



XXIII
Simposio
Latinoamericano
de Caficultura

Caracterización morfológica, patogénica y molecular de aislamientos de *Ceratocystis* spp. en las distintas regiones cafetaleras de Costa Rica

BARQUERO, Miguel; CORDERO-VEGA, María José

INSTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CAFÉ



XXIII
Simposio
Latinoamericano
de Caficultura



Objetivo general

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



Objetivos específicos

- Establecer una muestra de cultivos axénicos de la población de *Ceratocystis* spp.
- Caracterizar morfológicamente una muestra de la población de *Ceratocystis* spp. estudiando el tamaño del peritecio, las ascosporas, las clamidiósporas y las conidias, así como diferencias en la coloración de la colonia y las distribuciones de los peritecios.
- Evaluar la patogenicidad de aislamientos de *Ceratocystis* spp. en troncos ortotrópicos de plantas de café var. Catuaí.
- Identificar molecularmente diferencias o similitudes genéticas entre aislamientos que presenten diferencias similares en su morfología y patogenicidad.



Introducción

- La Organización Internacional del Café (OIC, 2014) considera que el café es uno de los productos primarios de mayor valor, superado únicamente por el petróleo.
- Tiene influencia en la economía y la política de los países productores del grano.
- *Ceratocystis* spp. es considerado uno de los patógenos más agresivos, con disminuciones entre el 20 %-40 % de plantas .
- *Ceratocystis* spp. puede mantener un alto grado de especialización tanto por sus hospederos como por el área geográfica donde se localizan.



Introducción

1890

- Saccardo: *Sphaeronaema*

1923

- Elliott: *Ceratostomella*

1934

- Melin y Nannfeldt: *Ophiostoma*

1935

- Davidson: *Endoconidiphora*

1950

- Mundialmente: *Ceratocystis**



Introducción

- Se encuentra en la mayoría de suelos cafetaleros.
- Requiere de una herida previa para infectar al huésped.
- Diseminación: podas, herramientas contaminadas, terrenos con alta pendiente, insectos de la familia Curculionidae como agentes vectores.





XXIII
Simposio
Latinoamericano
de Caficultura



Introducción

- Síntomas externos



- Síntomas internos





XXIII
Simposio
Latinoamericano
de Caficultura



Metodología

Muestreo de las plantas enfermas a nivel de campo

- Inspección de 74 fincas con síntomas en las 6 regiones cafetaleras de Costa Rica:

*Coto Brus-CB (998-1132 m.s.n.m)

*Pérez Zeledón-PZ (585-673)

*Los Santos- LS (1451-1875)

*Turrialba-T (951-1188)

*Valle Central-VC (1249-1552)

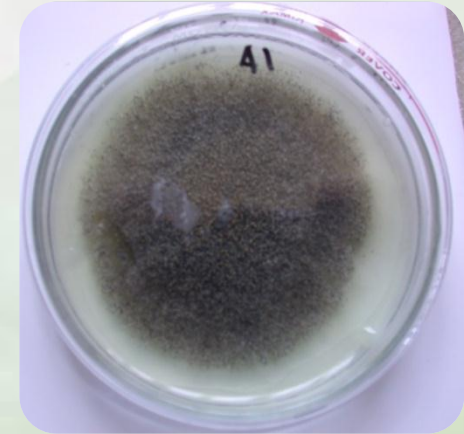
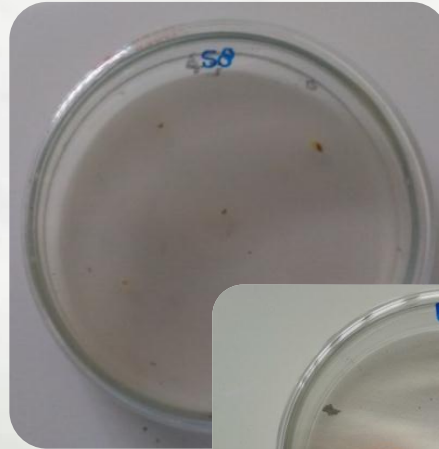
*Valle Occidental-VO (1219-1474)





Metodología: Recuperación del aislamiento

- Se colocaron secciones de tejido de la zona interna de avance de la lesión en papa dextrosa agar y rodajas de zanahoria.
- Obtención de los aislamientos axénicos.





Metodología

Caracterización morfológica

- Entre 18- 22 días de colonización del patógeno en el medio de cultivo (presencia de peritecios), se realizó un raspado y se colocó en un porta objetos.
- Se prepararon tres repeticiones por aislamiento (correspondientes a tres distintas placas petri).
- Se realizó la caracterización mediante observaciones y mediciones con la utilización un microscopio óptico (Olympus CX31), el cual poseía un lente ocular con micrómetro para medir las variables cuantitativas.



Metodología

Variables Cuantitativas



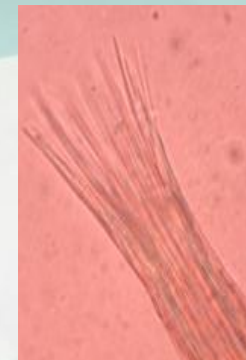
Ascosporas



Clamidiósporas



Conidias

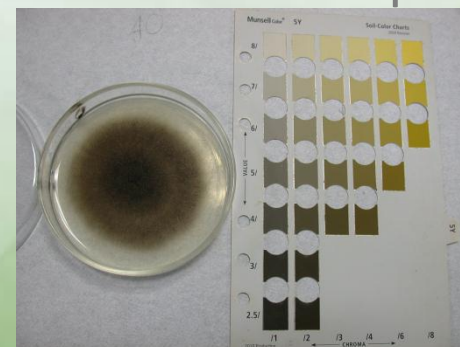
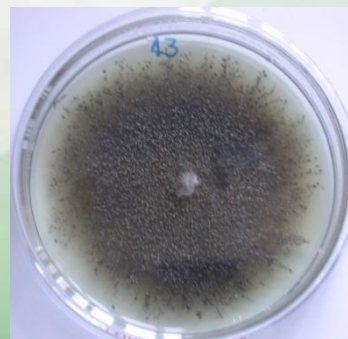
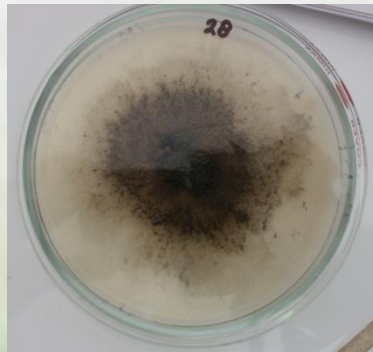
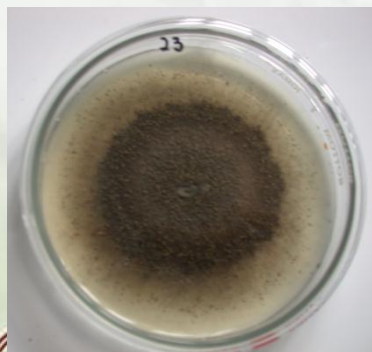


Ostiolo



Base y
diámetro de
peritecio

Variables Cualitativas





Metodología

Evaluación de la agresividad



Var. Catuai



Segmentos tronco:

- 10 cm largo-2 cm de diámetro
- Lesión de 1 cm lesión



10 μ l solución
suspensión de
esporas 1×10^6
esporas/ml



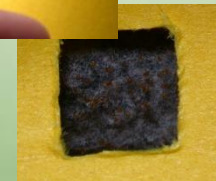
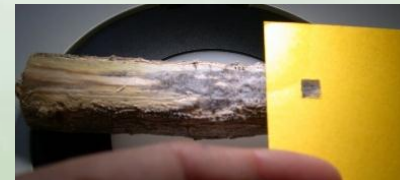
XXIII
Simposio
Latinoamericano
de Caficultura



Metodología

Evaluación de la agresividad

- Crecimiento final de la colonia a los 15 DDI (con evaluaciones cada 2 días).
- Incidencia.
- Esporulación (esporas/lesión).
- Periodo de incubación.
- Periodo de latencia.

