

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

**RELACIONES GENÉTICAS Y CARACTERÍSTICAS
FISIOLÓGICAS DE ESPECIES PROMISORIAS DE *Trichoderma*
COMO AGENTES BIOCONTROLADORES DE *Fusarium*
oxysporum Y *Pectobacterium carotovorum*, PATÓGENOS DE LA
PIÑA (*Ananas comosus*).**

Tesis de grado para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Estudiante

Josué Umaña Castro

Tutor

Dr. Ramón Molina Bravo

Asesores

Lic. Steffany Orozco Cayasso

M.Sc. Allan González Herrera

Campus Omar Dengo

Heredia, Costa Rica, 2018

**RELACIONES GENÉTICAS Y CARACTERÍSTICAS
FISIOLÓGICAS DE ESPECIES PROMISORIAS DE *Trichoderma*
COMO AGENTES BIOCONTROLADORES DE *Fusarium*
oxysporum Y *Pectobacterium carotovorum*, PATÓGENOS DE LA
PIÑA (*Ananas comosus*).**

Josué Umaña Castro

Estudiante

**Trabajo final de graduación de tesis sometida a consideración del
tribunal examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias para optar por el
grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica.**

**Trabajo final de graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de
Licenciado en Ingeniería Agronómica.**

Tribunal Examinador

M.Sc. Tomás Marino Herrera
Decano FCTM

Dr. Rafael Evelio Granados Carvajal
Director Escuela de Ciencias Agrarias

Dr. Ramón Molina Bravo
Director de tesis

Lic. Steffany Orozco Cayasso
Asesora

M.Sc. Allan González Herrera
Asesor

Josué Umaña Castro
Estudiante

DEDICATORIA

A mis Padres Damaris y Franklin que por sus esfuerzos tuve la oportunidad de seguir en este proceso de formación académica, realmente esto es para ustedes.

Mis hermanos Erick, Rodolfo y María José por siempre estar ahí cuando los necesitaba y a mis tíos y primos por su ayuda y palabras de aliento.

Mis amigos que también fueron parte de este proceso.

A todos y todas gracias, porque en las buenas y en las malas siempre estuvieron ahí, sobre todo en las malas. Personas como ustedes valen la pena tenerlos cerca.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biología Molecular y Fitopatología de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) por su gran colaboración y apoyo en esta investigación.

Al Dr. Ramón Molina Bravo, Lic. Steffany Orozco Cayasso y M.Sc. Allan González Herrera por brindarme todas las facilidades a su alcance en cuanto a materiales, apoyo profesional y seguimiento durante todo el proceso.

Al M.Sc. Rodolfo Umaña y M.Sc. Irena Hilje que prácticamente fueron dos asesores más. Y sin olvidar a Lic. Marilyn Blanco por su gran ayuda y motivación. Muchas gracias a todos.

RESUMEN

Costa Rica actualmente es el país que más aplica agroquímicos por área en el mundo. Por esta razón ha surgido el uso de agentes biológicos como alternativa para el combate de patógenos. Sin embargo, a veces éstos no son efectivos ya que no se tiene la certeza del género y especie. *Trichoderma* es un agente biológico ampliamente utilizado, pero es difícil identificar a nivel de especie solo por medio de características morfológicas. Además, *Trichoderma* forma complejos de especies por lo que aumenta la importancia de ser correctamente identificado. En este estudio se planteó determinar si características deseables para productos de control biológico dependen de las relaciones genéticas en *Trichoderma*. Se analizaron 15 aislamientos monospóricos de *Trichoderma* nativos de la Región Huetar Norte de Costa Rica con efecto antagónico contra patógenos de la piña. Para identificar las especies de este estudio, se secuenció el gen del factor de elongación de la traducción 1- α . Se midieron la velocidad de crecimiento a las 72 horas y el porcentaje de germinación a las 16 horas. La velocidad de crecimiento promedio de las cepas a 25°C varió desde 0.90 a 1.20 mm/h y el porcentaje de germinación entre un 3% a un 94% a las 16 horas. Las distancias genéticas entre las especies se midieron aplicándose seis internucleótidos (ISSR). Se identificaron cuatro especies: *T. reesei*, *T. spirale*, *T. asperellum/asperelloides* y *T. koningiopsis*. En condiciones controladas laboratorio la cepa 8a (*T. reesei*) mostró mayor efecto antagónico contra dos patógenos de la piña donde *F. oxysporum* tuvo un crecimiento de 30% en presencia de *Trichoderma* y *P. carotovorum* un 63%. Las distancias genéticas mostraron una alta diversidad inter e intraespecífica. Un test de Mantel determinó que no hay correlación entre las distancias genéticas y las distancias euclidianas de los parámetros de crecimiento ni con la respuesta de antagonismo. Se concluyó que estas características no son especie dependientes. Sin embargo, es muy importante medir estos parámetros ya que son importantes para obtener aislamientos de uso potencial

como agentes biológicos en el campo. En condiciones de laboratorio se recomienda darle a cada etapa del desarrollo del organismo antagónico características de temperatura, humedad y sustrato adecuadas para su buen desempeño como biopesticida. Se deben hacer pruebas a nivel de campo para observar el efecto antagónico bajo el ecosistema para así determinar el mejor aislamiento para combatir patógenos.

ABSTRACT

Costa Rica is currently the country that most applies agrochemicals by area in the world. For this reason, the use of biological agents has emerged as an alternative for the combat of pathogens. However, sometimes it does not have effective effects that do not have the certainty of gender and species. *Trichoderma* is a widely used biological agent, but it is difficult to identify a species level only by means of morphological characteristics. In addition, *Trichoderma* forms species complexes so it increases the importance of being so identified. In this study it was proposed to determine if the desirable properties for the biological control of genetic relationships in *Trichoderma*. It was pointed out 15 monosporic isolates of *Trichoderma* native to the Huetar Norte region of Costa Rica with antagonistic effect against pineapple pathogens. To identify the species in this study, the translation elongation factor gene 1- α was sequenced. The growth rate was measured at 72 hours and the percentage of germination at 16 hours. The average growth rate of the strains at 25°C varied from 0.90 to 1.20 mm / h and the percentage of germination between 3% and 94% at 16 hours. The genetic distances between the species were measured by applying six intermicrosatélites (ISSR). Four species were identified: *T. reesei*, *T. spirale*, *T. asperellum* / *asperelloides* and *T. koningiopsis*. Under controlled conditions, laboratory strain 8a (*T. reesei*) had a greater antagonistic effect against two pineapple pathogens where *F. oxysporum* had a 30% growth in the presence of *Trichoderma* and *P. carotovorum* by 63%. The genetic distances are a high inter and intraspecific diversity. A Mantel test determined that there is no correlation between the genetic distances and the Euclidean distances of the growth parameters nor with the antagonism response. It was concluded that these characteristics are not dependent species. However, it is very important to measure these parameters since it is important to obtain isolates of potential use as biological agents in the field. In laboratory conditions it is

recommended to give each stage of the development of the antagonistic organism characteristics of temperature, humidity and substrate suitable for its good performance as a biopesticide. Field tests must be done to observe the antagonistic effect under the ecosystem in order to determine the best isolation to combat pathogens.

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	15
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	19
REVISIÓN DE LITERATURA.....	21
Principales enfermedades del cultivo de la piña en Costa Rica.	21
<i>Fusarium</i> sp.	21
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	22
Combate biológico	23
Generalidades sobre <i>Trichoderma</i>	23
Identificación de Especies	25
Gen del factor de elongación de la traducción 1- α	26
Intermicrosatélites (ISSRs).....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Origen y reproducción de los aislamientos	28
Velocidad del crecimiento micelial y porcentaje germinación (viabilidad).....	29
Identificación de especies y análisis molecular.....	30
Relaciones genéticas de los aislados de <i>Trichoderma</i>	31
Análisis de datos.....	32
Crecimiento diametral y porcentaje de germinación (viabilidad)	32
Análisis genético	32
RESULTADOS.....	34
Velocidad del crecimiento micelial y porcentaje germinación.	34
Antagonismo de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>F. oxysporum</i> y <i>P. carotovorum</i> <i>in vitro</i>	37

<i>F. oxysporum</i>	37
<i>P. carotovorum</i>	38
Análisis genéticos.....	39
DISCUSIÓN.....	44
Velocidad del crecimiento micelial y porcentaje germinación (viabilidad de conidios)	44
Análisis Genéticos.....	46
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50
LITERATURA CITADA.....	53
ANEXOS	64

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Tests Kruskall-Wallis realizado a los aislamientos de *Trichoderma* en donde se muestra la velocidad de crecimiento en ($\text{mm} \cdot \text{hr}^{-1}$). Ajuste del valor p con el método de Holm. **27**
- Cuadro 2.** Análisis *post hoc* de Tukeys realizado a los porcentajes de germinación de cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* tomado a las 16 horas de desarrollo en 20mL de medio agar agua, a una concentración de 1×10^6 conidios h^{-1} a temperatura ambiente (25°C). Ajuste del valor p con el método de Holm. **28**
- Cuadro 3 .** Tests Kruskall-Wallis realizado a los promedios de crecimiento en mm de *F. oxysporum* en presencia de aislamientos de *Trichoderma* a los 5 días de su desarrollo en medio PDA. Ajuste del valor p con el método de Holm. **30**
- Cuadro 4.** Tests Kruskall-Wallis realizado a los promedios de crecimiento en mm de *P. carotovorum* en presencia de aislamientos de *Trichoderma* con 5 días de desarrollo en medio PDA. **33**
- Cuadro 5.** Resultados de la secuenciación de los fragmentos EF-728M y EF700F (500-600pb) del (*TEF1*) de los aislamientos de *Trichoderma*. Porcentajes de identidad fueron calculados por medio de la herramienta en línea BLAST Nucleotide del NCBI. **32**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Conidios de *Trichoderma* en una porción de agar agua vistos al microscopio (40X) a las 16 hr de su desarrollo. **29**
- Figura 2.** Productos de PCR del gen (*TEF1*) de los aislamientos de *Trichoderma* vistos en un gel de agarosa al 1%. Donde M= marcador de peso molecular 1kb. Los números de muestra 11c, 13a, 1a, 13c, 1c, 11e y 13b corresponden a una parte de los aislamientos de *Trichoderma* analizados por medio del gen (*TEF1*)..... **32**
- Figura 3.** Dendrograma filogenético de máxima verosimilitud basado en las secuencias parciales del gen (*TEF1*) que incluye cepas de *Trichoderma* aisladas de la Zona Norte de Costa Rica (las utilizadas en este estudio) y secuencias obtenidas del Genbank® (21 accesiones) todas de la especie *Trichoderma*. El valor mostrado en las ramas indica los valores de reemplazo mediante 2000 permutaciones. Se utilizaron como grupo externo dos secuencias de *Fusarium oxysporum*..... **33**
- Figura 4.** Dendrograma de distancias (relaciones) genéticas mediante el método NJ (Neighbor Joining) con las cepas de *Trichoderma* de la Zona Norte de Costa Rica anteriormente identificadas. En donde el grupo 1 corresponde a *T. spirale*, Grupo 2: *T. asperellum*, Grupo 3: *T. koningiopsis* y Grupo 4: *T. reesei*..... **34**

