son condiciones favorables para el crecimiento de *C. fimbriata* según Marín *et al.* (2003). La TCD calculada para los aislamientos se haya entre 0.36 y 0.44 cm/día, para un promedio de 0.38 cm/día, lo que se encuentra dentro del ámbito normal reportado para este hongo. EPPO (2003) reporta una tasa de crecimiento de 0.3-0.5 cm/día en PDA a 24°C y Marín *et al.* (2003) reporta 0.41-0.68 cm/día, con un promedio de 0.51 cm/día.

Tomando en cuenta las características observadas se podrían separar los aislamientos en 3 grupos, 1) CF10, CF11 y CF14 que no presentan peritecios y su micelio es blanco grisáceo, lo que podría deberse a que son aislamientos de *Chalara*, en los cuales es característico el desarrollo de endoconidias que generan un color gris blancuzco en la superficie del cultivo según lo mencionan Halfeld y Nechet (2005). 2) CF12, CF13, CF15, CF26, CF30, CF67 y CF81, que presentaban peritecios y un micelio similar entre ellos, característico de *C. fimbriata*. 3) CF53 y CF54, los cuales provienen del mismo sitio, no producen ascosporangios y su micelio es similar al del segundo grupo. Sin embargo, estas características no presentan ninguna relación con el sitio donde fueron muestreados o la TCD en PDA.

Aunque no se logró establecer ninguna relación entre las características morfológicas y los demás factores evaluados, se cumplió con el objetivo de realizar la descripción morfológica de los aislamientos, la cual se podría complementar con una posterior caracterización molecular de los mismos.

Evaluación de la patogenicidad de *Ceratocystis fimbriata* en estacas de café

Inicialmente se intentó aislar el hongo trasladando ascosporangios de troncos directamente al medio PDA, los cuales además de estar infectados con *C. fimbriata* contenían gran cantidad de microorganismos como bacterias y otros hongos en la superficie, por lo que al inocular los ascosporangios en PDA también se inoculaban estos otros microorganismos; CABI (2004) reporta que es común la contaminación de *C. fimbriata* proveniente de campo con otros hongos y bacterias.

EPPO (2003) reporta que *C. fimbriata* crece bien en PDA pero debido a que no se trata de un medio selectivo para este hongo, permitía el desarrollo de la microflora acompañante. Es por esto que se modificó el procedimiento y antes de inocular en PDA se realizó el inóculo en zanahoria, pues ésta se compone de floema (parte externa) rico en sólidos y azúcares, y xilema (corazón), lo que promueve el desarrollo de *C. fimbriata*, pues se trata de un hongo que invade y se desplaza a través del sistema vascular, de manera que los tejidos de este vegetal actúan como sustrato selectivo para este hongo. Marín *et al.* (2003) afirman que el mejor método para obtener *C. fimbriata* de muestras de campo es utilizar el método de discos de zanahoria utilizado en esta investigación (Gómez *et al.*, 2002; Alessandro, 2006).

Posteriormente se trasladaron ascosporangios a PDA con un pH más bajo al inicial y conteniendo amoxicilina con el fin de impedir el crecimiento bacteriano, ya que según Madigan *et al.* (2004) los hongos son más acidófilos que las bacterias y la mayoría crecen de forma óptima a pH 5 o inferior. El antibiótico empleado es un derivado de la ampicilina que inhibe la síntesis de la pared, división y crecimiento bacteriano con un amplio espectro, lo que permitió la obtención de todos los aislamientos del hongo libres de bacterias en medio PDA, indispensable para el establecimiento de matrices axénicas en medio líquido que posteriormente se utilizó para el inóculo de las estacas. Los inóculos de los aislamientos se utilizaron en la misma concentración en ambas repeticiones del ensayo, ya que el objetivo era evaluar la capacidad de infección de cada uno, por lo que ninguno debía tener ventaja en cuanto a la cantidad de células infectivas iniciales inoculadas (Farmacias Ahumada, 2007).

Una vez realizado el inóculo de las estacas se comenzó a observar el crecimiento fúngico inicialmente como micelio blanco, luego se desarrollaron peritecios de color negro debajo del micelio blanco, en esta etapa se observó la lesión de color gris posiblemente debido a la producción de endoconidias como lo reportan Engelbrecht y Harrington (2005). Posteriormente los peritecios produjeron ascosporangios de color anaranjado en la punta, todas estas estructuras son típicas de *C. fimbriata* como lo mencionan EPPO (2003) y Halfeld y Nechet (2005). Solamente el aislamiento CF11 no presentó este mismo desarrollo en las estacas, el micelio blanco continuó creciendo sin ninguna variación de color, lo cual puede deberse a que este aislamiento corresponda a la idioforma MAT-1 del hongo, la cual es infértil y por tanto no produce peritecios. Además, Engelbrecht y Harrington (2005) afirman que la mayoría de los aislamientos de campo son del tipo MAT-2 o autofértil, por lo tanto presentan peritecios, como lo hicieron el resto de los aislamientos evaluados.

El R^2 para la ecuación de la línea de crecimiento de cada aislamiento es bastante cercano a 1, esto indica que los datos originados por la ecuación de cada línea están fuertemente relacionados con los datos originales (Steel y Torrie, 1989).

Con respecto a las diferencias en las TCD presentadas por los 10 aislamientos evaluados, se propone una serie de explicaciones. Primero se debe saber que las plantas tienen varios mecanismos de defensa contra los hongos patógenos, uno de ellos es la producción de sustancias inhibitoras del crecimiento como fenoles fungicotóxicos, los cuales se producen en mayor cantidad en el momento de la infección, uno de ellos es el ácido clorogénico. Este ácido es responsable de la resistencia genética del cacao y el café a *C. fimbriata* en ciertas variedades, además es una parte importante del sabor del café, lo cual es utilizado por el ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica) para evaluar la calidad del mismo, éste, entre otros factores, varía con la especie, lo cual puede explicar porqué el aislamiento que tuvo una mayor tendencia de crecimiento en las estacas de la variedad Caturra (CF12) no fue el mismo que en Catuai (CF53) (García *et al.*, 2005; Solís y Herrera, 2005; Cruz *et al.*, 2006).

Ma *et al.* (2007) demostraron la actividad antifúngica de la mayoría de los derivados de ácido clorogénico y comprobaron que el modo de acción de estos ácidos se debe a la inhibición de 1,3- β glucano sintasa y 1,6- β glucano sintasa, enzimas esenciales para la

biosíntesis del glucano, componente de la pared celular de los hongos. Además, sugieren otro modo de acción, que consiste en el incremento de la permeabilidad de la pared fúngica por medio de la imitación de este ácido de la proteína bactericida que incrementa la permeabilidad.