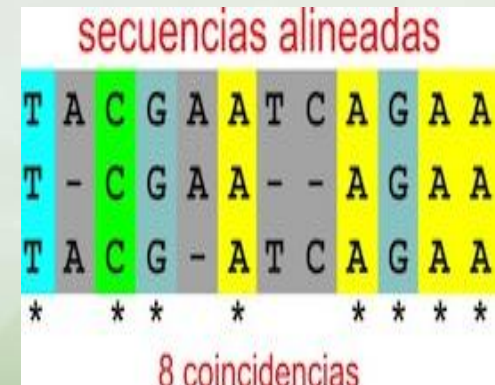
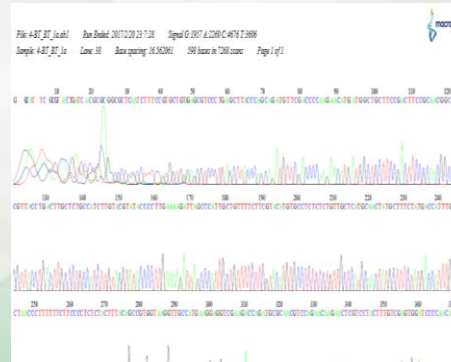
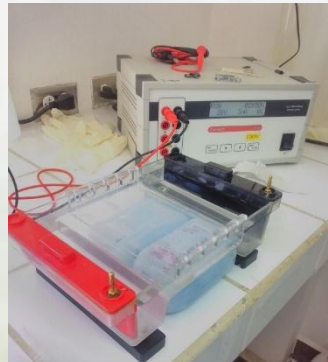


Índice de agresividad
(FI*LA*SC)/(IP*LP)



Metodología Identificación molecular

- Se seleccionaron 4 aislamientos.
- Crecimiento micelio en medio líquido.
- Extracción de ADN.
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con tres regiones de genes: ITS (1-4), *B*-tubulina y el Factor de Elongación 1- α .
- Secuenciamiento
- Alineamiento, programas y especies

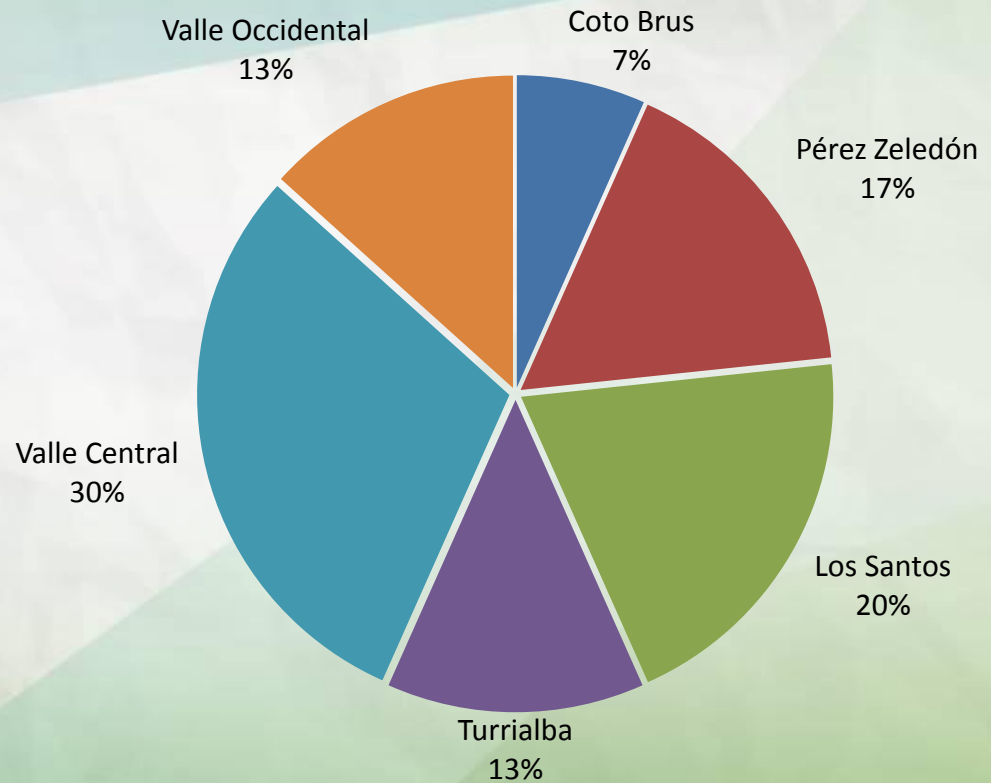




Resultados

Población de aislamientos

- Se muestrearon un total de 74 puntos y se obtuvo únicamente 30 muestras positivas para *Ceratocystis* spp.