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Crecimiento de aislamientos de *Trichoderma* a las 72 hr de su desarrollo, a una temperatura ambiente de 25°C..... **51**
- Anexo 2.** Códigos y procedencia de las muestras de *Trichoderma* aisladas de suelo en zonas boscosas en la zona Norte de Costa Rica..... **52**

INTRODUCCIÓN

El manejo de las arvenses, insectos y patógenos constituye un objetivo prioritario de las prácticas agrícolas. Esta actividad se ha desarrollado de manera poco eficaz, y ha sufrido un impulso a raíz de la segunda revolución verde con la aparición de abonos y plaguicidas químicos al final del siglo XIX, los cuales provocan una inminente contaminación del suelo y de los cultivos (Castillo 2005). En Costa Rica el constante crecimiento del monocultivo de la piña, genera un aumento en las aplicaciones de productos agroquímicos para mantenerlo libre de arvenses y enfermedades. Esta situación tiene como consecuencia problemas en la salud humana por la contaminación de mantos acuíferos con los residuos que se generan (Arboleda y Aguirre 2008).

Navarro y Gómez (2015), indican que la producción de piña en Costa Rica ha llegado hasta 40000ha sembradas, y que está enfocado a la exportación principalmente a Estados Unidos y países Europeos. La región Huetar Norte tiene 11170 ha sembradas del monocultivo, lo cual representa un 53.7% del área cultivada en la zona. Ramírez (2009) menciona que la interacción biológica en el suelo y su fertilidad natural relacionada con la degradación microbial de la materia orgánica es afectada debido a que los organismos benéficos son eliminados. Adicionalmente, Ramírez (2009) demuestra que en los mantos acuíferos de la zona de El Cairo de Siquirres se encontraron residuos de plaguicidas utilizados en la piña, como el Bromacil, Diuron y Triadimefon. Además, según Navarro y Gómez (2015), la aplicación de productos agroquímicos en el cultivo de piña provoca un efecto negativo no solo para los patógenos, sino que también para otras especies asociadas al suelo, aunque estas no sean un peligro para la producción del fruto.

Existen diferentes enfoques que pueden ser usados para prevenir, mitigar o manejar enfermedades de las plantas. Más allá de las buenas prácticas agronómicas y hortícolas, los productores a menudo se basan en gran medida en los fertilizantes y productos agroquímicos. Sin embargo, la contaminación ambiental causada por el uso excesivo de éstos, ha dado lugar a considerables cambios en las actitudes de las personas hacia el uso de plaguicidas en la agricultura (Pal y Gardener 2009). Por lo anterior el uso de agentes de combate biológico se ha convertido en una opción para el manejo de enfermedades de los cultivos y surge el uso de biocontroladores de patógenos como *Trichoderma*.

Desde los primeros estudios sobre organismos antagonistas hasta el presente, el hongo del género *Trichoderma* ha sido uno de los organismos más investigados y se ha usado para el combate biológico de diferentes patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* sp., *Alternaria* sp., entre otros (Infante y Martínez 2009). Vásquez (2009) obtuvo resultados favorables con un aislamiento de *Trichoderma* proveniente de una finca piñera en la zona de Venecia de San Carlos donde logró una colonización del 85% sobre *Fusarium oxysporum* mediante pruebas de antagonismo con la técnica de cultivos duales y potencial fungistático. Asimismo, Villamil *et al.* (2014) utilizaron aislamientos de *Trichoderma* spp. Para la reducción de incidencia del hongo *Moniliophthora roreri* en frutos de cacao en un 28% en comparación con un testigo sin *Trichoderma*.

Además de ser utilizado para el combate biológico de hongos fitopatógenos, *Trichoderma* funciona para el manejo de bacterias fitopatógenas como *Pectobacterium carotovorum* en

el cultivo de la piña (Vargas 2011). Por otro lado, Astorga *et al.* (2013) obtuvieron una colonización progresiva del hongo *Trichoderma* sp. Sobre *Pseudomonas marginalis* del ajo en Cartago, Costa Rica y alcanzó un valor de supresión del 32%, demostrando que el hongo del género *Trichoderma* funciona también como antagonista de varios géneros de bacterias.

Chaverriet *al.* (2015) evaluaron cuatro productos comerciales de *Trichoderma* reportados como *T. harzianum* para combate biológico. Después de aislar las cepas de estos productos, encontraron e identificaron 14 especies diferentes de *Trichoderma*; sin embargo, ninguna coincidió con lo reportado por el comerciante (*T. harzianum*). Esto señala que existen mezclas de especies en productos comerciales y que no se está aplicando un agente identificado para un control uniforme y de calidad. Esto también señala la gran necesidad de la identificación correcta en productos comerciales. Adicionalmente, Xu *et al.* (2011), en un metaanálisis de 465 tratamientos, encontraron que la combinación de agentes biológicos no tuvo un efecto sinérgico contra el organismo blanco, posiblemente por efectos de competencia. Por lo tanto, es crucial estudiar el desempeño y la biología de aislamientos monospóricos (genéticamente puros), así como la identificación correcta de los mismos.

Martínez *et al.* (2013), mencionan que la taxonomía basada en caracteres morfológicos no es suficiente para diferenciar las especies del género *Trichoderma* debido a la gran similitud que existe entre ellas. Por lo tanto, la aplicación de técnicas moleculares es necesaria para la identificación y clasificación de este género. Por otro lado, Hoyos *et al.* (2008) mencionan que los aislamientos de una misma especie de *Trichoderma* son específicos en su actividad micoparasítica, por lo tanto, la actividad antagonista de un

aislamiento no está determinada sólo por la especie. Por ello, además de la identificación de especie, es importante determinar las relaciones genéticas entre aislamientos de una misma especie. Esto se puede realizar por medio de marcadores moleculares, tales como los intermicrosatélites, que han demostrado ser útiles para medir relaciones genéticas entre cepas de *Trichoderma* (Consolo *et al.* 2012).

Es de importancia tener información sobre las condiciones óptimas para la germinación y crecimiento de cada hongo, porque brindaría una idea de su crecimiento *in vitro* para la elaboración de un producto de combate biológico a nivel masivo. Guigón *et al.* (2010), en análisis moleculares realizados a cepas de *Trichoderma* aisladas a partir de suelo, demostraron la tasa de crecimiento del micelio como una característica fisiológica importante para pronosticar la capacidad de biocontrol de las cepas en donde obtuvieron resultados promisorios por lo que es útil para una primera referencia en laboratorio al caracterizar cepas de este género. Así mismo Aceves *et al.* (2008) evaluaron el porcentaje de viabilidad de esporas de *Trichoderma harzianum* en diferentes sustratos orgánicos para así escoger el mejor medio de propagación del hongo a la hora de elaborar un producto de combate biológico en donde sustratos orgánicos con un alto porcentaje de humedad, pero bajo contenido de minerales, proteínas y grasas, registraron una producción y viabilidad de esporas de $4.43 \times 10^8 \text{mL}^{-1}$ y 99.0%, respectivamente

En un estudio previo elaborado por personal del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional se colectaron 15 aislamientos de *Trichoderma* provenientes de fincas piñeras en la zona Norte de Costa Rica donde se demostró de forma *in vitro* su capacidad

antagónica contra *Fusarium oxysporum* y *Pectobacterium carotovorum*. Estos se preservaron en la colección de hongos de este laboratorio sin embargo, es de importancia caracterizarlos genética y morfológicamente.

En este estudio esos 15 aislamientos de *Trichoderma* se caracterizaron y se determinaron sus relaciones genéticas por medio de dos sistemas de marcadores moleculares y dos características fisiológicas. Se analizaron el crecimiento diametral y el porcentaje de germinación (viabilidad) de esporas de cada uno de ellos. Pruebas previas a este estudio demostraron que estos aislamientos tienen actividad antagónica *in vitro* contra los patógenos de la piña, *F. oxysporum* y *P. carotovorum*, por lo tanto, se realizaron distintos análisis para elucidar las especies asociadas a secuencias de marcadores genéticos, sus relaciones genéticas y fisiológicas.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar 15 aislamientos de *Trichoderma* promisorios para el combate de patógenos de la piña, por medio de dos sistemas de marcadores genéticos y dos características fisiológicas para el combate biológico de enfermedades.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Medir el crecimiento diametral y calcular el porcentaje de germinación (viabilidad) de esporas de cada uno de los aislamientos.

- Identificar las especies a las que pertenece cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* por medio de secuenciación del factor de elongación 1- α (*TEF1*).
- Determinar las relaciones genéticas presentes mediante análisis por intermicrosatélites (*ISSR*) y las secuencias de dos regiones del 1- α (*TEF1*).
- Correlacionar las relaciones genéticas de los aislamientos con las características fisiológicas anteriormente determinadas y una característica morfológica de la base de datos del laboratorio de Fitopatología (antagonismo *in vitro*).

REVISIÓN DE LITERATURA

Principales enfermedades del cultivo de la piña en Costa Rica.

La piña en Costa Rica presenta enfermedades atribuidas a hongos y bacterias. Según García y Rodríguez (2012) los principales agentes causales son: los oomicetes *Phytophthora parasítica* y *P. cinnamomi*, los hongos *Thelaviopsis paradoxa*, y *F. oxysporum*, y la bacteria *P. carotovorum*. Estos generan pérdidas para el productor, así como el uso de altas cantidades de productos agroquímicos para intentar manejarlos.