El aislamiento CF15 tuvo la segunda tasa de crecimiento más alta en Caturra y Catuaí, por lo que se deduce que la diferencia en el contenido de ácido clorogénico de ambas variedades no inhibe la enzima para la síntesis de glucano de este aislamiento. En cambio, CF53 tiene una mayor capacidad de infectar Catuaí posiblemente porque el contenido de éste ácido no perjudica su desarrollo en ella, sin embargo el de Caturra lo hace de manera moderada, ya que tuvo un crecimiento medio-bajo en ésta variedad. Las 2 menores tasas de crecimiento en ambas variedades fue presentada por los aislamientos CF11 y CF30, lo que quiere decir que el contenido de ácido de ambas variedades inhibe la 1,3- β glucano sintasa o 1,6- β glucano sintasa de éstos. Krokene y Solheim (2001) publicaron la pérdida de patogenicidad y cambios morfológicos de aislamientos de *Ceratocystis polonica* tras el cultivo consecutivo en medio artificial de los mismos, lo que también podría relacionarse con la baja agresividad demostrada por CF11 y CF30.

El aislamiento CF15 podría presentar gen(es) de virulencia para gen(es) de resistencia de ambas variedades para “Llaga macana”, por lo que es capaz de colonizar ambas con mayor éxito. En cambio CF53 podría estar comenzando a desarrollar gen(es) de virulencia para el gen(es) de resistencia de la variedad Caturra, pues no logra colonizarla de manera tan exitosa, mientras que ya ha desarrollado gen(es) de virulencia para Catuaí, puesto que la coloniza con la mayor TCD (Agrios, 2005).

La especificidad que presenta este hongo es otro factor que influye en el desarrollo de los distintos aislamientos, Engelbrecht y Harrington (2005) y Marín *et al.* (2003) exponen la especialización geográfica y de hospederos de *C. fimbriata*. Por ejemplo, los aislamientos CF15 y CF12 que presentaron las mayores TCD en Caturra provienen ambos del Distrito Sabana Redonda, esto sugiere que se podría estar dando una especialización de los aislamientos de Sabana Redonda a la variedad Caturra.

Existen también condiciones no genéticas de cada planta en particular o predisposición a una enfermedad, como luz, altitud, temperatura, humedad, edad, exposición natural de la planta al hongo, sombra, cantidad de agua y nutrientes que recibió y la aplicación de fertilizantes y fungicidas; todos estos factores no fueron controlados en esta investigación, pues se utilizaron estacas de plantas mantenidas en condiciones naturales de un cafetal, por lo tanto, estos factores pudieron haber intervenido en el desarrollo de los aislamientos favoreciendo de algún modo el desarrollo de algunos, debido a que esas eran las condiciones óptimas para su desarrollo, como se observa en el cuadro 1, los aislamientos provienen de condiciones de altitud distintas (Bustamante y Rivas, 1999).

Todas las plantas no eran genéticamente idénticas, por lo que existen diferencias que pueden crear una variación en la infección del hongo entre una planta y otra, y por lo tanto entre una estaca y otra. Esto pudo haber sido controlado únicamente utilizando clones de una misma planta, lo que requería de una cantidad de tiempo no contemplada para esta investigación. A pesar de que se intentó obtener uniformidad en el diámetro de las estacas, habían algunas más gruesas que otras, lo que pudo haber variado la manera de crecimiento del hongo, favoreciendo o no la invasión del mismo y variando el tamaño de la lesión; además de ciertas irregularidades en la superficie de las estacas a la hora de remover la corteza, o por ramificaciones en ellas que no pudieron ser del todo eliminadas (Bustamante y Rivas, 1999).

Al realizar una comparación entre las TCD de los aislamientos en las estacas de café en las variedades Caturra u Catuaí rojo se obtienen las figuras 31 y 32 respectivamente, donde se observa la media de la TCD (cuadrado) y los límites de confianza de las mediciones (líneas). Se puede decir que en Caturra los aislamientos CF15, CF12 y CF54 forman un primer grupo con un patrón de crecimiento similar, por lo que se podría deducir que están bastante relacionados entre sí, CF11 y CF30 conforman otro grupo y los demás aislamientos presentan tanto similitudes tanto con el primer grupo como con el segundo.

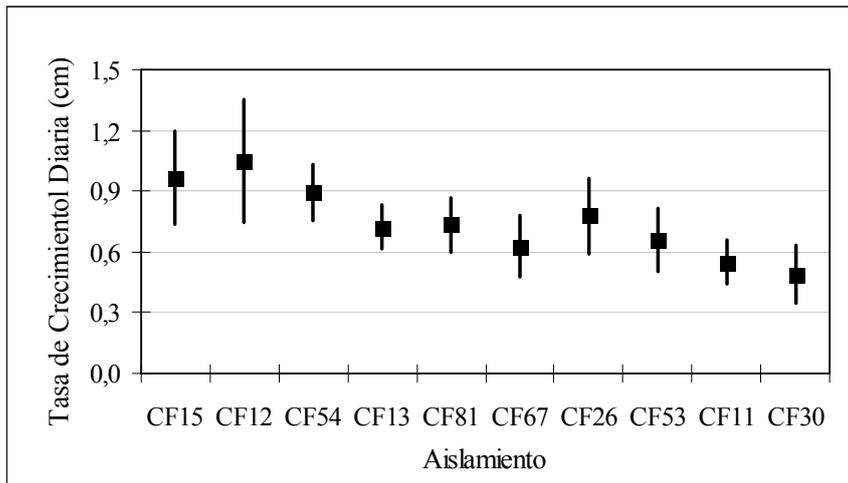


Figura 31. Tasas de Crecimiento Diaria de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* en estacas de café variedad Caturra.

En la variedad Catuaí los aislamientos CF15, CF12 y CF53 forman el primer grupo, CF11 y CF30 de nuevo conforman un grupo aparte y el resto de aislamientos presentan cualidades de crecimiento de ambos grupos. Estas características pueden deberse al posible parentesco entre los aislamientos, lo que solo se puede asegurar realizando un análisis molecular de los mismos.

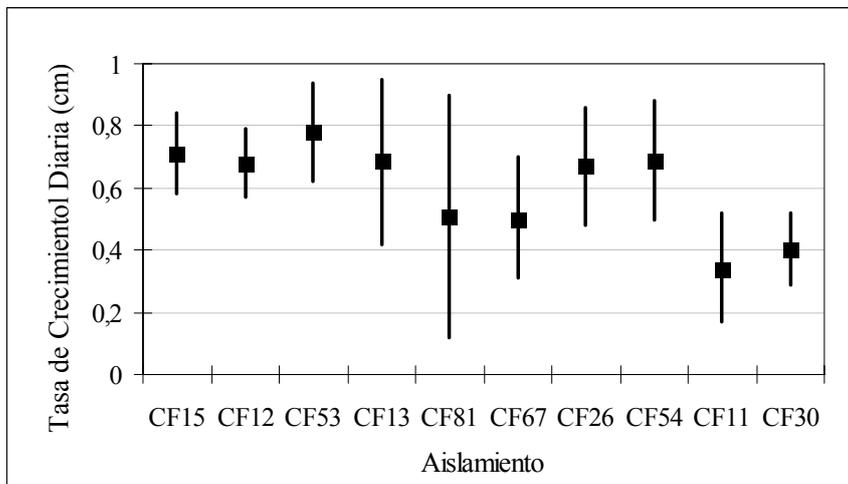


Figura 32. Tasas de Crecimiento Diaria de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* en estacas de café variedad Catuaí rojo.