XXIII
Simposio
Latinoamericano
de Caficultura



Resultados

Población de aislamientos



Plantas aisladas



Podas

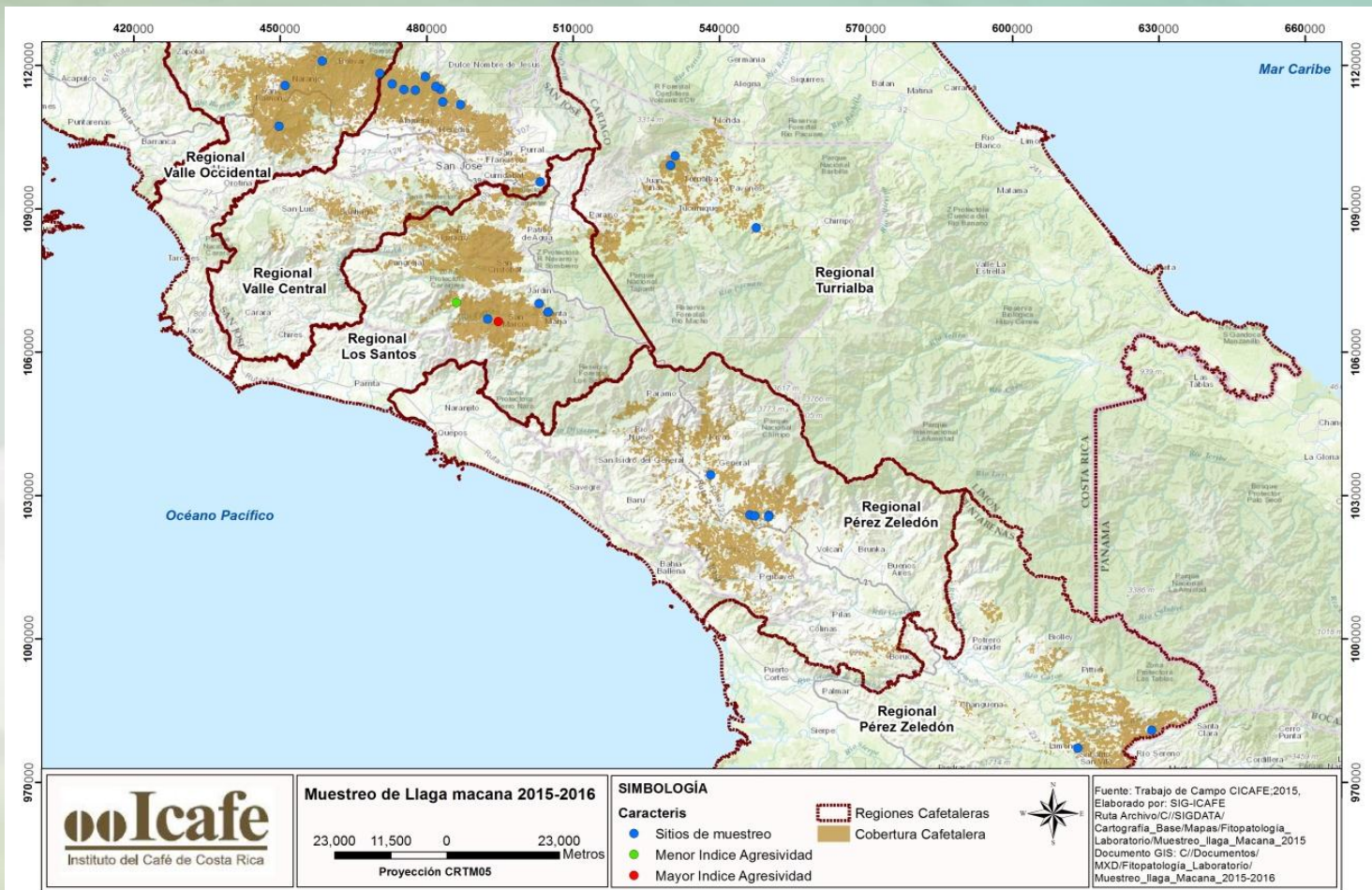


Parches



XXIII
Simposio
Latinoamericano
de Caficultura

Resultados: Muestreo

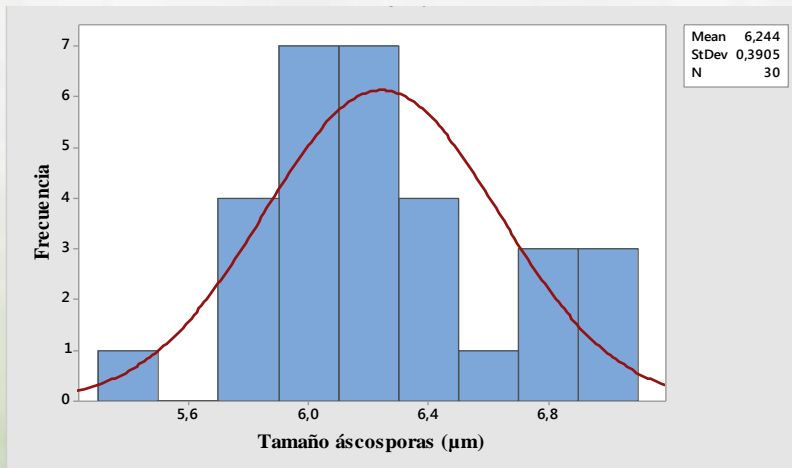
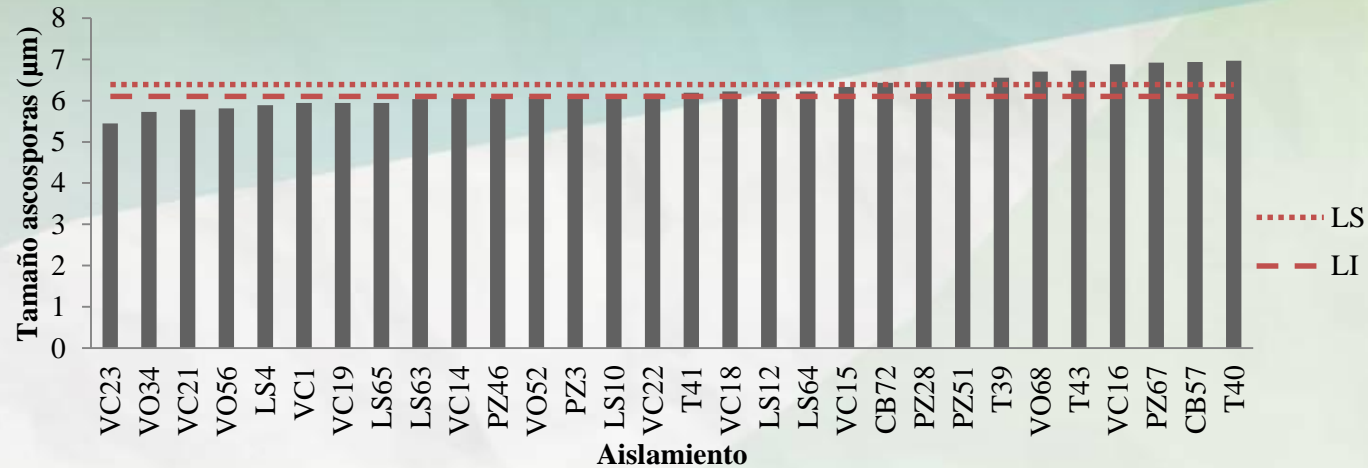


Puntos de muestreo de *Ceratocystis* spp. en las distintas regiones cafetaleras de Costa Rica, 2015-2016.



Resultados: Caracterización morfológica, Ascosporas

Tamaño de las
ascosporas (μm)
5,43- 6,97



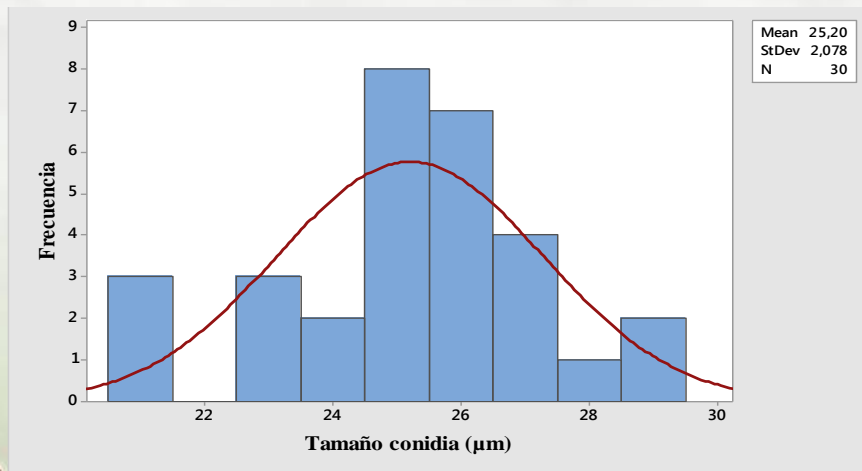
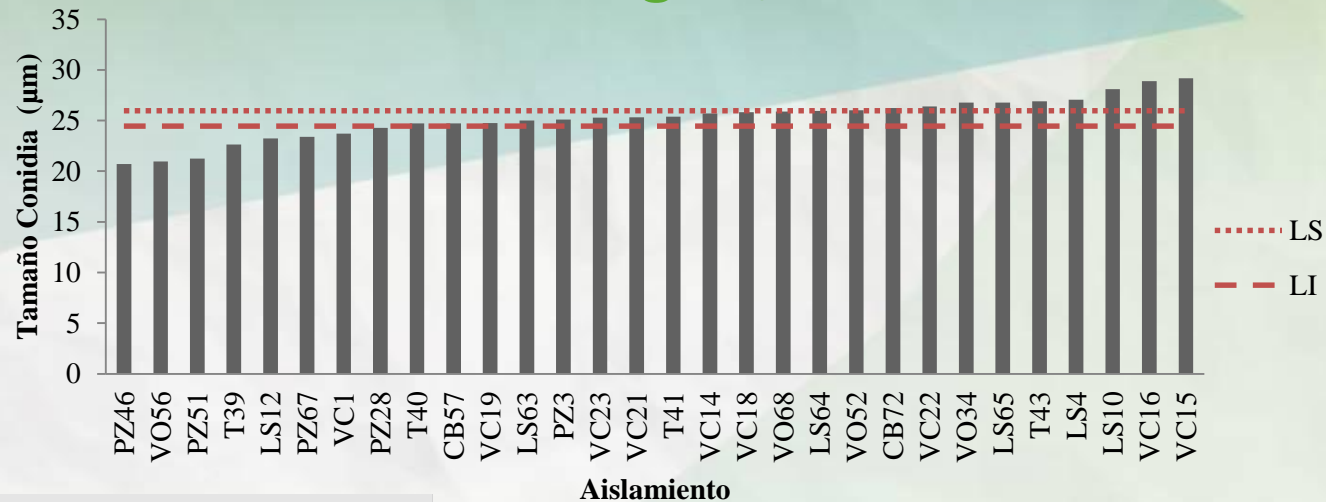
Frecuencia poblacional
para el tamaño (μm)

- 3,3 % (5,43)
- 87 % (5,7-6,8)
- 10 % (6,9)