Fusarium

García y Rodríguez (2012) indican que este hongo fitopatógeno es el de mayor dispersión mundial. Vázquez (2009) lo identificó en el cultivo de la piña en Costa Rica mediante marcadores moleculares como *Fusarium oxysporum*. Este hongo se caracteriza por producir tres tipos de esporas: microconidios, macroconidios y clamidosporas. Por medio de las clamidosporas, el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables, también sobrevive en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes (Garcés *et al.* 2001). Es una de las especies con mayor importancia fitopatológica ya que cuenta con un gran número de plantas hospedantes y es uno de los hongos que más daño económico ocasiona provocando marchitamientos vasculares, seguido por la muerte de la planta (Arbeláez 2001). Además, Fasio *et al.* (2003) indican que las plantas pueden presentar achaparramiento, epinastia, amarillamiento de las hojas inferiores, en tallos y hojas jóvenes presentan marchites, defoliación, necrosis marginal y muerte de la planta. Este hongo puede permanecer como inóculo en el suelo, coronas, hijos, frutas y su método

de dispersión es por el viento, lluvia, insectos y material vegetal (García y Rodríguez 2012).

Pectobacterium carotovorum

Según Reinoso *et al.* (2006) *P. carotovorum*, (*Erwinia carotovora*) es una bacteria fitopatógena que causa la pudrición blanda y se presenta en regiones subtropicales y templadas en una amplia variedad de cultivos. Es una bacteria Gram negativa, flagelada y móvil, produce la segunda enfermedad más conocida en piña después de *Phytophthora* y se presenta en puntos de maltrato mecánico como bordes, sitios de ingreso de personal o de maquinaria. La susceptibilidad del cultivo a esta bacteria se encuentra entre los seis y siete meses después de la siembra. Esta enfermedad afecta a la piña en los momentos de transición climática, con humedad suficiente y altas temperaturas (García y Rodríguez 2012).

Los síntomas generales son pudriciones acuosas de coloración café y mal olientes que se inician en la base de las hojas centrales de las rosetas. En algunos casos se observan exudados desde las pústulas, los cuales son una fuente de inóculo para las infecciones secundarias (Kaneshiro *et al.* 2008). El manejo de este patógeno se dificulta debido a su diseminación por el agua, maquinaria agrícola y en los restos de cosecha.

La incidencia de ambas enfermedades es alta, lo que implica una aplicación sistemática de productos químicos que causan el surgimiento de plagas primarias y secundarias, el

desarrollo de resistencia genética, la contaminación del medio ambiente y afecciones a la salud humana (Reinoso *et al.* 2006).

Combate biológico

El combate biológico se define como cualquier práctica a través de la cual la supervivencia, actividad o incidencia de un agente patógeno o enfermedad se reducen por la mediación de cualquier organismo biológico (Reina *et al.* 2013). Investigaciones sobre el combate biológico de plagas se orientan a unificar esfuerzos para el desarrollo de insumos alternativos a los productos químicos sintéticos para el manejo de plagas y enfermedades, entre estas alternativas se encuentra el combate biológico (Pall y Gardener 2009).

Reina *et al.* (2013) mencionan que el uso de microorganismos para el manejo de enfermedades que limitan la productividad en cultivos ha recibido mucha atención en los últimos años. En la mayoría de ocasiones utilizan productos químicos aplicados al suelo, semillas, follajes y frutos, causando consecuencias negativas sobre la salud humana y el medio ambiente por su toxicidad, persistencia y mal uso, por lo tanto, se produjo la búsqueda de sustitutos biológicos de productos agroquímicos como por ejemplo *Trichoderma*, *Gliocladium roseum*, entre otros. (Sutton *et al.* 1997).

Generalidades sobre *Trichoderma*

Velasco (2013) indica que *Trichoderma* es la fase asexual del hongo, mientras que *Hypocrea* es la fase sexual. Según Infante *et al.* (2009), las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprofitos que viven en suelos con diferente cantidad de materia orgánica, son capaces de descomponerla y en determinadas

condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les da una mayor plasticidad ecológica. Se le puede encontrar en todo el mundo, desde zonas polares hasta el ecuador. Presenta una alta capacidad enzimática para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos, además, la habilidad de *Trichoderma* para reducir los daños causados por hongos fitopatógenos está relacionada a su capacidad de competición y antibiosis por la producción de enzimas líticas y otros metabolitos secundarios, así como a su micoparasitismo (Aceves *et al.* 2005). *Trichoderma* sp. mostró resultados promisorios como antagonista para el manejo de *Fusarium solani* donde muchos cultivos funcionan como hospedantes, principalmente el tomate, así como *Sclerotinia sclerotiorum* en papa y hortalizas (Sousa *et al.* 2009). Por otro lado, Zúñiga (2013) logró combatir los patógenos *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfsii*, agentes causales de la pudrición de la cebolladestruyendo en un 64% las hifas de ambos patógenos.

Infante *et al.* (2009) definen la competición, antibiosis y el micoparasitismo de la siguiente manera: “La competencia es el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes) siempre y cuando las utilidades de éste por uno de los organismos reduzcan la cantidad o espacio disponible para los demás. El micoparasitismo es una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares como quitinasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados. Antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos”

Existen una gran cantidad de especies del género *Trichoderma* que están ampliamente distribuidas en todo el mundo en diferentes zonas y hábitats y tienen aplicación en la agricultura fundamentalmente para el combate biológico de otros organismos patógenos (Salazar *et al.* 2012), por lo tanto es de importancia conocer las especies que ejercen un efecto antagónico sobre otros organismos que causan enfermedades.

Identificación de Especies

Los caracteres morfológicos son muy utilizados en la identificación de hongos debido a que sigue siendo el método más económico y rápido. Sin embargo, la inclusión de información molecular en estudios de sistemática y análisis de poblaciones está cambiando la base para la clasificación de estos organismos (Soriano 2007). Según Azofeifa (2006), entre las técnicas moleculares utilizadas en la actualidad para la identificación de especies de hongos y bacterias se encuentra la secuenciación de marcadores genéticos (regiones o genes específicos) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es un procedimiento *in vitro* para la síntesis y duplicación de secuencias específicas de ADN. Esta tecnología utiliza oligonucleótidos que inician la síntesis de fragmentos de ADN (Primers o cebadores). Usa, según la técnica, uno o dos oligonucleótidos sintéticos generalmente entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco y diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (conocidos como ciclos térmicos), cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada, y la síntesis a partir del iniciador de una doble cadena mediante la acción de la ADN polimerasa.

La ADN polimerasa es una enzima que en unas condiciones determinadas, y en presencia de un cebador, es capaz de producir millones de copias de determinados fragmentos del ADN plantilla durante el proceso de PCR. Estos fragmentos se separan posteriormente por peso molecular y mediante técnicas electroforéticas, se obtiene un patrón de bandas específico que nos permite diferenciar individuos. Numerosos marcadores moleculares se basan en la técnica de PCR para su ejecución, como por ejemplo los RAPDs, SSR, ISSR, SNPs, ITSs (Azofeifa 2006).

Gen del factor de elongación de la traducción 1- α

Los marcadores moleculares asociados a regiones ITS (Internal transcribed spacer) han sido considerados como la región oficial para la identificación de hongos (Druzhinina *et al.* 2005, Druzhinina *et al.* 2006, Schoch *et al.* 2012). Sin embargo en otros grupos como los *Hypocreales* la identificación ha sido limitada e imprecisa por lo tanto, Chaverriet *al.* (2015) utilizando marcadores moleculares del gen (*TEF1*) lograron distinguir de manera correcta aislamientos biocontroladoras de *Trichoderma* de uso comercial. Este gen tiene la mayoría de caracteres filogenéticamente informativos para este objetivo, siendo las regiones más informativas el cuarto y quinto intrón además del sexto exón, seguido del gen Calmodulina (*CAL*), secuencias de ADN de la α -actina (*ACT*) y la subunidad 2 de la RNA polimerasa II (*RPB2*). (Chaverriet *al.* 2015).

Según Acevedo (2013), “(*TEF1*) se considera como un gen esencial en el análisis multigénico por las siguientes razones: La presencia de una única copia en el genoma de los eucariotas, la no detección de copias ortólogas, su riqueza de regiones intrónicas, alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente cercanas y la posibilidad de generar

cebadores universales que permiten estudios a través de los límites filogenéticos de hongos. Además, la gran utilidad de la secuencia del (*TEFI*) es debida principalmente a que de los 656 nucleótidos que lo componen en promedio 39 de ellos son considerados cladísticamente significativos.” Por lo tanto el gen del factor de elongación será de utilidad para tratar de encontrar posibles similitudes de las cepas con los datos de la herramienta BLAST (Acevedo 2013).

También Chaverriet *et al.* (2013) en su estudio de evolución de la preferencia en los hábitat de *Trichoderma* spp utilizaron estos genes, siendo el (*TEFI*) el más informativo. Además, Umaña (2014) obtuvo secuencias más informativas utilizando este gen con los mismos cebadores usados por Chaverri *et al.* (2015) los cuales fueron EF-728M-, Ef2-r y EF700F-, TEF1R-r en comparación con los ITS.

Intermicrosatélites (ISSRs)

Además del gen (*TEFI*) existen otro tipo de marcadores genéticos, los ISSRs que permiten analizar la diversidad genética entre especies porque son altamente polimórficos y han probado su utilidad en estudios de diversidad genética, filogenia, identificación de genes, mapeo genético y biología evolutiva. (Zietkiewicz *et al.* 1994).

Son un tipo de marcador genético que permite obtener los niveles de variación entre las regiones microsatélites que se encuentran dispersas en varios genomas, en especial el nuclear. Son marcadores semiarbitrarios amplificados por la PCR a partir de la presencia de un oligonucleótido o cebador complementario a un microsatélite. La molécula generada con un determinado peso molecular se considera un locus, que representa el segmento de ADN entre los microsatélites. El polimorfismo entre individuos de la misma población puede

detectarse, ya que el análisis es sensible a la presencia-ausencia del elemento genómico reconocido por el cebador y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (González y Aguirre 2007).

Según Consolo *et al.* (2012), los ISSRs funcionan para evaluar la diversidad genética entre hongos. Esto se evidencia en su estudio en el cual se evaluó la diversidad en cepas de *Trichoderma* sp. con diferentes tipos de intermicrosatélites, CT (AC)8, (AG) 8TA,ACA (CAA)5 (GA) 8ACC, (AG)8,(AATG)4,(CAA) 5ACG,TCA (GT)8,(GCC)5,(AG) 8CG,GAG (CAA)5, en donde el primer y segundo cebador fueron los que generaron más bandas polimórficas con un total de 21. También utilizaron una técnica llamada UP-PCR utilizada para observar diversidad de especies; sin embargo, estos cebadores revelaron poca información sobre la diversidad genética entre los aislamientos. Por el contrario, los cebadores ISSRs permitieron la discriminación de la variación genética molecular entre los 33 aislamientos de *Trichoderma* (Consolo *et al.* 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y reproducción de los aislamientos

Se analizaron 15 aislamientos monospóricos de *Trichoderma* de la colección de hongos del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) provenientes de La Zona Norte de Costa Rica, aislados a partir de suelo en fincas piñeras y parches de bosque aledaños a las plantaciones en Pital de San Carlos, Río Cuarto de Grecia, Sarapiquí y Muelle de San Carlos (Cuadro 2, Anexos). Estos aislamientos mostraron ser promisorios en condiciones *in vitro* como antagonistas para el combate biológico de *F.*

oxysporum y *P. carotovorum*, por medio de pruebas de competencia por sustrato y antibiosis realizadas por el Laboratorio de Fitopatología de la UNA.