Por otro lado, la producción de peritecios y ascosporangios pareciera tener ciclos, iniciando en el día 3 disminuyendo hasta el día 5, donde comienza a aumentar de nuevo la producción hasta el día 10, donde disminuye hasta el día 12 y vuelve a aumentar. No es claro el número de días de los ciclos de producción de peritecios, si los hay, puesto que no hay reportes de los mismos en la literatura consultada. También es probable que los días de evaluación no fueron suficientes para establecer dichos ciclos, además, se debe tomar en cuenta que el método utilizado para la determinación del porcentaje de ascosporangios en las lesiones es bastante subjetivo, lo que pudo haber influido en el comportamiento registrado.

No es estadísticamente válido relacionar la producción de peritecios con el crecimiento micelial en las estacas, debido a que por ejemplo CF12 produjo una alta cantidad de peritecios durante la mayoría de las evaluaciones en ambas variedades evaluadas, pero solo tuvo la TCD de micelio más alto en Caturra. Esto se refuerza con el hecho de que CF15 tuvo una TCD alta en ambas variedades, pero no presentó una producción de peritecios concordante con ese crecimiento; por el contrario, CF30 presentó un alto porcentaje de peritecios en ambas variedades y las TCD más bajas y CF53 no produjo ascosporangios del todo en ninguna variedad, pero fue el de mayor tendencia de crecimiento en Catuaí rojo.

CF54 tampoco produjo peritecios y presentaba una apariencia muy similar a CF53, ambos aislamientos provienen del Distrito de San Pedro de Pérez Zeledón, por lo que se puede asumir que son aislamientos muy emparentados pero con patogenicidades distintas. EPPO (2003) afirma que aunque los peritecios son característicos de *C. fimbriata* algunos aislamientos no los producen y otros producen peritecios abortados. El aislamiento CF11 desarrolló peritecios hasta el DDI 12, lo cual ocurrió solo en la segunda repetición del ensayo en Caturra, lo que podría indicar que hubo contaminación de peritecios de otro aislamiento. Esto pudo darse debido a una incorrecta manipulación de las cámaras húmedas o contaminación por ácaros, los cuales eran frecuentes en las mismas ya que éstos se ven atraídos por los aromas producidos por *C. fimbriata*, según Beavers (2005).

Evaluación de la sensibilidad de *Ceratocystis fimbriata* a Butrol 31.5 EC

Las diferencias entre la cantidad de TCMTB requerida para la inhibición del crecimiento de los aislamientos se pueden deber al tratamiento que haya tenido cada aislamiento en la finca en particular de la cual provenían, se decir, es posible que el aislamiento CF81 haya tenido una exposición al Butrol mayor que los demás aislamientos, los cuales requieren de cantidades de este i.a mucho más bajas.

Ningún aislamiento es tolerante al TCMTB, la mayoría de aislamientos requiere de 10-100 ppm para inhibir tanto un 50 como un 90% del crecimiento. Este es considerado un rango medio, ya que si un patógeno requiere de dosis mayores a los 1000 ppm se dice que ha desarrollado tolerancia al ingrediente activo, la mayoría de los productos comerciales son liberados con un rango de sensibilidad de 0.1-1 ppm.[†] Por tanto, se considera que el producto sigue siendo efectivo para la inhibición del crecimiento de este hongo.

Por otro lado, se debe tomar en cuenta que los datos obtenidos en una evaluación *in vitro* como la realizada, dan solamente una idea del comportamiento real del hongo en campo. Tawil *et al.* (1982) demuestran en su investigación que la concentración para la inhibición *in vitro* de una de las cepas de *C. fimbriata* fue muy diferente a la obtenida en campo. A esto se suma el hecho de que algunos aislamientos fueron subcultivados en medio artificial durante más de un año y esto podría ocasionar la pérdida de la patogenicidad de los mismos, así como lo explica Krokene y Solheim (2001).

Evaluación de productos biológicos y químicos

En el ensayo donde se evaluó el comportamiento de los hongos fitopatógeno y antagonista en suelo, se autoclavó el mismo con el fin de eliminar otros microorganismos que pudieran interferir en la evaluación, se hizo evidente que el tiempo de autoclavado utilizado no fue suficiente para eliminar las bacterias, ya que se observaba el desarrollo de las mismas en el PDA al inocular diluciones de suelo. Probablemente el suelo requería de una cantidad de calor y tiempo mayores para

[†] BARQUERO, M. 2008. Sensibilidad de *Ceratocystis fimbriata* a Butrol. (Comunicación personal)

eliminar las bacterias, es por esto que se utilizó el sustrato selectivo para este hongo, zanahoria, el cual también permitía el desarrollo de *Trichoderma* sp. Castillo (2006) utilizó zanahoria para la producción por fermentación en estado sólido de este hongo, además, Páez *et al.* (2006) asegura que este hongo es capaz de degradar celulosa y lignina de materiales orgánicos, lo que evidencia la capacidad de éste para utilizar la zanahoria como sustrato.

Se inoculó inicialmente el hongo fitopatógeno en el suelo y se esperó 6 días para permitir su desarrollo, luego se inoculó *Trichoderma*, esto con el fin de evaluar futuras aplicaciones de éste hongo en campo para combatir *C. fimbriata* proveniente del suelo. *C. fimbriata* pudo colonizar suelo y continuar creciendo en él durante aproximadamente un mes, Vargas (1996) expone que éste es un hongo que se encuentra comúnmente en este lugar.

Después de cerciorarse que el suelo fue colonizado por *C. fimbriata* al observar estructuras distintivas del hongo, se inoculó *Trichoderma*, el cual comprobó tener la capacidad de colonizar ese suelo después de aproximadamente 20 días. Durante ese tiempo *Trichoderma* inactiva las enzimas del patógeno y produce metabolitos y enzimas hidrolíticas que tienen acción fungicida, inhibiendo el crecimiento del patógeno en el suelo. Castro y Rivillas (2003) reportaron la inhibición de *C. fimbriata* en estacas de café utilizando un producto comercial cuyo ingrediente activo es *Trichoderma harzianum*, además, Eziashi *et al.* (2006) utilizaron varias especies de *Trichoderma* para el control de *C. paradoxa* en semillas de palma aceitera *in vitro*.

La predominancia de *Trichoderma* sp. en el suelo después de 20 días se evidencia en su crecimiento en rodajas de zanahoria, Castillo (2006) reporta que al inocular este hongo en zanahoria observó un crecimiento micelial blanco verdoso, como el observado en el ensayo. Además, al observar ese crecimiento al microscopio coincide con las esporas de ese hongo publicado por Kendrick (2007). Dicho resultado es de gran importancia debido a que denota la capacidad de *Trichoderma* sp. de invadir suelo que ha sido colonizado previamente por *C. fimbriata*.