Resultados: Caracterización morfológica, Conidias

Tamaño de las conidias (μm)
20,7- 29,2



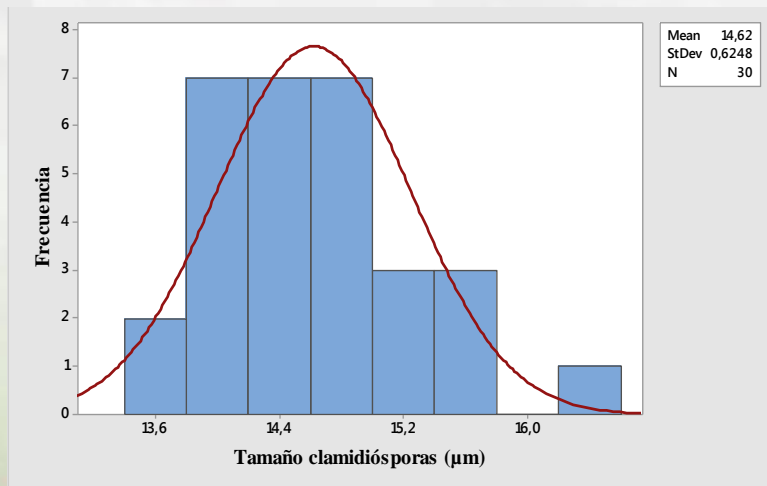
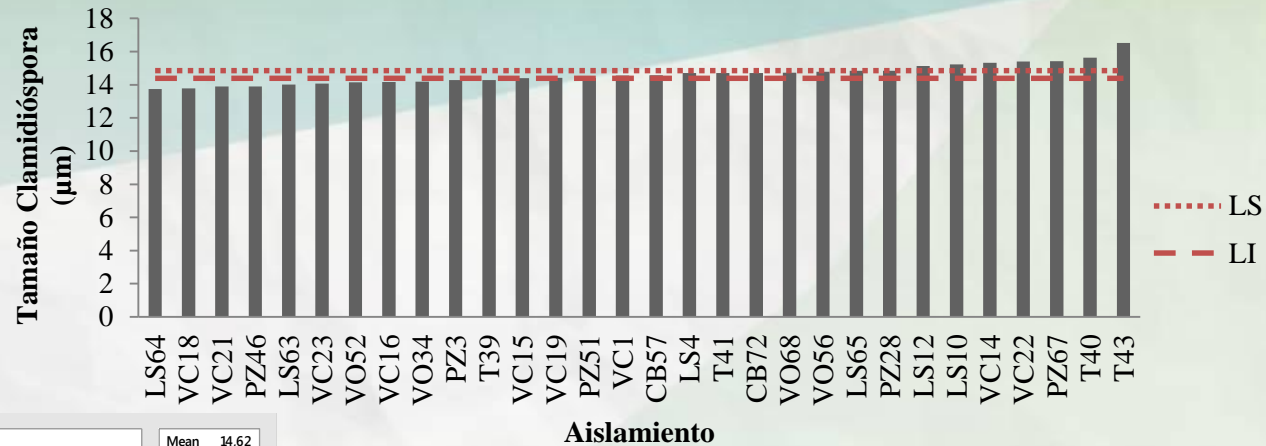
Frecuencia poblacional para el tamaño (μm).

- 3,3 % (20)
- 87 % (21-27)
- 10 % (28)



Resultados: Caracterización morfológica, Clamidiósporas

Tamaño de las
clamidiósporas (μm)
13,7- 16,5



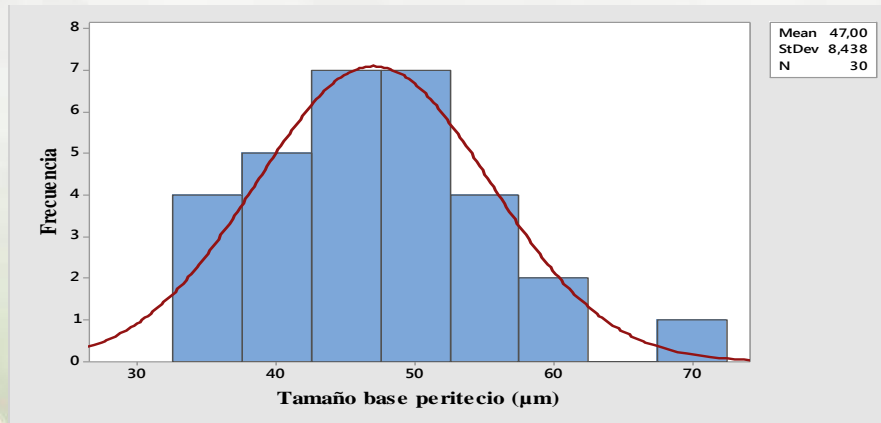
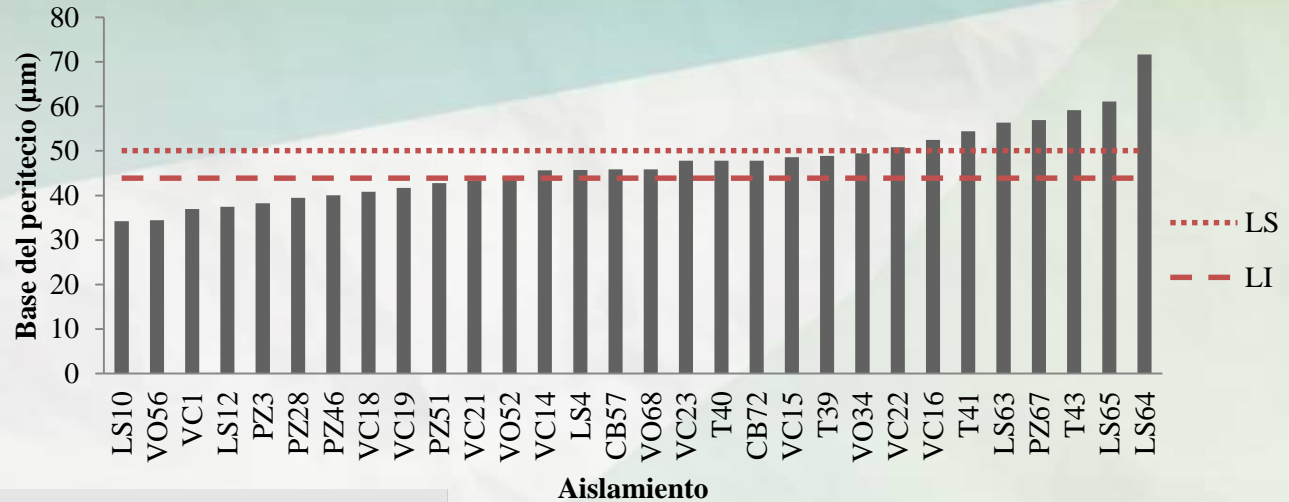
Frecuencia poblacional para el
tamaño (μm)

- 7 % (13)
- 90% (14-15)
- 3,3 % (16)



Resultados: Caracterización morfológica, Base de peritecio

Tamaño de la base
del peritecio (μm)
34,2-71,7



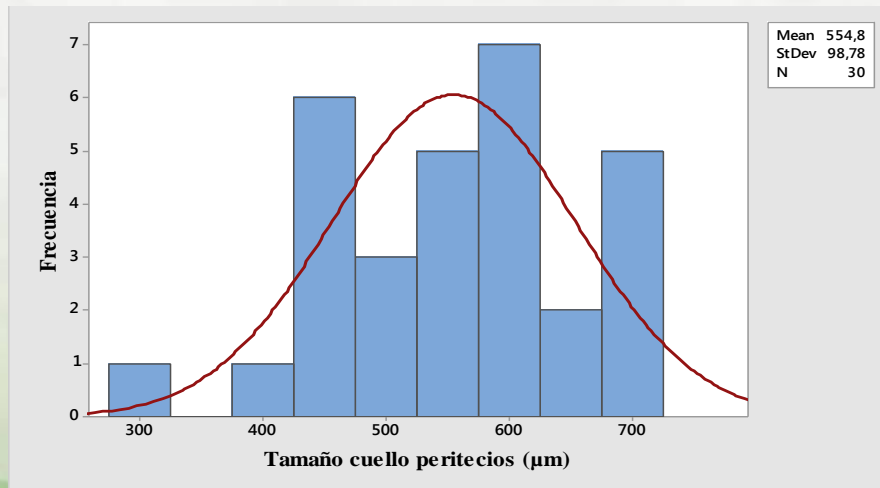
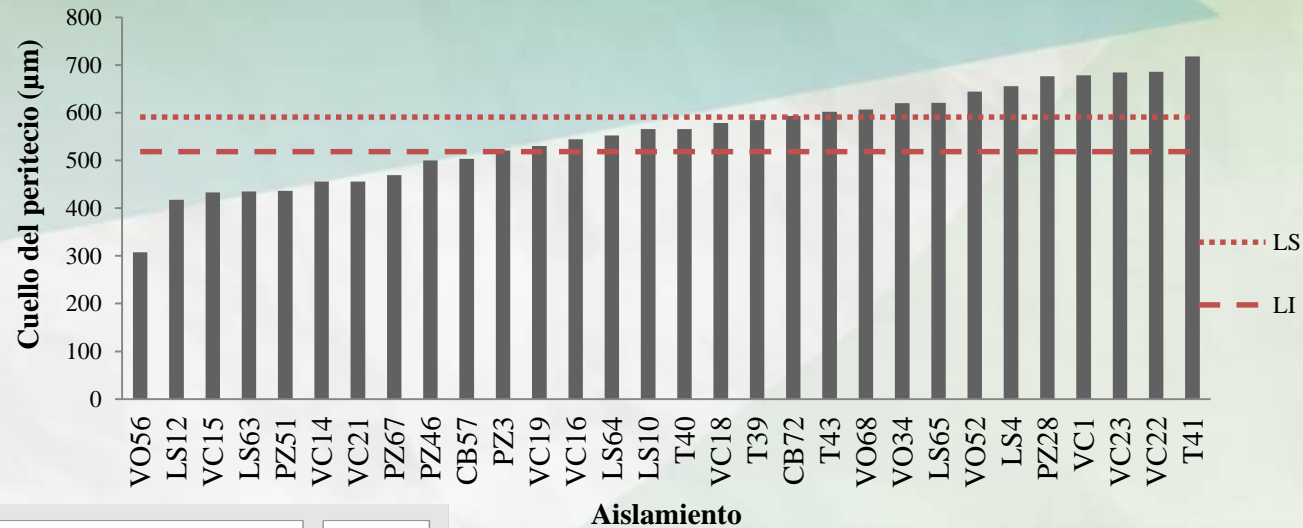
Frecuencia poblacional para el
tamaño (μm)