Los aislamientos de *Trichoderma* se reactivaron en placas petri con PDA (papa-dextrosa-agar) acidificado con ácido láctico al 25% y se incubaron a temperatura ambiente hasta el desarrollo de las colonias fungosas y su esporulación. Una vez esporuladas, se replicaron tomando el micelio de cada cepa para ser colocado en nuevas placas petri esperando nuevamente su esporulación libre de otros microorganismos. Se realizaron tres repeticiones para cada aislamiento (French y Hebert 1980).

Velocidad del crecimiento micelial y porcentaje germinación (viabilidad)

Se midió el crecimiento diametral durante 72hr. Para esto, se siguió un protocolo modificado basado en Días y Lecuona (1995). Se sembró un cuadro de 1cm de PDA con el aislamiento purificado en el extremo del plato petri con medio PDA y se incubó a 25°C. Se tomaron tres mediciones por aislamiento con regla milimetrada, a las 24, 48 y 72hr. Se realizaron tres repeticiones por cada aislamiento.

Se determinó el porcentaje de germinación (viabilidad) de esporas aplicando un protocolo modificado basado en Tabsoba y Wilson (1997) y Morica *et al.* (2001). Se colocaron cinco alícuotas de 5µl de una suspensión de conidios con una concentración de 1×10^6 conidios \cdot mL⁻¹ en medio agar agua para cada aislamiento. Se incubaron a temperatura ambiente y a las 16 horas se agregó azul de lactofenol para detener la germinación. Posteriormente, se cortó la porción de agar conteniendo las alícuotas de la suspensión de conidios y se colocó sobre un portaobjetos cubierto con un cubre objetos. Luego se registró el número de

conidios germinados. Se consideró conidio germinado como aquellos cuyo tubo germinativo fue dos veces mayor al diámetro de los conidios. Se realizaron cinco repeticiones por cada aislamiento. A las 16 horas se calculó el porcentaje de germinación contando tanto el número total de conidios como los conidios germinados en el campo visual del microscopio a 40X, con estos datos se obtuvo el respectivo promedio.

Identificación de especies y análisis molecular

El ADN de los aislamientos se extrajo a partir de micelio esporulado siguiendo el protocolo de Hoyos-Carvajal (2008). El ADN se visualizó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% para observar su calidad y cantidad. Cada muestra se tiñó con buffer de carga con Gel Red™ (Biotium) al 0.3%. La cantidad del ADN se midió utilizando ADN lambda como estándar. La intensidad del fragmento se midió por medio del programa ImageJ, el cual cuantificó los pixeles digitales contra el estándar.

Se amplificaron dos regiones del (*TEF1*) para la identificación de los 15 aislamientos de *Trichoderma*. Para esto, se utilizaron dos pares de cebadores reportados por Chaverri *et al* .(2015): EF-728M (5'- CAT YGA GAA GTT CGA GAA GG) y Ef2 (5'- GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT); y EF700F (5'- TCT ACC AGT GCG GTG GTA) y TEF1R (5'- GCC ATC CTT CGA ACC AGC). Las PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones de termociclado reportadas por Chaverri y Samuels (2003): desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 36 ciclos de 94°C con duración de 1 min, luego a 56°C por 1 min y 72°C por 1 min; finalizado por una extensión a 72°C por 5 min. La calidad de los productos de PCR fueron verificados en un gel de agarosa al 1% y se repitió todo el proceso de la PCR hasta

obtener un producto en abundancia del tamaño esperado de 600pb (Chaverri *et al.* 2015). Se generaron 30 productos de PCR que fueron enviados a la empresa MacroGen® Corea para su purificación y secuenciación por método Sanger en ambas direcciones de cada cadena. Aquellas reacciones que no rindieron secuencia de alta calidad legible, se sometieron a PCR de nuevo y fueron enviadas a MacroGen® Corea para una segunda secuenciación.

Relaciones genéticas de los aislados de *Trichoderma*

Se realizó una prueba preliminar con 20 cebadores ISSR reportados por Consolo *et al.* (2012) y Verma *et al.* (2009) utilizando ADN de una submuestra de los aislamientos de *Trichoderma*. Se eligieron cinco aislamientos con diferente actividad antagonista contra *F. oxysporum* y *P. carotovorum* (datos provenientes del Laboratorio de Fitopatología). Se corrieron aproximadamente 50 reacciones con los 20 cebadores hasta obtener seis imprimadores que generarán productos polimórficos. Se eligieron los seis cebadores más informativos basándose en la claridad y cantidad de fragmentos generados después de las PCR y su revelación en geles. Las PCR se realizaron con las siguientes condiciones en un volumen final de 25µL: un paso de desnaturalización a 94°C durante 7 min; seguido por 33 ciclos a 94°C durante 60s, 48°C durante 75s y 72°C durante 4 min; y una etapa de extensión final de 72°C durante 7 min. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1% teñidos con Gel Red® con un tiempo de corrida de 3 a 4 h a 100 V y fueron digitalizados en un fotodocumentador BioDoc-It (UVP).

Análisis de datos

Crecimiento diametral y porcentaje de germinación (viabilidad)

Se realizó una regresión lineal para cada cepa, donde la pendiente de la función se consideró la velocidad del crecimiento ($mm \cdot hr^{-1}$). Los datos no cumplieron con las suposiciones de normalidad y varianzas homogéneas del análisis de varianza (ANOVA), por lo tanto, se aplicó el test Kruskal-Wallis para datos no paramétricos con comparaciones múltiples y el ajuste del valor p con el método de Holm. Diferencias significativas se declararon cuando $p < 0.05$. Los datos de porcentaje de germinación se transformaron por medio de la función arco seno. Se aplicó un ANOVA de un factor con un análisis *post hoc* de Tukey, donde diferencias significativas se declararon cuando $p < 0.05$. Los análisis se realizaron por medio del paquete de scripts *agricolae* en el programa R (de Mendiburu, 2016; R Core Team, 2016).

Análisis genético

Se armaron secuencias consenso a partir de las secuencias bidireccionales de las dos regiones del (*TEF1*) con en el programa BioEdit (Hall 1999). Para determinar la especie de cada aislamiento, ambas secuencias del (*TEF1*) se compararon con las accesiones depositadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el programa de búsqueda en línea BLAST. Se realizaron alineamientos múltiples de todas las secuencias de cada aislamiento utilizando el programa en línea Mafft (versión 7) para realizar un análisis de similitud genética. Se utilizó el programa Gblocks para eliminar las posiciones mal alineadas y regiones divergentes de las secuencias de ADN y

cada fragmento del (*TEFI*) se analizó independientemente para obtener un dendrograma más cercano al verdadero (Fregin *et al.* 2012). El dendrograma se construyó basado en el (*TEFI*) utilizando el programa de acceso libre raxmlGUI1.3, antes se realizó un Jmodel test para escoger el mejor modelo de sustitución de nucleótidos a la hora de realizar la filogenia, por lo tanto, se utilizó el modelo GTRgama1. El dendrograma se generó en el programa de libre acceso Figtree. El porcentaje de confianza se calculó por medio del método Bootstrap con 2000 interacciones. El análisis incluyó secuencias de *Trichoderma* de clima tropical y templado depositadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) así como dos secuencias de *Fusarium oxysporum* como controles externos.

Para las relaciones genéticas con los ISSRs se generó una matriz binaria utilizando el programa Cross Checker (Buntjer y Otsen 1999). Se armó una matriz de distancias genéticas y se determinó la diversidad alélica por cepa, así como un análisis de variación molecular (AMOVA) con el programa de libre acceso GenAlex (Peakall y Smouse 2006). Se generó y se calcularon las distancias del dendrograma por medio del método Neighbor Joining para representar diferencias de cepas similares utilizando el programa Splits Tree. El dendrograma se generó con el programa de libre acceso Fig Tree. Los porcentajes de confiabilidad se calcularon por medio de un Bootstrap con 2000 interacciones.

Se probó la correlación entre la distancia genética y las mediciones fisiológicas de crecimiento diametral (velocidad de crecimiento en $mm \cdot hr^{-1}$) y porcentaje de germinación, así como la actividad antagonista (dato proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología) por medio de un test de Mantel en el programa GenALEX (Peakall y Smouse

2006). Se realizó un análisis de correlaciones entre las distancias genéticas y los datos fenotípicos utilizando paquete *vegan* para el programa estadístico R(Oksanen *et al.* 2017; R Core Team, 2016).

RESULTADOS

Velocidad del crecimiento micelial y porcentaje germinación

Dentro de los aislamientos analizados mediante la velocidad de crecimiento, 11fa, 8a, 6a y 11c fueron similares entre ellos, pero tienen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a 9a, 1a, H1, 13c y 1c (Cuadro 1). Por lo anterior los aislamientos 11fa, 8a, 6a y 11c fueron los que alcanzaron una mayor velocidad de crecimiento al completarlas 72hr con un promedio $>1 \text{ mm} \cdot \text{hr}^{-1}$.

Todos los aislamientos de *Trichoderma* cubrieron casi la totalidad del plato petri en 72hr. Las velocidades de crecimiento del micelio en los platos petri a las 72hr variaron notablemente (entre 0.74 y $1.20 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$), sin embargo, al final los aislamientos 11fa, 8a, 6a y 11c mostraron el mayor crecimiento de micelio (Figura 1), revelando diferencias en cuanto a los demás como se indica en el cuadro 1.

El porcentaje de germinación o viabilidad de cada aislamiento (Cuadro 2) varió mucho, hasta en un 90%, a pesar de estar en las mismas condiciones. Los aislamientos 11fb, 13a, 13c, 6a y v2 tuvieron una germinación de más del 80%. Se utilizó el medio AA para la germinación debido a que este permite que la luz del microscopio lo atraviese con facilidad para observar con claridad las estructuras de los hongos. En la figura 2 se muestran los conidios que se contabilizaron de acuerdo al tamaño de su tubo germinativo. Los conidios

que no presentaron un tubo germinativo del doble de tamaño del conidio no fueron contabilizados como germinados.