Existe además la ventaja de utilizar formulaciones de *Trichoderma* como tratamiento preventivo, como lo publica Páez *et al.* (2006), pues este hongo puede competir por el

sitio de acción y nutrientes del hongo fitopatógeno, ya que tiene la capacidad de aprovechar los nutrientes del medio que se encuentran a muy bajas concentraciones, además de promover el crecimiento de las raíces al secretar fitohormonas, lo que mejora la tolerancia al estrés hídrico, aumentando los niveles de ácido clorogénico en las plantas, lo que a su vez favorece la tolerancia a *C. fimbriata*.

En la evaluación realizada a las plantas de café en el invernadero es posible que la clorosis observada a los 15 DDI se debiera a la infección causada por *C. fimbriata*, ya que Castro (1991) y CABI (2004) mencionan que al ingresar este hongo por heridas en el tallo obstruye el sistema vascular impidiendo el paso de agua y nutrientes, lo que se visualiza en la planta como clorosis de hojas y pérdida de turgencia irreversible de la planta, que finalmente conlleva a la muerte de la misma, que se observa cuando todas las hojas se han marchitado pero continúan adheridas al tallo.

Debido a que al final de este ensayo, el cual tuvo una duración de dos meses, solamente cuatro plantas habían muerto no se pudo analizar el efecto de los distintos tratamientos en la infección del hongo, por lo que se evidencia la necesidad de extender las evaluaciones por un tiempo más prolongado.

CONCLUSIONES

- Se logró el cultivo axénico de aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* inoculándolos en rodajas de zanahoria previo al traslado en PDA.
- Se utilizó con éxito PDA con 250mg/l de amoxicilina a pH 5.1 para el mantenimiento puro de los aislamientos de *Ceratocystis fimbriata in vitro*.
- No se logró establecer una relación entre las características morfológicas de los aislamientos y la tasa de crecimiento en las estacas, la producción de peritecios o el lugar de procedencia de los mismos.
- Se realizó la descripción morfológica de los aislamientos y se agruparon según sus características del desarrollo en PDA.
- Una vez obtenido el cultivo axénico de los aislamientos en PDA se logró el desarrollo de las matrices líquidas puras para cada uno de ellos.
- El aislamiento CF15 mostró ser el más agresivo, pues tuvo altas tasas de crecimiento en ambas variedades de café.
- Los aislamientos CF11 y CF30 mostraron la menor agresividad, ya que manifestaron las menores tasas de crecimiento y de producción de ascosporangios en ambas variedades de café.
- CF53 y CF12 presentaron las TCD más altas en Catuaí y Caturra respectivamente.
- No se consiguió establecer una correlación entre la TCD de micelio y la producción de peritecios y ascosporangios en las estacas de café.
- Ningún aislamiento fue tolerante al Butrol 31.5EC.
- El 58% de los aislamientos requirió de 10-100 ppm de Butrol 31.5 EC para inhibir un 50% del crecimiento y el 92% inhibió un 90% de su crecimiento con dosis de 10-100 ppm.
- Los aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* se encontraron en un rango medio de sensibilidad al Butrol 31.5EC.
- *Trichoderma* sp. tuvo la capacidad de disminuir el crecimiento de *Ceratocystis fimbriata* en suelo.
- Se requiere de un tiempo de evaluación mayor de dos meses para el ensayo de infección de *Ceratocystis fimbriata* en plantas de café de 9 meses de edad.

RECOMENDACIONES

- ✓ Utilizar estacas provenientes de clones de plantas de café *in vitro* que tengan la misma edad y sean mantenidas bajo condiciones ambientales de luz, temperatura, nutrientes, humedad y agua controladas.
- ✓ Complementar este estudio con ensayos moleculares de los aislamientos que determinen la idioforma, si pertenece a la anaforma del hongo o si se trata del mismo aislamiento.
- ✓ No utilizar aislamientos que hayan sido replicados *in vitro* por mucho tiempo.
- ✓ Usar estacas de más variedades de café, incluyendo una variedad tolerante a “Llaga macana”.
- ✓ Utilizar una mayor cantidad y variedad de aislamientos que representen las diferentes zonas cafetaleras de todo el país.
- ✓ Aplicar un acaricida en las cámaras húmedas donde se mantienen las estacas inoculadas.
- ✓ Realizar la medición microscópica de las estructuras fúngicas de los diferentes aislamientos.
- ✓ Evaluar el control de *Ceratocystis fimbriata* utilizando formulaciones de *Trichoderma* en campo.
- ✓ Disponer de un tiempo mayor a los 2 meses para evaluar el desarrollo de “Llaga macana” en plantas de café de 9 meses de edad.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. 2005. Fitopatología. Trad. por Manuel Guzmán Ortíz. México, Limusa. 279 p.
- ALESSANDRO, M. 2006. Cultivares de Zanahoria. Mejoramiento Genético. Revista Ruralis. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Centro Regional Mendoza, San Juan. 2(8): 17-21.
- BAKER, C.; HARRINGTON, T.; KRAUSS, U. y ALFENAS, A. 2003. Genetic Variability and Host Especialization in the Latin American Clade of *Ceratocystis fimbriata*. Phytopathology. Iowa, E.E.U.U. 93(10): 1274-1284
- BARQUERO, M. 2007a. Quintal de café subió \$17 en últimas tres semanas. La Nación. San José (CR). Setiembre, 22: 20A.
- BARQUERO, M. 2007b. Cafetaleros logran premio del 17% para mitad de cosecha. La Nación. San José (CR). Noviembre, 6: 22A.
- BAYER CROPSCIENCE. 2002. Aliette® 80 WP. <<http://www.bayercropscience.cl/soluciones/fichaproducto.asp?id=83#principalescaracteristicas>> (5/1/08)
- BAYER CROPSCIENCE. 2007. *Ceratocystis fimbriata*. <http://www.bayercropscienceca.com/pls/web_bayer/inicio.html?pprg=7&pcod=H&pcod_adicional=15&popc=15#afec15> (20/10/07)
- BEAVERS, G. 2005. Microbiología. Iowa State University. <<http://www.micro.iastate.edu/grad/ceratocystis-fimbriata.html>> (21/10/07)
- BOLAÑOS, A. 1991. Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica. Boletín Técnico N°74. MAG, Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola, San José, Costa Rica. 560 p.

- BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C.; CHRISTEN, P. y REVAH, S. 1998. Fruity Aroma Production by *Ceratocystis fimbriata* in Solid Cultures From Agro-Industrial Wastes. *Revista Microbiologia*. São Paulo, Brasil. 29(3): 15-17.
- BUSTAMANTE, E. y RIVAS, G. 1999. Elementos e Importancia del Diagnóstico de Problemas Fitosanitarios. *Revista Manejo Integrado de Plagas*. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 52(1): 3-7.
- CADENA, G.; LEGUIZAMON, J.; FERNANDEZ, O. y BAEZA, C. 1985. Combata la llaga macana del cafeto. *CENICAFE, Revista del Centro Nacional de Investigaciones de Café*. Colombia. 1(23): 122-125.
- CAMACHO, A. 2008. Café costarricense alimenta dinamismo turístico. Sector registra al menos 10 empresas dedicadas a los *tour*. *El Financiero*. San José (CR). 28 ENE-03 FEB, 12 (652): 8.
- CARVALHO, A. y CARMO, M. 2003. Podridão pós-colheita de cenoura causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Notas Fitopatológicas*. *Fitopatologia Brasileira*. 28(1): 14-18.
- CASTILLO, D. 2006. Evaluación del Crecimiento y Desarrollo de *Trichoderma aureoviride*_TAT-1 en una Fermentación de Estado Sólido sobre el Sustrato Arroz. *Revista Ciencia & Desarrollo* 9(1): 27-32.
- CASTRO, A. y RIVILLAS, C. 2003. Manejo Sostenible de la Llaga Macana en Cafetales Renovados por Zoca. *Avances Técnicos* 312, CENICAFÉ. 8 p.
- CASTRO, B. 1991. Nuevas recomendaciones para el control de la Llaga Macana del cafeto. *CENICAFE, Revista del Centro Nacional de Investigaciones de Café*. Colombia. 1(6): 55-58.

- CASTRO, B. y MONTOYA, E. 1994. Evaluación de Fungicidas para el Control de *Ceratocystis fimbriata* en Café. CENICAFE, Revista del Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cinchíná-Caldas, Colombia. 4(45): 137-153.
- CASTRO, B. y MONTOYA, E. 1997. El zoqueo de los cafetales y su relación con la infección por Llaga macana. Fitotecnia. CENICAFE, Revista del Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cinchíná-Caldas, Colombia. 2(40): 28-32.
- CASTRO, B.; DUQUE, H. y MONTOYA, E. 2003. Pérdidas económicas ocasionadas por la Llaga macana del cafeto. CENICAFE, Revista del Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cinchíná-Caldas, Colombia. 54(1): 63-76.
- CROP PROTECTION COMPENDIUM (CABI). 2004. *Ceratocystis fimbriata*. <<http://www.public.iastate.edu/~tcharrin/CABIinfo.html#anchor209249>> (20/10/07)
- CROP PROTECTION COMPENDIUM (CABI) y European Plant Protection Organization (EPPO). s.f. *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani*. <http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Ceratocystis_fimbriata_platani/CEAFP_ds.pdf> (24/10/07)
- CRUZ, M.; HERNÁNDEZ, Y. y RIVAS, E. 2006. Mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de patógenos y plagas. Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova”, Universidad Agraria de la Habana, “ Fructuoso Rodríguez Pérez”, La Habana. Cuba. <<http://www.utm.mx/~temas/temas-docs/nota4t29.pdf>> (23/1/08)
- DUQUE, H; CASTRO, B. y MONTOYA, E. 2003. Importancia económica de la llaga macana del cafeto. CENICAFE, Revista del Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cinchíná-Caldas, Colombia. 3(14): 139-141.
- ENGELBRECHT, C. y HARRINGTON, T. 2005. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore.

Mycologia. Department of Plant Pathology, Iowa State University, Ames, Iowa, E.E.U.U. 97 (1): 57-69.

ENRÍQUEZ, G. s.f. Tecnología de cacao. Plagas y Enfermedades. <<http://www.infoagro.go.cr/Agricola/tecnologia/cacao/pyenfermedades.htm>> (21/11/07).

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). 2003. Diagnostic protocols for regulated pests. Bulletin 33, 245-247.

EZIASHI, E.; UMA, N.; ADEKUNLE, A. y OMAMOR, I. 2006. Biological Control of *Ceratocystis paradoxa* Causing Black Seed Rot in Oil Palm Sprouted Seeds by *Trichoderma* species. Pakistan Journal of Biological Sciences 9(10): 1987-1990.

FARMACIAS AHUMADA. 2007. ABIOLEX. Información Farmacológica. <<http://www.fasa.cl/stores/fasa/html/Mft/PRODUCTO/P4727.HT>> (23/1/08)

FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA (FNCC). 2007. Enfermedades y Plagas del Café. Principales enfermedades del café. <<http://www.cafedecolombia.com/caficultura/enfermedades2.html>> (6/11/07)

FERREIRA, F.; MAFIA, L. y FERREIRA, E. 2005. Detecção rápida de *Ceratocystis fimbriata* em lenho infetado de eucalipto, mangueira e outros hospedeiros lenhosos. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia. Fitopatol.bras. 30(5): 45-51.

FERRO, D. 1996. Control Cultural. Departamento de Entomología, Universidad de Massachussets. Trad. por Rafael Cancelado. <<http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/ferroSp.htm>> (14/11/07)

FONDO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (FONAIAP). 1994. Plagas y Enfermedades. <<http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd14/texto/plagasyenfermedades.ht>> (11/6/07)

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 2006. Manual de Campo. Plagas y Enfermedades de Eucaliptos y Pinos en el Uruguay. <<http://www.mgap.gub.uy/Forestal/FaoManualdeCampo.pdf>> (30/10/07)
- FUNDACIÓN DANAC. 2002. Mal de Machete. Venezuela. <<http://danac.org.ve/indice/enfermedades.php?letra=X&listado=t&ps=18>> (11/6/07)
- GARCÍA, J.; GEORGE, A.; ARGYLE, T.; HOOPEN, M. y KRAUSS, U. 2005. ¿Existe la tolerancia genética del cacao (*Theobroma cacao*) a *Rosellinia bunodes* y *Rosellinia pepo*? Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) 75(1): 21-31.
- GÓMEZ, D.; PRINS, C. y STAVER, C. 2002. Metodología para la Manipulación y Cultivo *in vitro* de Hongos. <<http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip53/ht53-b.htm>> (22/1/08)
- GREMMEN, J. y DE KAM, M. 1977. *Ceratocystis fimbriata*, a fungus associated with poplar canker in Poland. Forest Pathology 7 (1): 44-47.
- GROSCLAUDE, P.; OLIVIER, R.; PIZZUTO, G.; ROMITI, G. y MADEC, S. 1988. Detection par piégeage du *Ceratocystis fimbriata* sp.f. *platani*. Application a l'etude de la persistance du parasite dans du bois infecte. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin. Pathology 18(1): 385-390.
- HALFELD, B. y NECHET, K. 2005. Black rot in lettuce: a new disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in hydroponic culture in Brazil. The British Society for Plant Pathology. <<http://www.bspp.org.uk/ndr/july2005/2005-65.asp>> (4/11/07)
- HARRINGTON, T. 2000. *Ceratocystis* Wilt of Cacao. <<http://www.public.iastate.edu/~tcharrin/Cacao.html>> (11/6/07)