- 13,3 % (34-36)
- 83% (37-63)
- 3,3% (71)



Resultados: Caracterización morfológica, Cuello de peritecio

Tamaño del cuello
del peritecio (μm)
307-717



Frecuencia poblacional para el
tamaño (μm)

- 3,3 % (307)
- 80 % (378-655)
- 17 % (676-717)

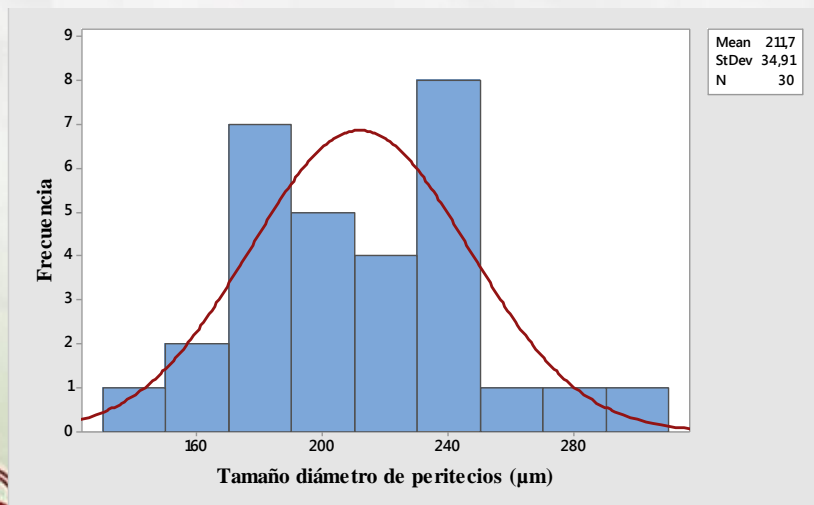
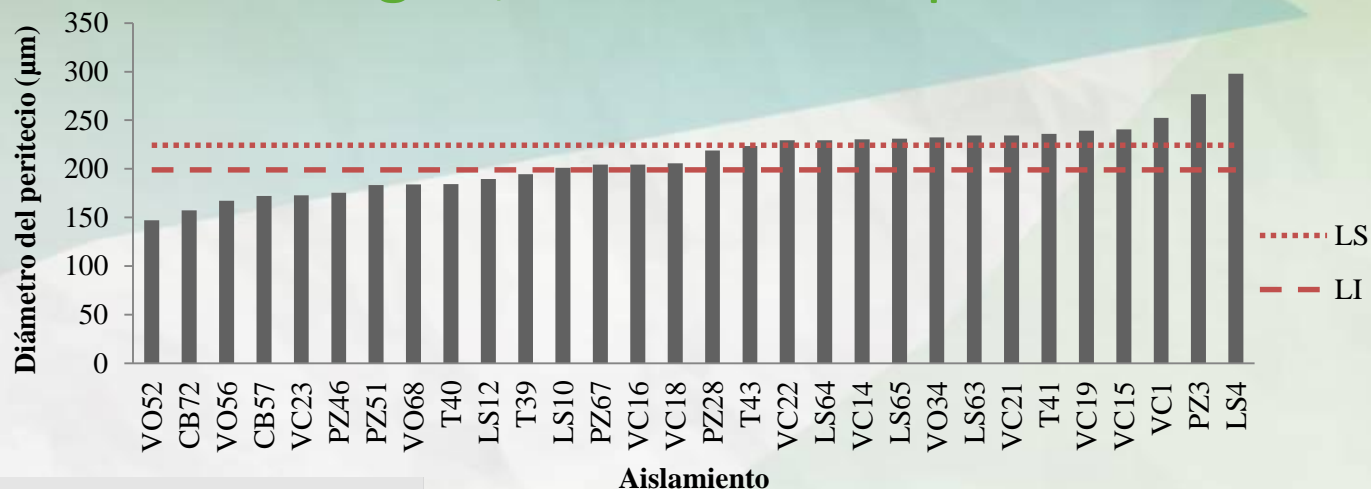


Resultados



Caracterización morfológica, Diámetro de peritecio

Tamaño del
diámetro del
peritecio (μm)
147-297



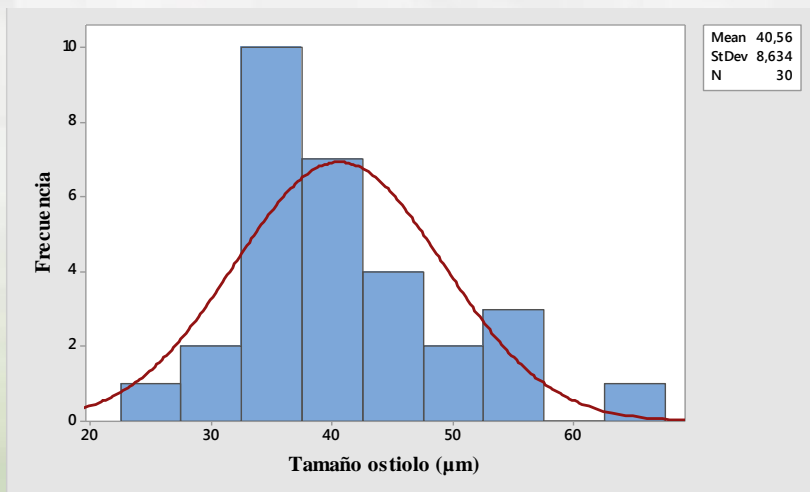
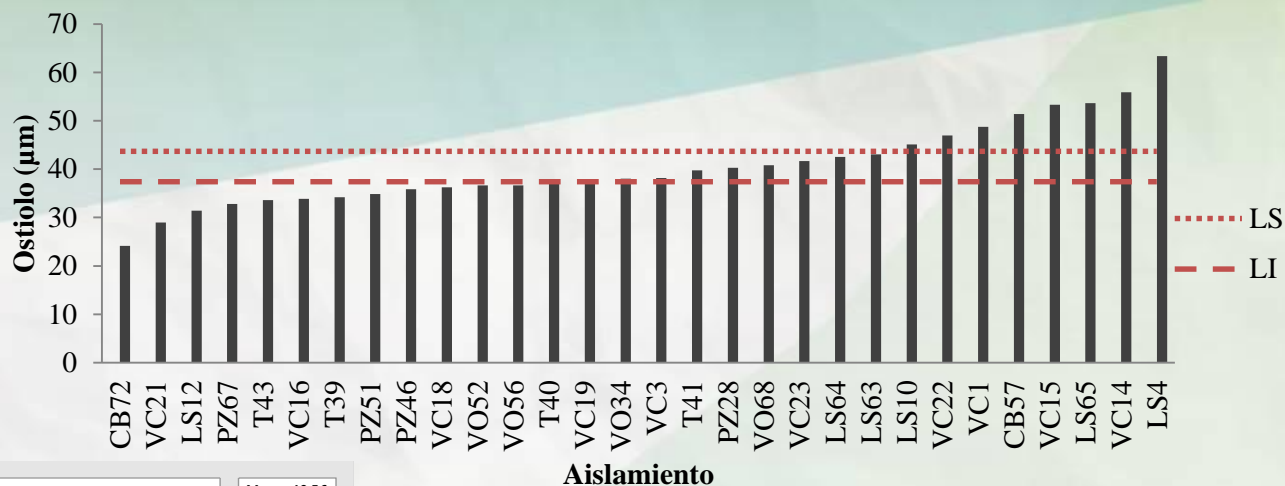
Frecuencia poblacional para el
tamaño (μm)