Cuadro 1. Tests Kruskal-Wallis realizado a los aislamientos de *Trichoderma* en donde se muestra la velocidad de crecimiento en ($mm \cdot hr^{-1}$). Ajuste del valor p con el método de Holm.

Código utilizado para cada aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Promedio velocidad de crecimiento micelial ($mm \cdot h^{-1}$)	Grupos de <i>Trichoderma</i> con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)
11fa	1.20	a
8a	1.17	ab
6a	1.02	abc
11c	1.02	abc
9a	0.99	bc
Ia	0.93	cd
H1	0.97	cd
13c	0.90	de
1c	0.90	de
11fb	0.87	def
13b	0.90	efg
13a	0.80	fg
11d	0.79	fg
V2	0.75	g
11e	0.74	g

Cuadro 2. Análisis *post hoc* de Tukeys realizado a los porcentajes de germinación de cada una de los aislamientos de *Trichoderma* tomado a las 16 horas de desarrollo en 20mL de medio agar agua, a una concentración de 1×10^6 conidios $\cdot h^{-1}$ a temperatura ambiente (25°C). Ajuste del valor p con el método de Holm.

Código utilizado para cada aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Promedio de germinación (%) de aislamientos de <i>Trichoderma</i>.	Grupos de aislamientos de <i>Trichoderma</i> con diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05)
11fb	94.01	a
13a	91.07	ab
13c	83.73	b
6a	88.34	b
v2	80.32	bc
1c	78.23	cd
13b	56.78	d
11fa	61.19	d
8a	34.68	de
H1	16.77	e
9a	15.61	f
11e	15.41	f
Ia	14.29	f
11c	3.68	f
11d	3.68	g



Figura 1. Conidios de *Trichoderma* en una porción de agar aguavistos al microscopio (40X) a las 16 hr de su desarrollo.

Antagonismo de los aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum* y *P. carotovorum* *in vitro*

F. oxysporum

Los experimentos *in vitro* mostraron que *Trichoderma* spp. tuvo un efecto antagónico sobre *F. oxysporum*. En comparación con un testigo, los aislamientos que ejercieron una mayor actividad antagónica fueron la 8a, 13b y 13c. Todos mostraron ser promisorios impidiendo el desarrollo del patógeno, sin embargo *F. oxysporum* en presencia de el aislamiento 8a presentó 17.30mm de crecimiento al término de 5 días en comparación con el testigo que creció 57.84mm (Este testigo contenía solo a *F. oxysporum*). Estas diferencias mostraron ser estadísticamente significativas ($p < 0,05$). (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tests Kruskal-Wallis realizado a los promedios de crecimiento en mm de *F. oxysporum* en presencia de aislamientos de *Trichoderma* a los cinco días de su desarrollo en medio PDA. Ajuste del valor p con el método de Holm.

Código utilizado para cada aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Crecimiento promedio en mm de <i>F. oxysporum</i> en presencia de <i>Trichoderma</i>	Grupos de aislamientos de <i>Trichoderma</i> con diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05)
Testigo*	57.84	-
8a	17.30	a
13b	22.01	b
13c	23.80	b
11fb	27.24	c
H1	30.00	d
13a	30.26	d
9a	30.34	d
1a	30.98	f
11e	31.08	f
11c	32.02	g
1c	32.49	g
11fa	32.81	hg
6a	33.14	h

*Placa Petri con desarrollo sólo de *F. oxysporum*.

P. carotovorum

Los experimentos *in vitro* mostraron que *Trichoderma* spp. también tuvo un efecto antagónico sobre *P. carotovorum*. En comparación con un testigo, los aislamientos que ejercieron una mayor actividad antagónica fueron la 8a, 13b y 13c (Cuadro 4). Todas mostraron ser promisorias impidiendo el desarrollo por completo del patógeno, sin embargo, *P. carotovorum* en presencia del aislamiento 8a presentó diferencias estadísticamente significativas más marcadas ($p < 0.05$) que los demás con un crecimiento de 55.38mm del patógeno en comparación con un testigo de 88.63mm a los 5 días.

Estos análisis de *Trichoderma* sobre *F. oxysporum* y *P. carotovorum* mostraron que el aislamiento 8a desempeñó un mayor efecto antagónico contra los dos patógenos a pesar de ser organismos de reinos diferentes

Cuadro 4. Tests Kruskal-Wallis realizado a los promedios de crecimiento en mm de *P. carotovorum* en presencia de aislamientos de *Trichoderma* con cinco días de desarrollo en medio PDA.

Código utilizado para cada aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Crecimiento promedio en mm de <i>P. carotovorum</i> en presencia de <i>Trichoderma</i>	Grupos de aislamientos de <i>Trichoderma</i> con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)
Testigo*	87.63	-
8a	55.38	a
9a	56.10	b
6a	57.02	c
13c	59.93	d
1a	52.92	e
11e	64.70	f
11fa	65.59	g
H1	65.96	gh
11c	66.02	h
1c	66.70	i
13a	68.72	j
11fb	71.27	k
13b	75.22	l

*Placa Petri con desarrollo sólo de *P. carotovorum*

Análisis genéticos.

En la figura 2 se muestran los productos de PCR obtenidos a partir del ADN genómico de los aislamientos de *Trichoderma*, usando cebadores del gen (*TEF1*). Éstos presentaron pesos entre 500pb y 600pb, similares a aquellos obtenidos por Chaverri y Samuels (2003).

(Figura 2)

El cuadro 5 muestra que del total de aislamientos secuenciados se obtuvieron cuatro especies de *Trichoderma* las cuales fueron: *T. spirale*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis* y *T. reesei*. Todas las especies obtuvieron más de un 95% de identidad en comparación con secuencias depositadas en la base de datos de NCBI y sus respectivos artículos científicos asociados.

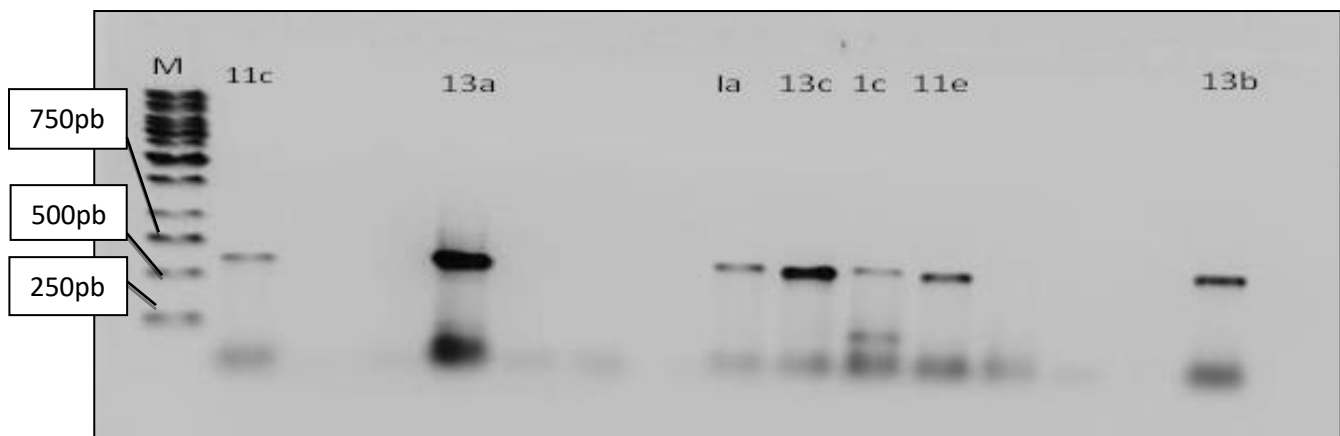


Figura 2. Productos de PCR del gen (*TEF1*) de los aislamientos de *Trichoderma* vistos en un gel de agarosa al 1%. Donde M= marcador de peso molecular 1kb. Los números de muestra 11c, 13a, 1a, 13c, 1c, 11e y 13b corresponden a una parte de los aislamientos de *Trichoderma* analizados por medio del factor de elongación de la traducción 1- α .

Cuadro 5. Resultados de la secuenciación de los fragmentos EF-728M- y EF700F- (500-600pb) del gen (*TEF1*) de los aislamientos de *Trichoderma*. Porcentajes de identidad fueron calculados por medio de la herramienta en línea BLAST Nucleotide del NCBI.

Código de los aislamientos	Similitud de la secuencia original con las depositadas en NCBI	Especie reportada por GenBank	Porcentaje de identidad
13a	531pb/525pb	<i>T. spirale</i>	99%
11e	541pb/526pb	<i>T. spirale</i>	97%
13c	531pb/523pb	<i>T. spirale</i>	98%
11fb	581pb/553pb	<i>T. asperellum</i>	95%
13b	579pb/576pb	<i>T. asperellum</i>	99%
H1	584pb/577pb	<i>T. asperellum</i>	99%
9a	570pb/560pb	<i>T. koningiopsis</i>	98%
1c	552pb/544pb	<i>T. koningiopsis</i>	99%
6a	486pb/467pb	<i>T. koningiopsis</i>	96%
1a	570pb/558pb	<i>T. koningiopsis</i>	98%
11fa	574pb/556pb	<i>T. koningiopsis</i>	97%
11c	555pb/548pb	<i>T. koningiopsis</i>	99%
8a	530pb/526pb	<i>T. reesei</i>	99%

En la figura 3 se presenta un dendrograma filogenético con las especies obtenidas mediante secuenciación del (*TEF1*). Se corroboró el posicionamiento taxonómico de las cepas analizadas las cuales se agruparon con cepas de la misma especie. En el clado 1 se encontró el aislamiento 8a (*T. reesei*), la cual se agrupó con accesiones de la misma especie de diferentes lugares del mundo, incluida *Hipocrea jecorina*, la fase asexual de *T. reesei* (Xú y Xia 2016). El clado 2 corresponde a *T. spirale*, el 3 a *T. asperellum* y *T. asperelloides* y el 4 a *T. koningiopsis*. Todos los anteriores también se agruparon con accesiones de su misma especie en donde el valor bootstrap fue entre el 70 y el 100%