- JARDÍ, C. 2008. Desinfectante de Suelos. Informe Técnico. <<http://www.lainco.es/files/pdf/9132%20LAISOL.pdf>> (28/1/08)
- JOHNSON, J.; HARRINGTON, T. y ENGELBRECHT, C. 2005. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. Mycologia. Department of Plant Pathology, Iowa State University, Ames, Iowa. 97(5): 1067–1092.
- KEGLEY, S.; HILL, B. y ORME, S. 2007. Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America. <http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC34528> (28/1/08)
- KENDRICK, B. 2007. Kingdom Eumycota. <<http://www.mycolog.com/CHAP4a.htm>> (28/1/08)
- KROKENE, P. y SOLHEIM, H. 2001. Loss of pathogenicity in the blue-stain fungus *Ceratocystis polonica*. Plant Pathology 50(1): 497-502
- LAMPKIN, N. 1998. Control Biológico. Agricultura Ecológica. <<http://www.agendaorganica.cl/atecnicos7.htm>> (14/11/07)
- LANDSCHOOT, P. y COOK, J. 2007. Understanding the Phosphonate Products. Department of Crop and Soil Sciences, The Pennsylvania State University. <http://turfgrassmanagement.psu.edu/sorting_through_the_phosphonate_products.cfm#PHOSPHONATES> (15/1/08)
- MA, C.; KULLY, M.; KHAN, J.; HATTORI, M. y DANESHTALAB, M. 2007. Synthesis of chlorogenic acid derivatives with promising antifungal activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry 15(1): 6830–6833.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J. y PARKER, J. 2004. Biología de los Microorganismos. Brock. Décima edición. Pearson Educación, S. A., Madrid. 1096 p.

- MARIN, M.; CASTRO, B.; GAITAN, A.; PREISIG, O.; WINGFIELD, B. y WINGFIELD, M. 2003. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* Isolates from Colombian Coffee-Growing Regions Based on Molecular Data and Pathogenicity. *Phytopathology* 15(1): 395–405
- MÁRQUEZ, T. 2005. Protección de Cultivos. Información Técnica. Famoxadona+Fosetil-Al, nuevo fungicida antimildiu para el cultivo de la viña. Du Pont Ibérica S.L. Departamento de Protección de Cultivos. <http://www2.dupont.com/Crop_Protection/es_ES/Noticias_y_Eventos/Informacion_Tecnica/Famoxadona_Fosetil.html> (15/1/08)
- ORIOUS. 2004. TrichoD, Bio-Regulador de Enfermedades en su Cultivo y en el Suelo. Biotecnología. Villavicencio, Colombia. <<http://oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=11,4,0,0,1,0>> (11/6/07)
- PÁEZ, O.; BERNAZA, G. y ACOSTA, M. 2006. *Trichoderma*. Uso agrícola del *Trichoderma*. <<http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml>> (18/11/07)
- PÉREZ, L. 2005. Bases moleculares del control biológico de fitopatógenos. Experiencia chilena. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. <http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/2.html> (18/11/07)
- PIEDRA, R. 2002. Memoria del II Encuentro de Investigadores en Agricultura Orgánica 2002. Control biológico en floricultura. Asociación de Productores de Flores de Llano Grande de Cartago. <http://www.infoagro.go.cr/organico/7.Conceptos_agroecologia.htm> (18/11/07)
- RODRÍGUEZ, A. 2001. Café y Costa Rica, el uno para el otro. El Instituto del Café de Costa Rica (ICAFE). <<http://www.icafe.go.cr/homepage.nsf>> (15/6/07)

- ROJAS, H. 2005. El Manejo de Almacigales de Café. Boletín Informativo, ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). San José, Costa Rica. 5(1): 2-10.
- SARMIENTO, J. 2004. Los Plaguicidas: Propiedades y Clasificación. <http://www.senasa.gob.pe/intranet/capacitacion/cursos/curso_nacional_semilla/plaguicidas/1.pdf> (18/11/07)
- SAYAGO, M. 1999. Control fitosanitario en el cultivo del café. FONAIAP. <<http://www.fonaiap.gov.ve/publica/divulga/fd61/cafe.html>> (21/11/07)
- SOLÍS, L. y HERRERA, C. 2005. Desarrollo de un Método de Análisis para la Cuantificación de Ácidos Clorogénicos en Café. Agronomía Costarricense 29(2): 99-107.
- STEEL, R. y TORRIE, J. 1989. Bioestadística: Principios y Procedimientos. Trad. por Ricardo Martínez. Segunda edición. D.F., México. McGRAW-HILL. 622p.
- TAWIL, P.; PICHENOT, M. y AMUKOSIO, M. 1982. Action *in vitro* de fongicides benzimidazoles et thiophanates sur *Ceratocystis fimbriata* E. et H. f. *platani*. Laboratoire de Biologie Végétale et Laboratoire de Synthèse Organique, Université d'Aix, Marseille I. Eur.J. Eor. Path. Hamburg und Berlin. 12(1): 79-86.
- THOMPSON, D. 1996. 2-(Thiocyanomethylthio) benzothiazole Risk Assessment; Notice of Availability. Acting, United States SPS National Notification Authority, USDA Foreign Agricultural Service, Food Safety & Technical Services Division, Washington D.C. <http://www.ipfsaph.org/cds_upload/kopool_data/WTOSPSNF_0/es_nusa1302.doc> (28/1/08)
- THORPE, D.; HARRINGTON, T. y UCHIDA, J. 2005. Pathogenicity, Internal Transcribed Spacer-rDNA Variation, and Human Dispersal of *Ceratocystis fimbriata* on the Family Araceae. Department of Plant Pathology, Iowa State

University and Department of Plant and Environmental Protection Sciences,
University of Hawaii. *Phytopathology* 95(1): 316-323.

TSOPELAS, P. y ANGELOPOULOS, A. 2004. First report of canker stain disease of
plane trees, caused by *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* in Greece. *Institute of
Mediterranean Forest Ecosystems*.
<<http://www.bspp.org.uk/NDR/jan2004/2004-02.asp>> (14/11/07)

VARGAS, E. 1996. Hongos y Bacterias Aislados de Raíces Corchosas de Cafeto y
Cítricos en Suelos con Diferentes Características. Facultad de Agronomía,
Universidad de Costa Rica. X Congreso Nacional Agronómico/II Congreso de
Suelos. <http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_X/a50-2388-III_067.pdf>
(7/11/07)

VÁZQUEZ, L. 1999. Control Biológico de Plagas del Cafeto. Departamento Manejo de
Plagas, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Ciudad de la
Habana, CUBA. <[http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/CAFE-
BIO.htm](http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/CAFE-BIO.htm)> (24/11/07)

VERO, S. y MONDITO, P. 1999. Control Biológico Postcosecha en Uruguay.
Montevideo, Uruguay. *Horticultura Internacional* 7(26), 32-36.

ANEXOS

Anexo 1

Análisis de Regresión del crecimiento de aislamientos de *Cerarocystis fimbriata* en medio PDA.