- 3,3 % (147)
- 93 % (157-276)
- 3,3% (297)



Resultados: Caracterización morfológica, Ostiolo de peritecio

Tamaño del ostiolo
del peritecio (μm)
24-63



Frecuencia poblacional para el
tamaño (μm)

- 43 % (24-37)
- 53 % (38-55)
- 3,3 % (63)



Resultados



Caracterización morfológica, Distribución peritecios y coloración colonia

- 40 % (12 aislamientos): Anillos concéntricos
- 57 % (17 aislamientos): Todo el medio
- 3 % (1 aislamiento): Grupo central

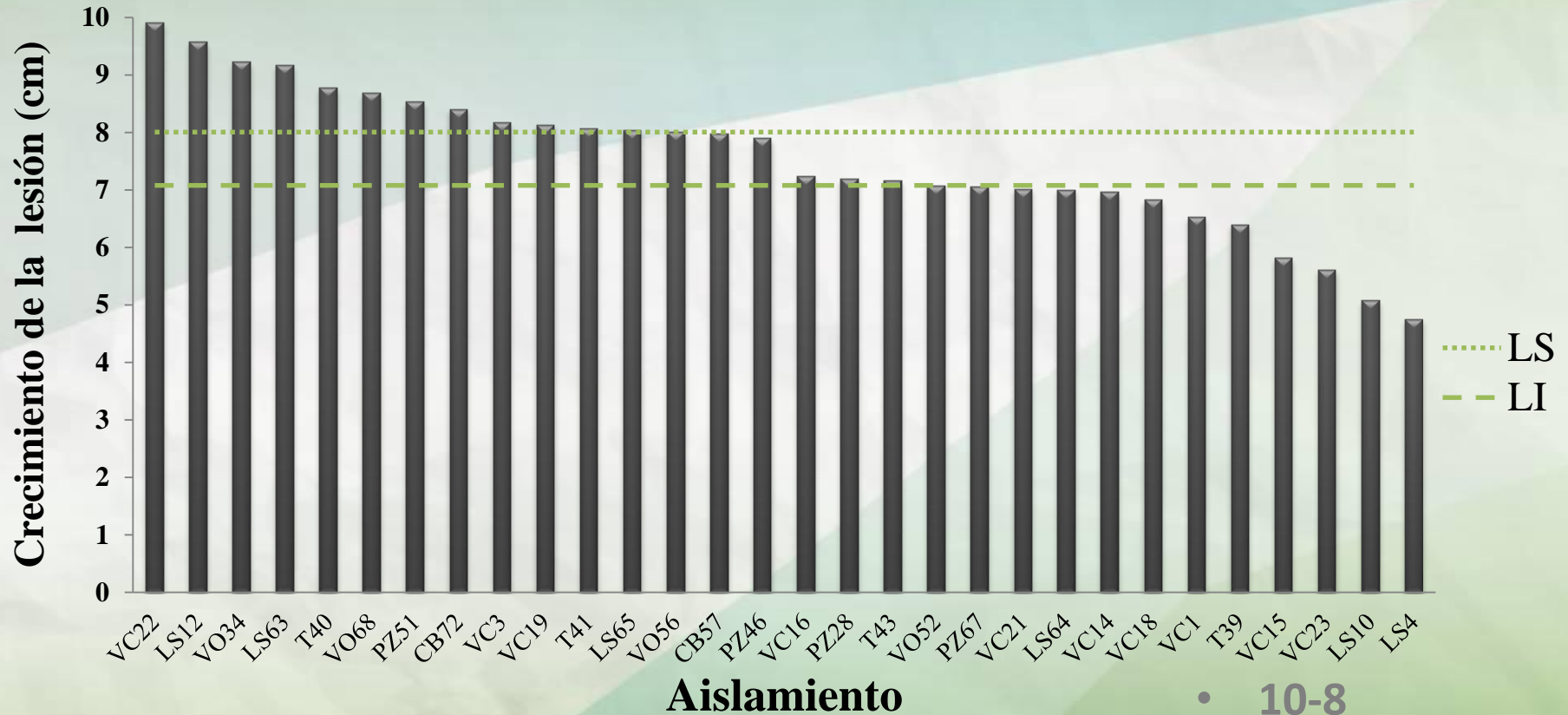
Color	N° de aislamientos
Amarillo	1
Olivo	18
Pardo grisáceo oscuro	1
Gris olivo	1
Marrón grisáceo	2
Marrón amarillento	1
Marrón	1
Gris olivo claro	1
Olivo pálido	3
Gris olivo oscuro	1





Resultados

Evaluación de la agresividad: Crecimiento final colonia



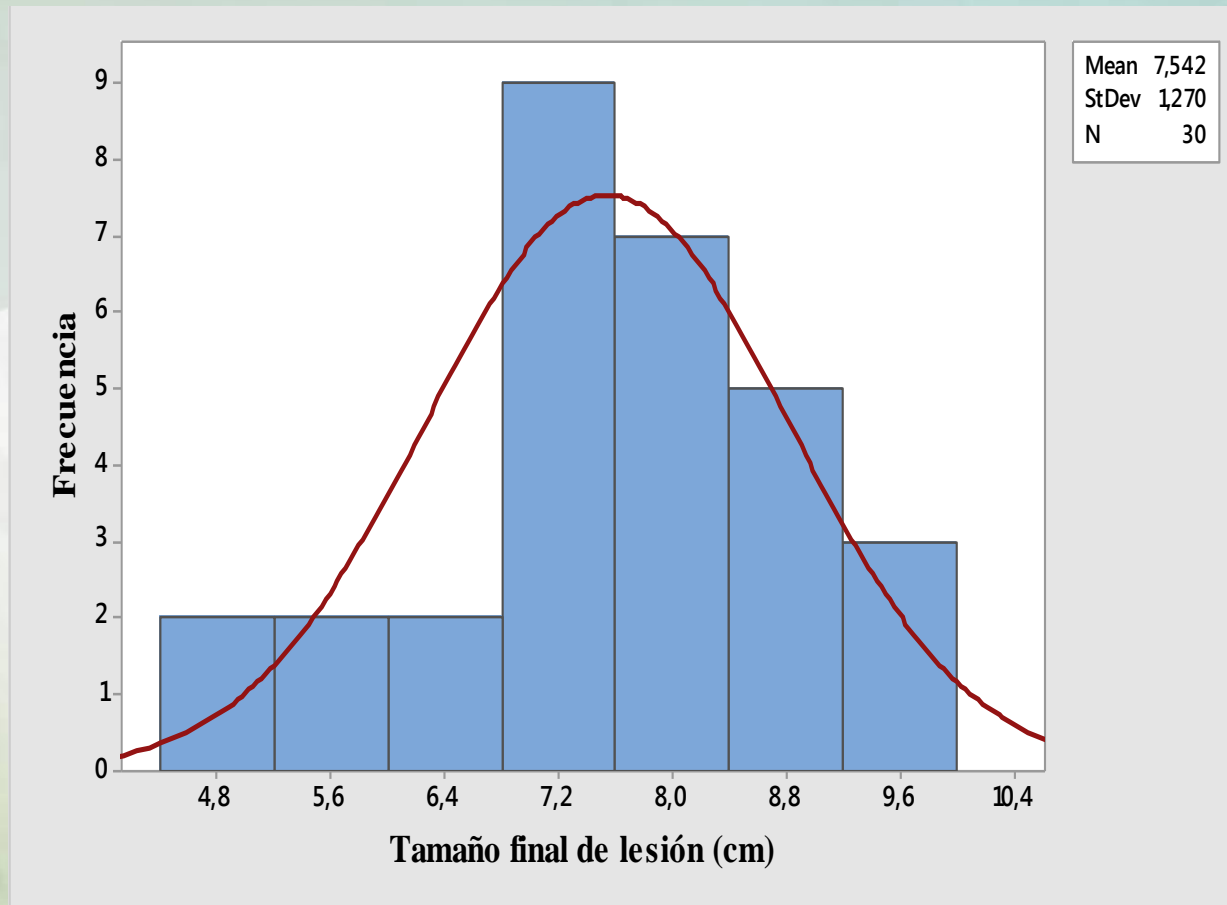
- 10-8
- 8-7
- 7-4,7



Resultados



Evaluación de la agresividad: Frecuencia poblacional de crecimiento final colonia