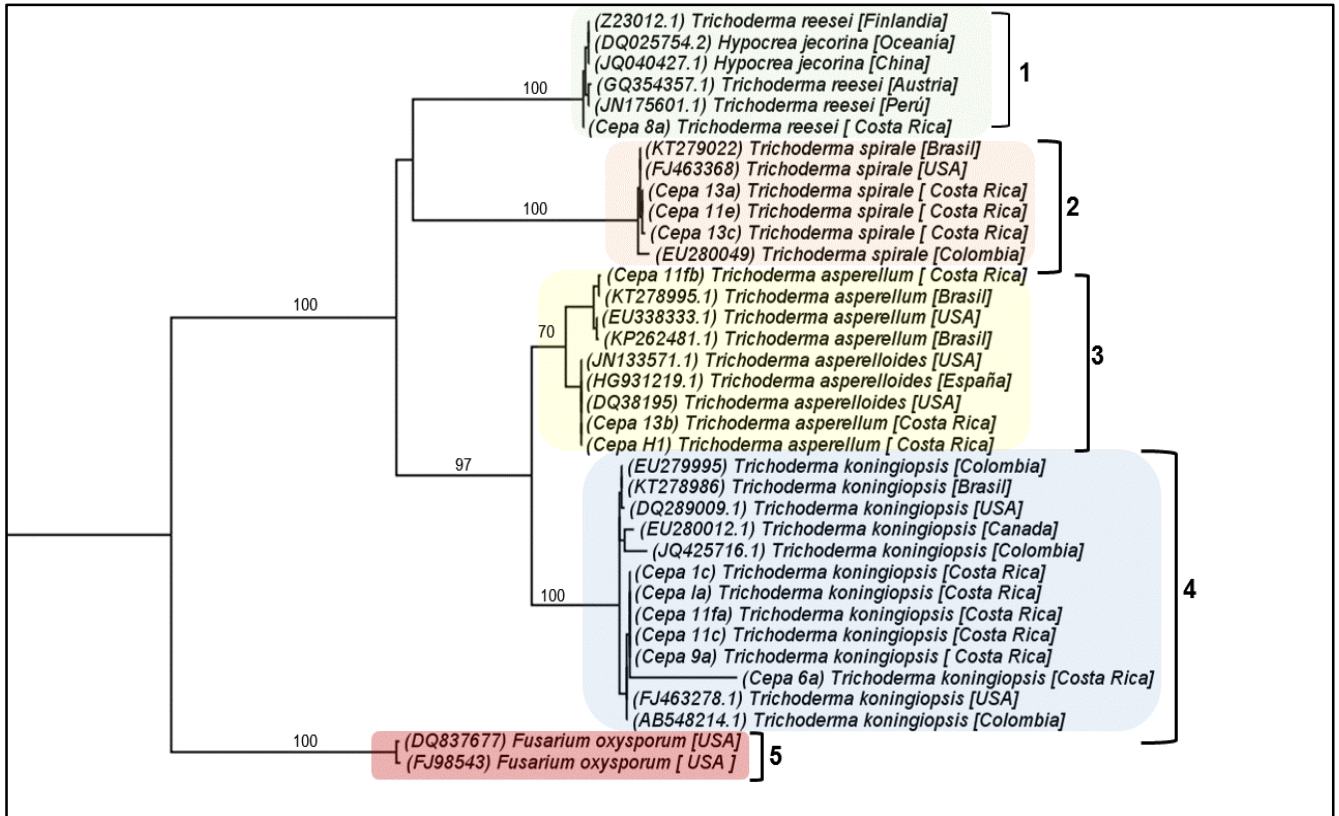


Figura 3. Dendrograma filogenético de máxima verosimilitud basado en las secuencias parciales del gen del factor de elongación de la traducción 1- α que incluye cepas de *Trichoderma* aisladas de la Zona Norte de Costa Rica (las utilizadas en este estudio) y secuencias obtenidas del Genbank® (21 accesiones) todas del género *Trichoderma*. El valor mostrado en las ramas indica el valor bootstrap mediante 2000 permutaciones. Se utilizó como grupo externo dos secuencias de *Fusarium oxysporum*.

Según el dendrograma de distancias genéticas (Fig.4) calculado por los marcadores ISSRs, el clado 1 colocó a los aislamientos 13a y 13c estrechamente relacionadas, mientras que la 11e, a pesar de que estos tres fueron identificados como *T. spirale*, reveló una separación más notable. Estos tres aislamientos fueron extraídos del cantón de Sarapiquí en zonas boscosas dentro de fincas piñeras en la provincia de Heredia. *T. spirale* también ha sido reportada en México de identificación de hongos antagonistas en zonas boscosas, según Almaraz *et al.* (2012).

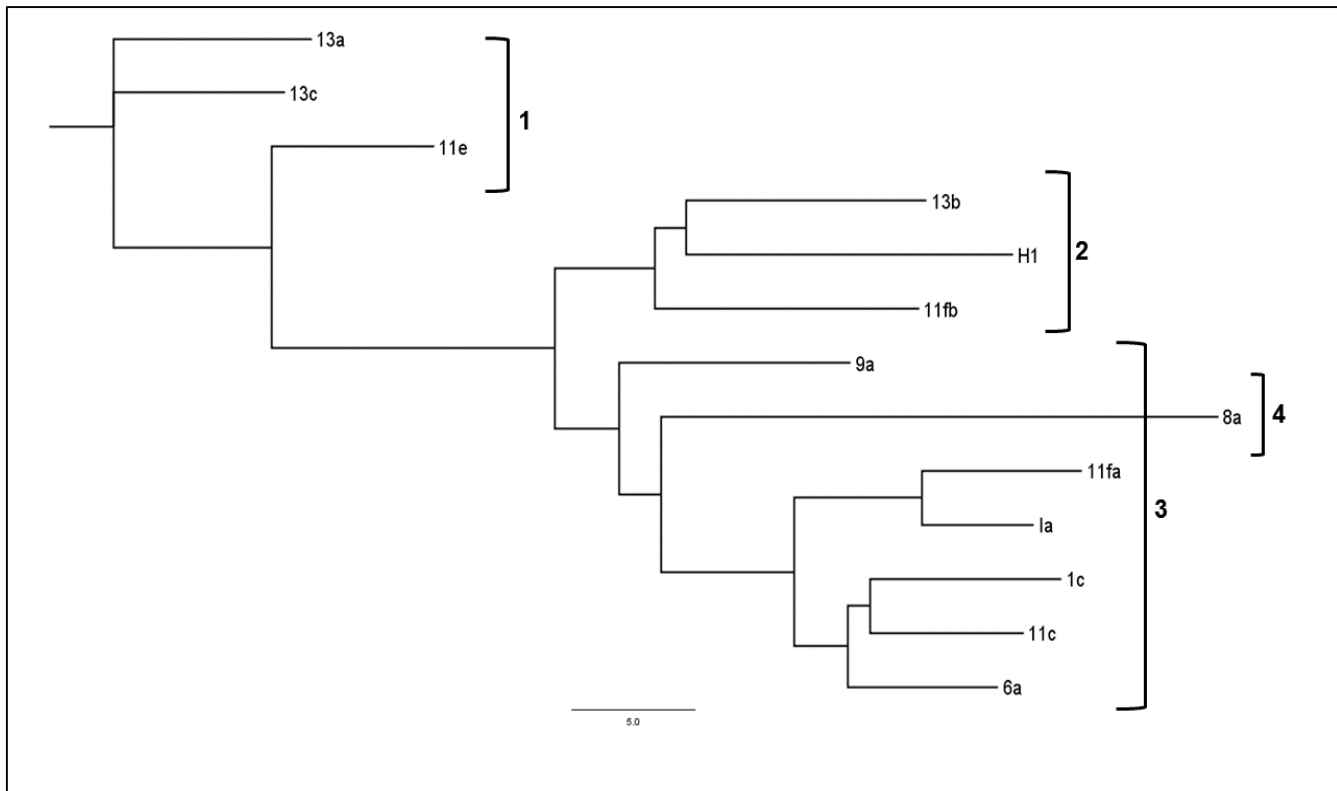


Figura 4. Dendrograma de distancias (relaciones) genéticas mediante el método NJ (Neighbor Joining) con los aislamientos de *Trichoderma* de la Zona Norte de Costa Rica anteriormente identificadas. En donde el grupo 1 corresponde a: *T. spirale*, Grupo 2: *T. asperellum*, Grupo 3: *T. koningiopsis* y Grupo 4: *T. reesei*.

En la figura 4, el clado 2 mostró a las cepas 13b y H1 como estrechamente relacionadas, mientras que la 11fb se separó de las anteriores a pesar de ser la misma especie. El clado 3 presentó una mayor similitud entre los aislamientos que los demás clados, sin embargo, el 11fa y el 1a presentaron diferencias en comparación con la 1c y la 11c. Éstas también se aislaron de la zona Norte de Costa Rica.

Por último la cepa, identificada como *T. reesei*, presentó similitudes con el clado 3, sin embargo, fue el aislamiento genéticamente más distante. Además, Samuels (2006) menciona que *T. reesei* presenta una distribución muy reducida, debido a que la mayoría de las cepas se han aislado de regiones que se encuentran dentro de la línea ecuatorial. Se

realizó un test de mantel para correlacionar las distancias genética con la coordenadas geográficas de recolección de cada aislamiento, el cual no fue significativo, por lo tanto la distancia geográfica entre especies no determina su variabilidad.

Cuando se calcularon las distancias euclidianas de los datos morfológicos (velocidad de crecimiento y porcentaje de germinación), los test de Mantel no encontraron ninguna correlación con las distancias genéticas ($p < 0.86$). Tampoco hubo correlación entre estas características morfológicas ($p < 0.109$). Sin embargo, la velocidad de crecimiento presentó una leve correlación positiva con la diversidad genética. Aun así, la correlación no fue significativa ($p < 0.26$). Esta correlación podría demostrarse con confiabilidad utilizando un mayor número de muestras para el análisis. También al calcular las distancias euclidianas de los datos de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *F. oxysporum* y *P. carotovorum*, los test de Mantel tampoco encontraron correlación con las distancias genéticas ($p < 0.34$) ni entre el desempeño de las dos actividades antagónicas de los dos patógenos.

DISCUSIÓN

Velocidad del crecimiento micelial y porcentaje germinación (viabilidad de conidios)

Al comparar el porcentaje de germinación y la velocidad de crecimiento, no hubo ningún tipo de correlación ($p < 0.86$) con las distancias genéticas. De la misma manera, un porcentaje de más del 90% de germinación no coincidió con una tasa de crecimiento alta y viceversa. Tampoco hubo correlación entre las distancias genética y el antagonismo ($p < 0.34$). Chavarría (2016) en su estudio obtuvo resultados similares ya que el porcentaje de viabilidad en aislamientos de *Trichoderma* fue de un 100% a las 72 horas, mientras que

en algunas su velocidad de crecimiento fue de $0.70 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ y en otras fue mucho menor correspondiente a $0.40\text{mm}\cdot\text{hr}^{-1}$.