Para CF10

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9365
Coefficiente de determinación R ²	0,8771
R ² ajustado	0,8525
Error típico	0,5237
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	9,7847	9,7847	35,6800	0,0019
Residuos	5	1,3712	0,2742		
Total	6	11,1558			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	1,5098	0,5325	2,8356	0,0364	0,1411	2,8786
Día (x)	0,2322	0,0389	5,9733	0,0019	0,1323	0,3322

Para CF11

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9740
Coefficiente de determinación R ²	0,9487
R ² ajustado	0,9384
Error típico	0,3937
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	14,3285	14,3285	92,4424	0,0002
Residuos	5	0,7750	0,1550		
Total	6	15,1035			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	1,0805	0,4003	2,6992	0,0428	0,0515	2,1095
Día (x)	0,2810	0,0292	9,6147	0,0002	0,2059	0,3562

Para CF12

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9466
Coefficiente de determinación R^2	0,8961
R^2 ajustado	0,8753
Error típico	0,6278
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	16,9920	16,9920	43,1130	0,0012
Residuos	5	1,9706	0,3941		
Total	6	18,9626			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,5144	0,6383	0,8058	0,4570	-1,1265	2,1553
Día (x)	0,3060	0,0466	6,5660	0,0012	0,1862	0,4258

Para CF13

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9700
Coefficiente de determinación R^2	0,9409
R^2 ajustado	0,9291
Error típico	0,5088
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	20,5997	20,5997	79,5755	0,0003
Residuos	5	1,2943	0,2589		
Total	6	21,8940			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,8562	0,5173	1,6549	0,1588	-0,4737	2,1860
Día (x)	0,3370	0,0378	8,9205	0,0003	0,2399	0,4341

Para CF14

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9752
Coefficiente de determinación R^2	0,9509
R^2 ajustado	0,9411
Error típico	0,4370
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	18,5037	18,5037	96,8849	0,0002
Residuos	5	0,9549	0,1910		
Total	6	19,4586			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,8723	0,4444	1,9632	0,1069	-0,2699	2,0146
Día (x)	0,3194	0,0324	9,8430	0,0002	0,2360	0,4028

Para CF15

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9462
Coefficiente de determinación R^2	0,8953
R^2 ajustado	0,8743
Error típico	0,5586
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	13,3389	13,3389	42,7463	0,0013
Residuos	5	1,5602	0,3120		
Total	6	14,8991			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,9246	0,5680	1,6278	0,1645	-0,5355	2,3846
Día (x)	0,2711	0,0415	6,5381	0,0013	0,1645	0,3778

Para CF26

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9808
Coefficiente de determinación R^2	0,9620
R^2 ajustado	0,9544
Error típico	0,4607
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	26,8519	26,8519	126,4981	0,0001
Residuos	5	1,0614	0,2123		
Total	6	27,9133			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,2116	0,4685	0,4518	0,6703	-0,9926	1,4159
Día (x)	0,3847	0,0342	11,2471	0,0001	0,2968	0,4726

Para CF30

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9966
Coefficiente de determinación R^2	0,9933
R^2 ajustado	0,9920
Error típico	0,1876
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	26,0740	26,0740	741,1525	0,000001
Residuos	5	0,1759	0,0352		
Total	6	26,2499			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,2200	0,1907	-1,1533	0,3009	-0,7102	0,2703
Día (x)	0,3791	0,0139	27,2241	0,000001	0,3433	0,4149

Para CF53

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9074
Coefficiente de determinación R^2	0,8233
R^2 ajustado	0,7880
Error típico	0,4994
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	5,8106	5,8106	23,3013	0,0048
Residuos	5	1,2468	0,2494		
Total	6	7,0574			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	1,2318	0,5077	2,4260	0,0597	-0,0734	2,5370
Día (x)	0,1790	0,0371	4,8271	0,0048	0,0837	0,2743

Para CF54

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9708
Coefficiente de determinación R^2	0,9424
R^2 ajustado	0,9308
Error típico	0,4881
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	19,4756	19,4756	81,7478	0,0003
Residuos	5	1,1912	0,2382		
Total	6	20,6668			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,3698	0,4963	0,7452	0,4897	-0,9059	1,6456
Día (x)	0,3276	0,0362	9,0414	0,0003	0,2345	0,4208

Para CF67

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9504
Coefficiente de determinación R^2	0,9033
R^2 ajustado	0,8840
Error típico	0,7639
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	27,2685	27,2685	46,7232	0,0010
Residuos	5	2,9181	0,5836		
Total	6	30,1866			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,5810	0,7768	0,7480	0,4881	-1,4158	2,5778
Día (x)	0,3877	0,0567	6,8354	0,0010	0,2419	0,5335

Para CF81

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9798
Coefficiente de determinación R^2	0,9600
R^2 ajustado	0,9520
Error típico	0,4840
Observaciones	7

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	28,1112	28,1112	119,9973	0,0001
Residuos	5	1,1713	0,2343		
Total	6	29,2825			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,0353	0,4921	-0,0717	0,9456	-1,3004	1,2298
Día (x)	0,3936	0,0359	10,9543	0,0001	0,3013	0,4860

Anexo 2

Análisis de Regresión del crecimiento de aislamientos de *Cerarocystis fimbriata* en estacas de la variedad de café Caturra.

Para CF11

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9897
Coefficiente de determinación R ²	0,9795
R ² ajustado	0,9743
Error típico	0,3767
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	27,0793	27,0793	190,8727	0,0002
Residuos	4	0,5675	0,1419		
Total	5	27,6467			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,8521	0,3717	-2,2925	0,0836	-1,8842	0,1799
Día (x)	0,5501	0,0398	13,8157	0,0002	0,4395	0,6606

Para CF12

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9789
Coefficiente de determinación R ²	0,9583
R ² ajustado	0,9479
Error típico	1,0350
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	98,5373	98,5373	91,9941	0,0007
Residuos	4	4,2845	1,0711		
Total	5	102,8218			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-1,3888	1,0214	-1,3598	0,2455	-4,2246	1,4470
Día (x)	1,0493	0,1094	9,5914	0,0007	0,7455	1,3530

Para CF13

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9942
Coefficiente de determinación R ²	0,9885
R ² ajustado	0,9857
Error típico	0,3687
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	46,8660	46,8660	344,7487	0,0000
Residuos	4	0,5438	0,1359		
Total	5	47,4098			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,4859	0,3639	-1,3353	0,2527	-1,4961	0,5244
Día (x)	0,7236	0,0390	18,5674	0,0000	0,6154	0,8318

Para CF15

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9857
Coefficiente de determinación R ²	0,9716
R ² ajustado	0,9645
Error típico	0,7794
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	83,2048	83,2048	136,9675	0,0003
Residuos	4	2,4299	0,6075		
Total	5	85,6347			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,3139	0,7692	-0,4082	0,7041	-2,4495	1,8216
Día (x)	0,9642	0,0824	11,7033	0,0003	0,7354	1,1929