- 20 % (6,4)
- 70 % (7-8,8)
- 10 % (9,6-10)

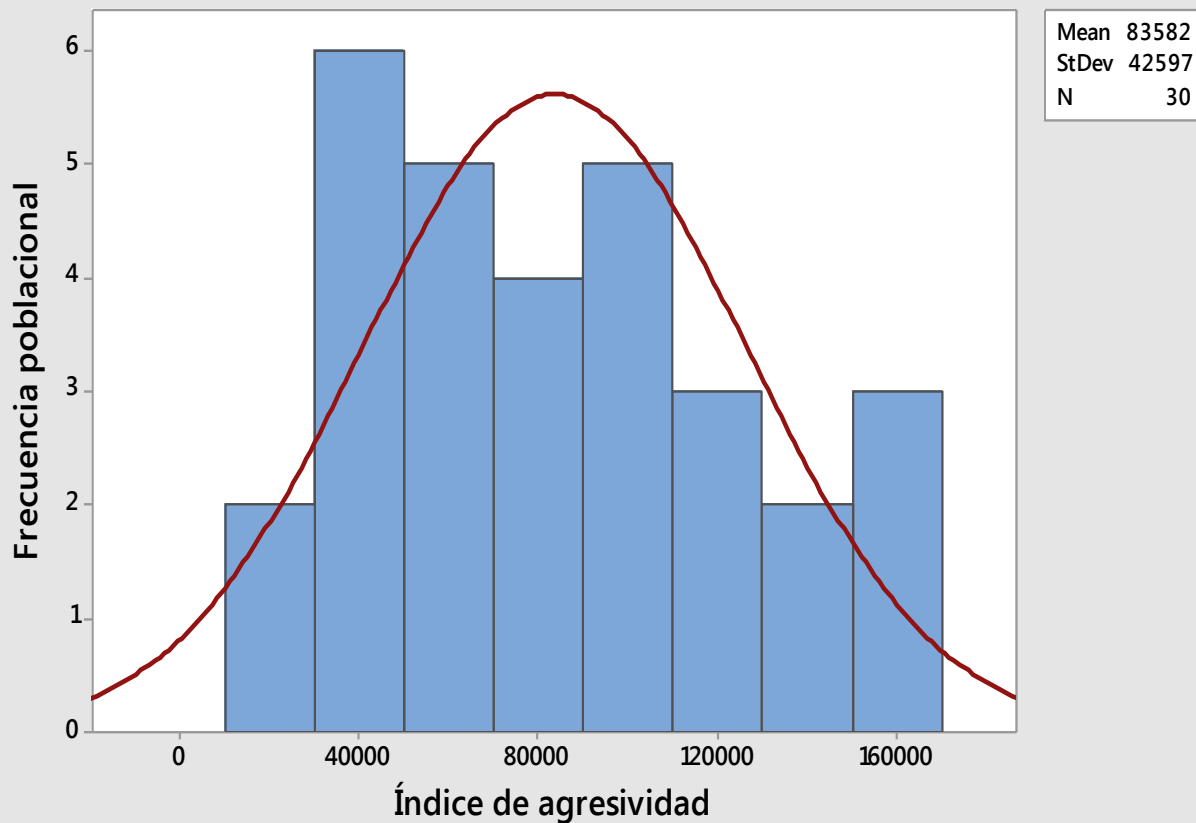


Resultados



Evaluación de la agresividad: Índice de Agresividad

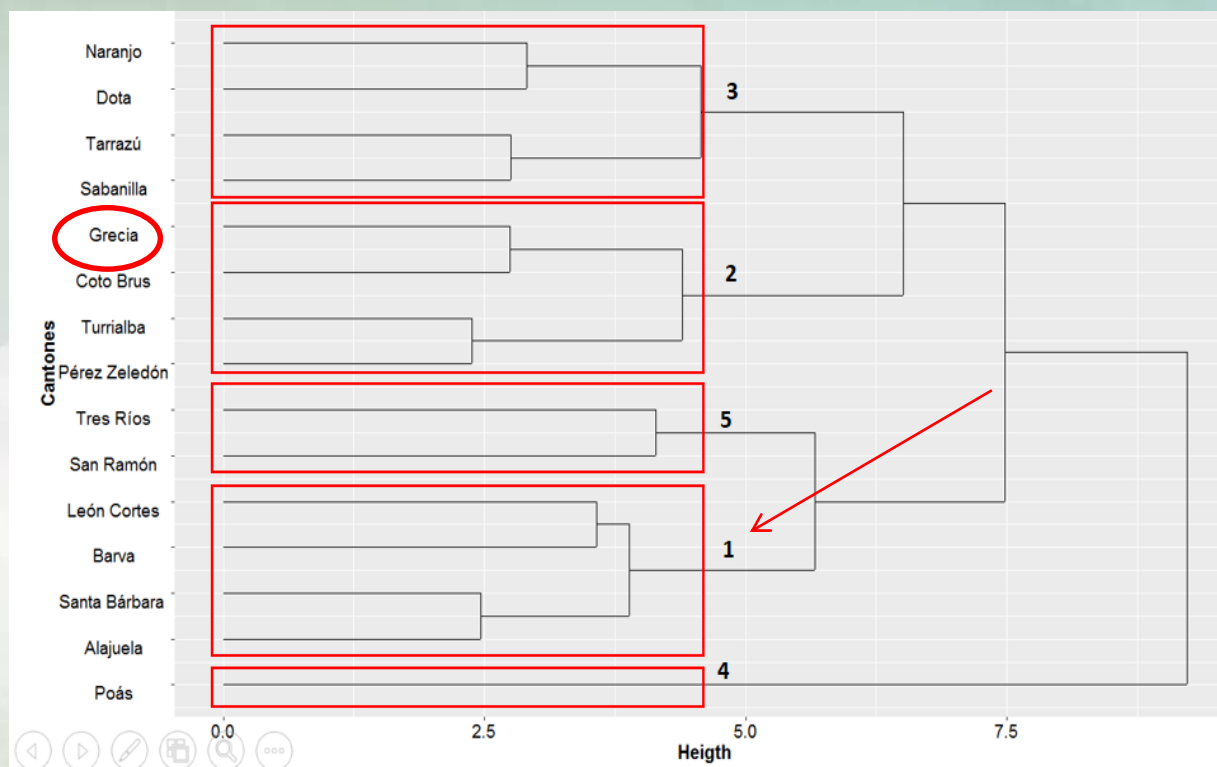
- 7 % (30000)-Bajos
- 50 % (40000-100000)-Mode. bajos
- 33 % (100000-140000)-Mode-altos
- 10 % (160000)-Altos