El aislamiento 8a (*T. reesei*), a pesar de desempeñar la mayor capacidad antagónica, no tuvo la mayor velocidad de crecimiento de micelio ($1.17\text{mm} \cdot \text{hr}^{-1}$) y porcentaje de germinación (34.68%). Steyaert *et al.* (2013) mencionaron que la producción de conidios de *Trichoderma* se estimula por cambios ambientales muy complejos que interactúan entre sí para lograr una reproducción exitosa. En este estudio los porcentajes más altos de germinación de conidios corresponden a las cepas 13a y 13c ubicadas en el clado 1, el cual estuvo genéticamente distante al aislamiento 8a. También Valencia y Castro (2004) midieron el crecimiento micelial de *Trichoderma*, el cual fue más rápido en temperaturas entre 26°C - 30°C , sin embargo, el porcentaje de germinación (82%) fue mayor cuando se incubó a 21°C a una concentración de 1×10^3 conidios/mL observado a las 17 horas. Lo anterior sugiere que cada mecanismo de reproducción es diferente y que a cada aislamiento se le debe dar las condiciones adecuadas para su desarrollo de acuerdo con la especie, pero tomando en cuenta que estos parámetros varían a nivel del individuo. En este estudio a todos los mecanismos se les dieron las mismas condiciones de temperatura ambiente (25°C) por lo que no se le puede atribuir a la especie características de crecimiento, germinación y antagonismo debido a que no se encontró correlación. Adicionalmente, se reporta que especies como *T. asperellum* y *T. harzianum* crecen mejor a temperaturas entre 27°C y 30°C (Lieckfeldt *et al.* 1999, Hermosa *et al.* 2000, Watanabe *et al.* 2005), y un máximo de 35°C (Guigón *et al.* 2010). Cabe mencionar que al correlacionar las distancias genéticas con las coordenadas geográficas de recolección no hubo correlación, lo cual significa que la

distancia geográfica no fue un factor de determinación de la diferenciación genética, pero también indica que hubo una alta variabilidad entre esas especies.

Análisis Genéticos

En este estudio se obtuvieron cuatro especies: *T. reesei/H. jecorina*, *T. spirale*, *T. aperelumm/asperelloides* y *T. koningiopsis*. *T. reesei/H. jecorina*, según Atanasova *et al.* (2010) ha sido encontrado en suelos tropicales del sureste de Asia, Suramérica y regiones del sur del Pacífico donde su reproducción es ideal entre los 25°C-30°C. Es utilizada en la industria biotecnológica para la producción de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas y proteínas recombinantes. (Kubicek *et al.* 2009, Seidl y Seiboth 2010), lo cual ha despertado el interés en este hongo para producir biocombustibles de segunda generación y reducir las emisiones de dióxido de carbono con la dependencia de combustibles fósiles (Kumar *et al.* 2008). También Druzhinina *et al.* (2010) demostró que *Trichoderma reesei* es antagonista moderado a los patógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinérea* y que se ha encontrado también en Centroamérica y Suramérica. *T. spirale* es un hongo cosmopolita, el cual ha sido encontrado en el tronco de plantaciones de cacao en San Vito de Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica y su crecimiento se desarrolla mejor en temperaturas entre 25°C-30°C (Chaverri *et al.* 2003). Ha sido utilizado como agente de combate biológico de hongos fitopatógenos como *Moniliophora roreri* en el cultivo del cacao en bosques indígenas de Ecuador (De la Cruz *et al.* 2015 y Evan *et al.* 2003). *T. aperelumm/asperelloides* ha sido encontrada por Guigón *et al.* (2010) en suelos de la rizosfera en un cultivo de chile en Chihuahua, México en donde su temperatura óptima de crecimiento es de 27°C-30°C. Cruz *et al.* (2015) mencionaron a este hongo como

biocontrolador de enfermedades al disminuir el índice de ataque de *Rhizoctonia solani* en arroz en un 48% y un 100% para *Pyricularia grisea*. También se describió a *T. asperelloides* como una especie críptica que es morfológicamente indistinguible de *T. asperellum* (Cummings *et al.* 2016). *T. koningiopsis*, según Jaimes *et al.* (2009), ha demostrado ser eficaz en el control de *Fusarium oxysporum*, agente causal de la pudrición del cuello y la raíz del tomate y también un inductor de defensa. García *et al.* (2017) obtuvieron resultados similares en donde identificaron a *Trichoderma asperellum* proveniente de suelos hortícolas en Toluca, México, el cual funcionó de manera adecuada como controlador biológico de *Phytophthora infestans*. Según Velasco (2013), *T. koningiopsis* se ha encontrado en Brasil, Canadá, Etiopía, Ecuador, Alemania, Ghana, Perú y en el noroeste de México donde fue aislada de suelos cultivados con frijol. También se ha aislado de vainas de cacao, suelo, ramas y hojas en descomposición así como de plantas de frijol y tomate (Aixa *et al.* 2015 y Velasco 2013). Su crecimiento a los 21°C fue de más de un 50% en comparación a cepas de *T. harzianum* (Aixa *et al.* 2015).

Las especies de *Trichoderma* tienen una amplia plasticidad ecológica lo que implica encontrar variabilidad genética en ellas, en donde factores bióticos y abióticos como temperatura, pH, humedad relativa, iluminación y sustratos juegan un papel muy importante en el comportamiento del hongo (Martínez *et al.* 2015). Esto nos indica la importancia de conocer el comportamiento y hábitat de cada uno para tomar decisiones en cuanto a la escogencia de cepas con actividad antagónica. En la figura 5 se demostró la alta variabilidad presente en cepas de *Trichoderma* de la misma especie analizada en este estudio, aisladas de un clima tropical que prevalece en Costa Rica. A pesar de que los

hongos fueron aislados a partir de ambientes similares y a distancias cortas entre ellas (a una circunferencia menor a 50 km), se observó una variabilidad entre especies importante. El aislamiento 8a (*T. reesei*) presentó un mejor desempeño en cuanto a efecto antagónico en condiciones *in vitro* contra los dos patógenos de la piña, donde *F. oxysporum* tuvo un crecimiento de 30% en presencia de *Trichoderma* y *P. carotovorum* un 63%. Resultados similares obtuvieron Sánchez y Rebolledo (2010), en donde *T. reesei* inhibió más del 80% del crecimiento de *Thielaviopsis paradoxa* en un cultivo de agave en México. En el presente estudio, además de ser el mejor antagonista, este aislamiento (8a) fue genéticamente distante a los demás en cuanto a variabilidad entre especies y aislamientos (figura 4).

La correcta identificación molecular de aislamientos monospóricos es de suma importancia para así tener certidumbre de la composición de un producto. Además de su identificación Martínez *et al.* (2015) mencionaron la importancia de explorar, caracterizar y explotar estas variaciones genéticas entre especies para así lograr realizar una selección adecuada de los aislamientos promisorios para el combate de enfermedades. En este estudio se logró evidenciar esas variaciones genéticas entre aislamientos que no dependen de su distancia geográfica. También se encontró que las características deseables de un producto para el combate biológico no dependieron de su especie o de sus relaciones genéticas.

Al caracterizar cuatro productos comerciales de *Trichoderma* reportados como *T. harzianum*, Chaverri *et al.* (2015) encontraron catorce especies que no coincidieron con la especie mencionada. Además, Xu *et al.* (2011) encontraron que la mezcla de varios agentes biológicos no favoreció el combate biológico, lo que destaca la importancia de estudiar más

a fondo las características de un aislamiento con potencial para el combate biológico de enfermedades en los cultivos.

Howell (2003) mencionó que los mecanismos de biocontrol de *Trichoderma* pueden funcionar de manera distinta en condiciones de laboratorio y en el campo debido a que factores como el tipo de suelo, temperatura, pH, humedad del ambiente, la planta, el suelo y otros aspectos de la microflora influyen en su comportamiento. También la interacción con la rizosfera y los microorganismos presentes en el ecosistema juegan un papel importante en el crecimiento y antagonismo de estos hongos ya que los exudados de las plantas proporcionan alimento para la actividad de microorganismos del suelo, germinación y proliferación de patógenos que a la vez sirven de alimento para hongos antagonistas (Mukerji *et al.* 2006).

Orozco (2017) obtuvo aislamientos con un buen comportamiento antagónico en condiciones de laboratorio y otros con una aptitud antagónica menor. Al probar estos aislamientos en invernadero, las que tenían una menor aptitud antagónica en laboratorio revelaron un mejor desempeño, por lo tanto, la escogencia de un organismo para el combate biológico de patógenos en cultivos se debe hacer hasta observar su comportamiento en campo, ya que además de los factores antes mencionados la radiación ultravioleta en campo reduce la viabilidad fúngica (Shang *et al.* 2011).

En este estudio no todas las características deseables para un producto biológico se encontraron en un mismo aislamiento. Se encontraron rangos de germinación entre 10 y 90%, velocidades de crecimiento entre 0.74 y 1.20 mm·hr⁻¹ y porcentajes de antagonismo sobre los patógenos de 30 a 63%. Existen alternativas para obtener todas estas

características deseables en un solo aislamiento, por ejemplo brindar las condiciones de reproducción más favorables mencionadas por Howell (2003) y Mukerji *et al.* (2006) para cada especie, tomando en cuenta la alta variabilidad observada entre ellas, y un posible cambio en su comportamiento ya que existe estrecha relación entre aislamiento, antagonismo y temperatura (Martinez *et al.* 2013). También esto se puede lograr mediante la ingeniería genética. Por ejemplo, Shang *et al.* (2011) introdujeron un gen exógeno de tirosina en un aislado de *Beauveria bassiana*, el cual dotó una tolerancia fúngica a los rayos ultravioleta y una mayor capacidad de virulencia contra el gusano de seda *Bombix mori* y el gusano de la harina *Tenebrio molitor*.

Existen varios genes involucrados en estos procesos, por ejemplo el gen *tac1* se relaciona con el crecimiento, germinación, micoparasitismo y metabolismo secundario de *Trichoderma* en *T. virens* (Mukherji *et al.* 2006). El gen *prb1*, relacionado con la proteinasa Prb 1, está directamente asociada al micoparasitismo en la penetración de *Trichoderma* sobre las paredes celulares del hospedante, la cual se expresa en medios con limitaciones de nitrógeno para el antagonista (Olmedo *et al.* 2002). Estos genes deben estudiarse más a profundidad en caso de recurrir a la ingeniería genética como medio para obtener un aislamiento con capacidades deseables en cada una de sus etapas de reproducción.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- A la hora de hacer pruebas iniciales como velocidad de crecimiento, producción de conidios, porcentaje de germinación y antagonismo para pronosticar el efecto antagónico de aislamientos de *Trichoderma* se deben tomar en cuenta además de su

alta variabilidad, las condiciones de temperatura, luz, pH para cada especie y cada etapa.