Para CF26

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9848
Coefficiente de determinación R ²	0,9697
R ² ajustado	0,9622
Error típico	0,6486
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	53,9382	53,9382	128,2170	0,0003
Residuos	4	1,6827	0,4207		
Total	5	55,6209			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,0080	0,6401	0,0125	0,9906	-1,7692	1,7852
Día (x)	0,7763	0,0686	11,3233	0,0003	0,5860	0,9667

Para CF30

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9792
Coefficiente de determinación R ²	0,9589
R ² ajustado	0,9486
Error típico	0,4783
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	21,3471	21,3471	93,2953	0,0006
Residuos	4	0,9152	0,2288		
Total	5	22,2623			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,1146	0,4721	-0,2427	0,8202	-1,4252	1,1961
Día (x)	0,4884	0,0506	9,6589	0,0006	0,3480	0,6288

Para CF53

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9852
Coefficiente de determinación R ²	0,9705
R ² ajustado	0,9632
Error típico	0,5431
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	38,8675	38,8675	131,7941	0,0003
Residuos	4	1,1796	0,2949		
Total	5	40,0471			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,1381	0,5359	-0,2577	0,8093	-1,6261	1,3499
Día (x)	0,6590	0,0574	11,4802	0,0003	0,4996	0,8184

Para CF54

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9938
Coefficiente de determinación R ²	0,9876
R ² ajustado	0,9845
Error típico	0,4739
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	71,4012	71,4012	317,8886	0,0001
Residuos	4	0,8984	0,2246		
Total	5	72,2996			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-1,0521	0,4677	-2,2494	0,0877	-2,3506	0,2465
Día (x)	0,8932	0,0501	17,8294	0,0001	0,7541	1,0323

Para CF67

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9852
Coefficiente de determinación R ²	0,9706
R ² ajustado	0,9633
Error típico	0,5160
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	35,2020	35,2020	132,2194	0,0003
Residuos	4	1,0650	0,2662		
Total	5	36,2669			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,0641	0,5092	-0,1259	0,9059	-1,4779	1,3497
Día (x)	0,6272	0,0545	11,4987	0,0003	0,4757	0,7786

Para CF81

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9913
Coefficiente de determinación R ²	0,9828
R ² ajustado	0,9784
Error típico	0,4611
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	48,4788	48,4788	227,9877	0,0001
Residuos	4	0,8506	0,2126		
Total	5	49,3294			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,4158	0,4551	-0,9137	0,4126	-1,6793	0,8477
Día (x)	0,7360	0,0487	15,0993	0,0001	0,6006	0,8713

Anexo 3

Análisis de Regresión del crecimiento de aislamientos de *Cerarocystis fimbriata* en estacas de la variedad de café Catuaí rojo.

Para CF11

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9395
Coefficiente de determinación R ²	0,8827
R ² ajustado	0,8534
Error típico	0,5936
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	10,6040	10,6040	30,0967	0,0054
Residuos	4	1,4093	0,3523		
Total	5	12,0133			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,2883	0,5858	0,4922	0,6484	-1,3381	1,9147
Día (x)	0,3442	0,0627	5,4860	0,0054	0,1700	0,5184

Para CF12

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9930
Coefficiente de determinación R ²	0,9860
R ² ajustado	0,9824
Error típico	0,3848
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	41,5876	41,5876	280,8017	0,0001
Residuos	4	0,5924	0,1481		
Total	5	42,1800			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,4905	0,3798	-1,2916	0,2661	-1,5450	0,5639
Día (x)	0,6817	0,0407	16,7571	0,0001	0,5687	0,7946

Para CF13

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9633
Coefficiente de determinación R ²	0,9280
R ² ajustado	0,9100
Error típico	0,9074
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	42,4453	42,4453	51,5509	0,0020
Residuos	4	3,2935	0,8234		
Total	5	45,7388			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,1146	0,8955	0,1280	0,9044	-2,3717	2,6009
Día (x)	0,6887	0,0959	7,1799	0,0020	0,4224	0,9550

Para CF15

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9913
Coefficiente de determinación R ²	0,9826
R ² ajustado	0,9782
Error típico	0,4447
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	44,6608	44,6608	225,8842	0,0001
Residuos	4	0,7909	0,1977		
Total	5	45,4516			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,9741	0,4388	2,2197	0,0906	-0,2443	2,1924
Día (x)	0,7064	0,0470	15,0294	0,0001	0,5759	0,8369

Para CF26

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9805
Coefficiente de determinación R^2	0,9615
R^2 ajustado	0,9518
Error típico	0,6360
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	40,3724	40,3724	99,8096	0,0006
Residuos	4	1,6180	0,4045		
Total	5	41,9904			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,3427	0,6277	0,5459	0,6141	-1,4000	2,0853
Día (x)	0,6716	0,0672	9,9905	0,0006	0,4850	0,8583

Para CF30

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9794
Coefficiente de determinación R^2	0,9592
R^2 ajustado	0,9489
Error típico	0,3921
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	14,4436	14,4436	93,9314	0,0006
Residuos	4	0,6151	0,1538		
Total	5	15,0587			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,6576	0,3870	1,6992	0,1645	-0,4169	1,7320
Día (x)	0,4017	0,0414	9,6918	0,0006	0,2866	0,5168

Para CF53

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9892
Coefficiente de determinación R ²	0,9786
R ² ajustado	0,9733
Error típico	0,5466
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	54,6541	54,6541	182,9307	0,0002
Residuos	4	1,1951	0,2988		
Total	5	55,8492			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,2195	0,5394	0,4069	0,7049	-1,2782	1,7172
Día (x)	0,7814	0,0578	13,5252	0,0002	0,6210	0,9419

Para CF54

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9814
Coefficiente de determinación R ²	0,9632
R ² ajustado	0,9540
Error típico	0,6365
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	42,3905	42,3905	104,6353	0,0005
Residuos	4	1,6205	0,4051		
Total	5	44,0110			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,6675	0,6281	1,0626	0,3478	-1,0765	2,4115
Día (x)	0,6882	0,0673	10,2291	0,0005	0,5014	0,8750

Para CF67

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9642
Coefficiente de determinación R^2	0,9297
R^2 ajustado	0,9121
Error típico	0,6566
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	22,8020	22,8020	52,8886	0,0019
Residuos	4	1,7245	0,4311		
Total	5	24,5266			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	1,0374	0,6480	1,6010	0,1846	-0,7617	2,8365
Día (x)	0,5047	0,0694	7,2725	0,0019	0,3120	0,6974

Para CF81

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,8739
Coefficiente de determinación R^2	0,7637
R^2 ajustado	0,7046
Error típico	1,3332
Observaciones	6

Análisis de Varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	22,9807	22,9807	12,9286	0,0228
Residuos	4	7,1100	1,7775		
Total	5	30,0908			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	2,1802	1,3157	1,6570	0,1729	-1,4729	5,8332
Día (x)	0,5067	0,1409	3,5956	0,0228	0,1154	0,8980