Resultados

Evaluación de la agresividad



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

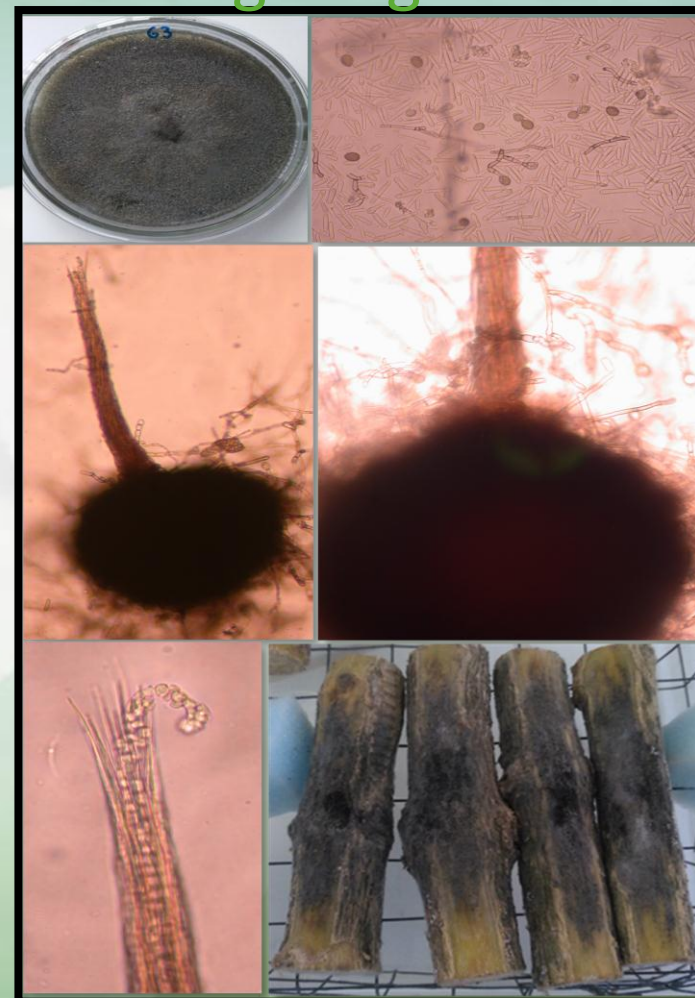
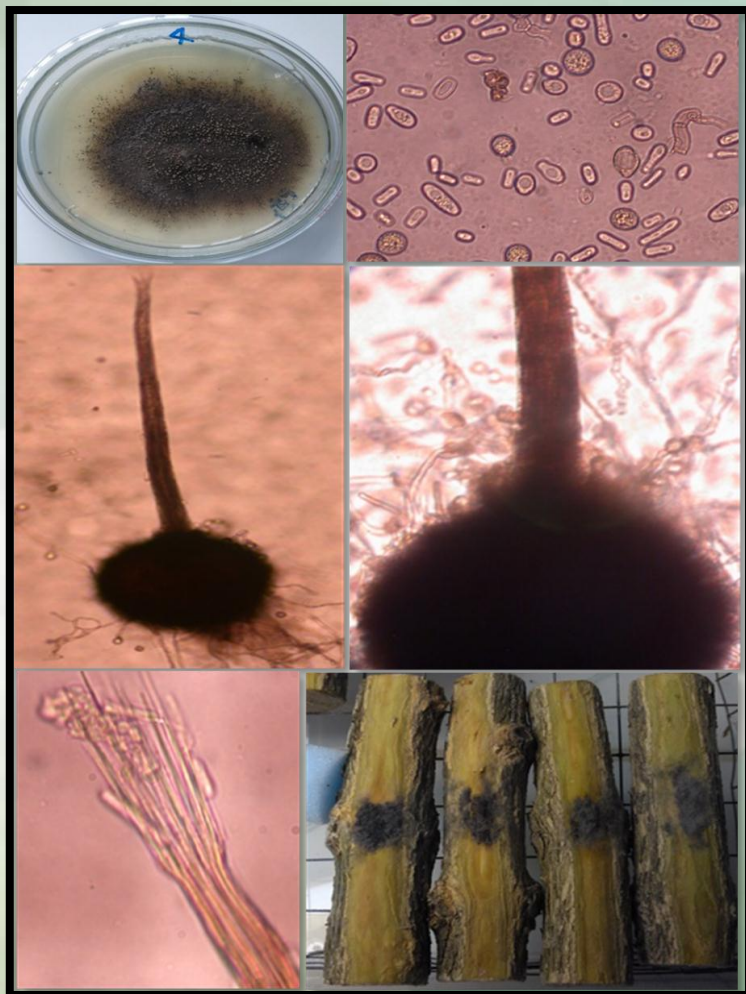


XXIII
Simposio
Latinoamericano
de Caficultura

Resultados



Identificación molecular: Morfología-Agresividad





Resultados

Identificación molecular: Morfología-Agresividad

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



Resultados

Identificación molecular: Comparación variables morfológicas otras especies en café

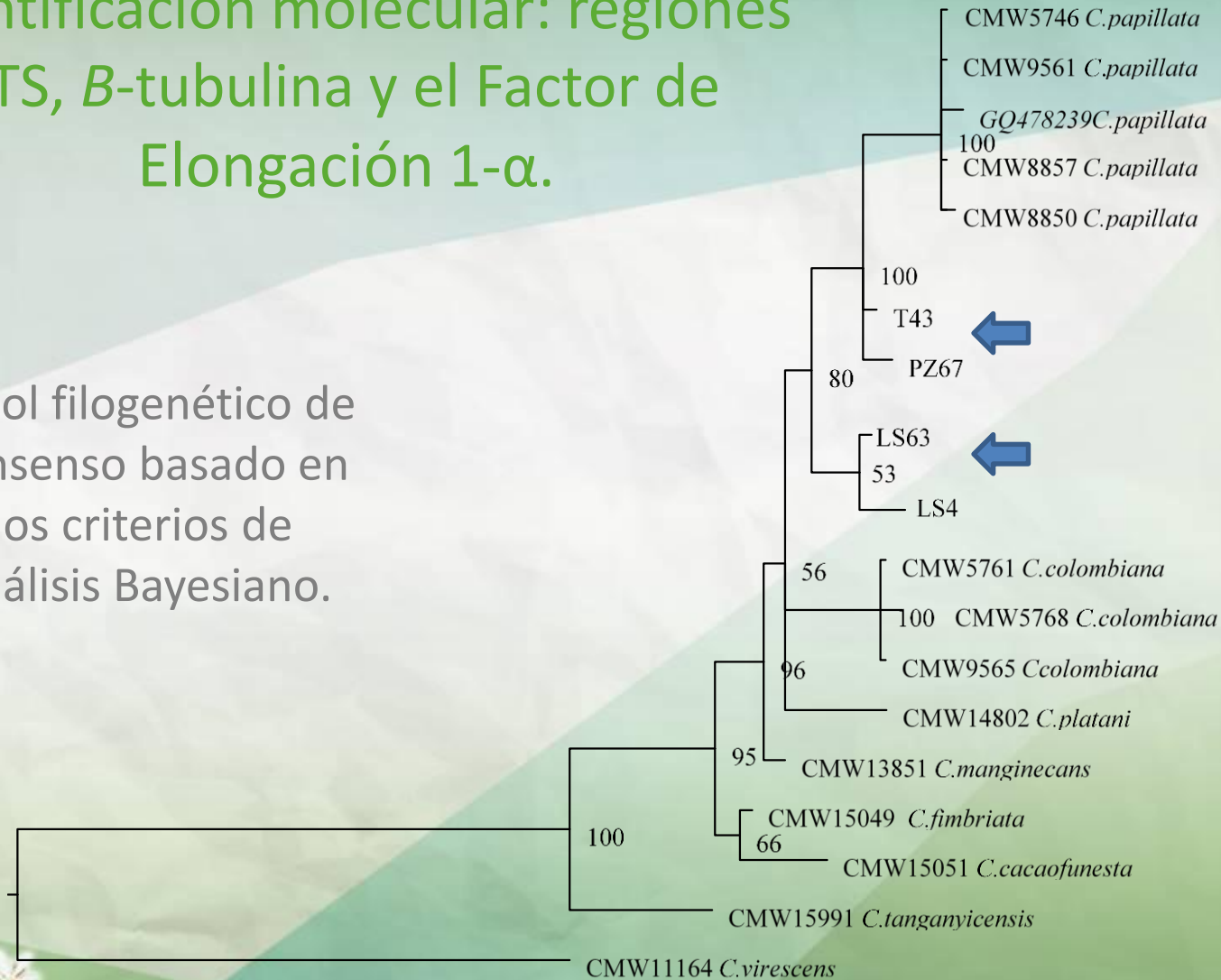
Tamaño (μm)

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



Identificación molecular: regiones ITS, *B*-tubulina y el Factor de Elongación 1- α .

Árbol filogenético de
consenso basado en
los criterios de
análisis Bayesiano.





Conclusiones



- Los síntomas ocasionados por patógenos de suelo como *Rosellinea* spp. y *Fusarium* spp. son similares a *Ceratocystis* spp. por lo que la verificación de una herida y la presencia de una lesión irregular es característico específico del género *Ceratocystis*.
- Existe una mayor presencia de la enfermedad en la región del Valle Central del país.
- Los aislamientos LS4, LS63, T43 y PZ67 presentan diferencias morfológicas entre ellos, pero mantienen las características similares del género y los aislamientos T43 y PZ67 muestran similitud con la especie *C. papillata*.
- Estos aislamientos presentan diferencias en su agresividad y no se muestra una relación directa de esta variable con aislamientos de la misma región geográfica cafetalera del país.



Conclusiones

- Existen diferencias en la morfología, agresividad y genética de los aislamientos de *Ceratocystis* spp. en la regiones cafetalera de Costa Rica.
- Se cuenta con el aislamiento más agresivo (LS63) para estudios en mejoramiento de plantas con resistencia u tolerancia a este patógeno.

Gracias