- Una vez detectados los aislamientos con mayor efecto antagónico se deben identificar molecularmente por especie para que a la hora de reproducirlas pensando en un producto comercial, brindarles las condiciones adecuadas para cada etapa ya que por ejemplo la luz y su espectro influyen en el desarrollo de *Trichoderma*, fundamentalmente sobre la esporulación (Martínez *et al.* 2013).
- La identificación molecular por especie contribuye a la elaboración de un producto de combate biológico puro, sin combinaciones con otras especies que puedan limitar la actividad antagónica contra determinado patógeno por competencia entre ellas por espacio o por alimento.
- Conocer la variabilidad genética de los aislamientos y el hábitat en las que fueron recolectadas es de suma importancia ya que éstas se comportarán mejor en su actividad antagónica en zonas con condiciones de temperatura, humedad y sustrato similares en las que se desarrollaban antes de su aislamiento.
- Realizar pruebas *in vitro* para saber cual es el mecanismo que utiliza en este caso la cepa 8a (*T. reesei*) contra la bacteria y contra el hongo fitopatógeno, ya sea competición, antibiosis o micoparasitismo (Infante y Martínez 2009), ya que ambos patógenos son de reinos distintos.
- Al identificar las especies y haber probado su efecto antagónico bajo condiciones controladas de laboratorio según su comportamiento y hábitat de recolección se deben probar en campo para observar su interacción con microorganismos de la

raíz, suelo y planta y así tomar la decisión final de cuáles son los aislamientos dentro de las mismas especies adecuados para un combate biológico de distintos patógenos. Estos hallazgos beneficiarán a particulares, universidades o empresas privadas que deseen elaborar biopesticidas para el combate biológico de enfermedades en cultivos.

LITERATURA CITADA

- Aceves, C; Otero, M; Martínez, R; Rodríguez, N; Ariza, R; Barrios, A. 2008. Producción masiva de *Trichoderma harzianum* en diferentes sustratos orgánicos. Revista Chapingo Serie Horticultura. 14(2): 185-191.
- Aceves, C; Otero, M; Rebolledo, O; Lezana, R; Ochoa, M. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* sp. en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. Revista Chapingo Serie Horticultura. 11(2): 273-278.
- Acevedo, F. 2013. Taxonomía molecular de aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras clínicas. Tesis Mag. Sc. Bogota, CO, Universidad Nacional de Colombia. 104p.
- Almaraz, A; Alvarado, D; Tlapal, B; Espinoza, D. 2012. Identificación de hongos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi* en bosques de encino de El Arrayanal, Colina y Tecoaapa, Guerrero. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 3 (18): 1-6.
- Arbeláez, G. 2001. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Agronomía Colombiana. 17 (1): 11-22.
- Arboleda, E; Aguirre, D. 2008. Impacto ambiental del cultivo de la piña y características de éste (caso Siquirres). Revista Ambientico: Piña en Costa Rica, impactos sociales y ambientales. Ambientico. 1(177): 3-8.
- Astorga, Q; Meneses, M; Zúñiga, V; Brenes, M; Rivera, M. 2013. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. Y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Tecnología en Marcha. 27(2): 1-10.

- Atasanova, L; Jaklitsch, W; Komon, M; Kubicek, C; Druzhinina, I. 2010. Clonal species *Trichoderma parareesei* sp. Nov. likely resembles the ancestor of the cellulose producer *Hypocrea jecorina/T. reesei*. Applied and Environmental Microbiology. 76(21): 7259-7267.
- Axia, S; Barrera, V; Reybet, G; Sosa, M. 2015. Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. Revista Facultad de Agronomía, La Plata. 144(1): 61-70.
- Azofeifa, D. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana. 17(2):221-242.
- Buntjer, J; Otsen, M. 1999. Cross Checker provides computer-assisted marker interpretation. Journal of Agricultural Genomics. 4(1):1-6.
- Carrera, M. 2016. Aislamiento e identificación del oomicete *Phytophthora cinnamomi* causante de la pudrición de la raíz de aguacate y evaluación de actividad antagónica *in vitro* por medio de *Trichoderma* spp. Tesis Lic. Sangolqui. Ec, Universidad de las Fuerzas Armadas de Ecuador. 48p.
- Castillo, R. 2005. Biotecnología ambiental. Madrid, ES. Editorial Tébar, 616p.
- Chavarría, R. 2016. Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* spp. para el manejo de hongos causantes de mal del talluelo en tomate. Tesis M.S.c. Universidad Nacional Agraria, Nicaragua. 55p.
- Chaverri, P; Branco, F; Jaklitsch, W; Degenkolb, T; Samuels, J. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. Mycology. 107(3): 558-590.
- Chaverri, P; Castlebury, L; Overton, B; Samuels, G. 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. Mycology. 95(6): 1100-1140.

- Chaverri, P; Samuel, G. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Mycology*. 48(1):1-116.
- Chaverri, P; Samuels, J. 2013. Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. *Evolution*. 67(10): 2823-2837.
- Chaves, M; Montaña, L; Martínez, M; Mercado, M; Rodríguez, M; Quevedo, B. 2008. Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. *Universitas Scientiarum*.13 (3): 1-6.
- Consolo, V; Mónaco, C; Cordo, C; Salerno, G. 2012. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(4):1389-1398.
- Cruz, A; Rivero, D; Echeverría, A; Infante, D; Martínez, B. 2015. *Trichoderma asperellum* en el manejo de hongos fitopatógenos en los cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* L.). *Protección Vegetal*. 30(1): 1.
- Cummings, N; Ambrose, A; Braithwaite, M; Bissett, J; Roslan, H; Abdullah, J; Stewart, A; Agbayani, F; Steyaert, J; Hill, R. 2016. Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian Borneo. *Mycol Progress*. 15(1-14).
- De la Cruz, M; Ortiz, C; Bautista, C; Ramires, J; Avalos, N; Cappello, S; De la Cruz, A. 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agro ecosistema del cacao de estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86(4): 947-961.
- De Mendiburu, F. (2016). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-4. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.

- Días, B; Lecuona, R. 1995. Evaluación de cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como base para la selección de bioinsecticidas contra el barrenador *Diatraea saccharalis*. *Agriscientia*. 12(1): 33-38.
- Druzhinina, I; Komon, M; Atanasova, L; seidl, V; Kubicek, C. 2010. Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric agamospecies related to it. *PLoS One*. 5(2): 1-15.
- Druzhinina, I; Kopchinskiy, A; Komón, M; Bissett, J; Szakacs, G; Kubicek, C. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal genetic and Biology*. 42(1): 55-64.
- Druzhinina, I; Kopcchinskiy, A; Kubicek, C. 2006. The first *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*. 47(1): 55-64.
- Evans, H; Holmes, K; Thomas, S. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*. 2(2): 149-160.
- Fasio, C; Montoya, T; García, R; Cruz, J; Marquéz, I; Sañudo, A. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(2): 124-127.
- Fregin, S; Haase, M; Olsson, U; Alström, P. 2012. Pitfalls in comparisons of genetic distances: A case study of the avian family Acrocephalidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 62(1): 319-328.
- French, E; Hebert, T. 1980. Métodos de investigación fitopatología. San José, CR. Editorial Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 289p.

- Garcés, E; Orozco, M; Bautista, G; Valencia, H. 2001. *Fusarium oxysporum*, el hongo que nos falta conocer. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. *Biología Colombiana*. 6(1): 8-25.
- García, A; Rodríguez, M. 2012. Guía de identificación y manejo integrado de plagas y enfermedades de la Piña. Limón, CR. Editorial BANACOL, 57p.
- García, N; Martínez, C; Hermosa, P; Aguilar, O; Gonzáles, E. 2017. Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phitophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 35(1): 58-79.
- Gerónimo, T; Torres, M; Pérez, M; De la Cruz, P; Ortiz, G; Cappello, G. 2016. Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*. 42(1): 28-35.
- Gonzáles, A; Aguirre, X. 2007. Capítulo 19. Intermicrosatélites (ISSRs). En *Ecología molecular* (2007, Distrito Federal, Mx) Distrito Federal, México. Instituto Nacional de Ecología (UNAM) 573p.
- Guigón, C; Guerrero, V; Vargas, F; Carvajal, E; Dolores, G; Bravo, L; Ruocco, M; Lanuice, S; Woo, S; Lorito, M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. Su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28(2): 87-96.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *NucleicAcidsSymposium Series*.41 (1): 95-98.
- Hermosa, M; Grondona, I; Iturriaga, E; Díaz, J; Castro, C; Monte, E; García, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology*. 66(5): 1890-1898.

- Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*.87 (1): 1-10.
- Hoyos, L; Duque, G; Orduz, S. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 2(1): 76-86.
- Hoyos-Carvajal, L; Chaparro, P; Abramsky, M; Chet, I; Orduz, S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. Contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agronomía Colombiana*. 26(3):451-458.
- Infante, D; Martínez, B; Gonzáles, N; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal*. 24(1): 14-21.
- Jaimés, Y; Moreno, C; Cotes, A. 2008. Inducción de Resistencia Sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* Th003. *Acta Biológica Colombiana*. 14(3): 111-120.
- Kaneshiro, W; Burger, M; Vine, B; Silva, A; Álvarez, A. 2008. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* from a bacterial heart rots of pineapple outbreak in Hawaii. *Plant Disease*.92 (10): 1444-1450.
- Kubicek, C; Mikus, M; Schuster, A; Schmoll, M; Seiboth, B. 2009. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels*. 2(19): 1-14.
- Kumar, R; Singh, S; Singh, O. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnology*. 35(5): 377-391.

- Lieckfeldt, E; Samuels, G; Nirenberg, H; Petrini, O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? Applied Environmental Microbiology. 65(6): 2418-2428.
- Martínez, B; Infante, D; Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Protección Vegetal. 28 (1): 1-11.
- Martínez, B; Infante, D; Peterira, B. 2015. Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. Protección de Cultivos. 30(1): 11-22.
- Medina, R. 2015. Selección de una cepa de *Trichoderma* sp. Como antagonista de patógenos del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis Lic. Santa Clara, CU, Universidad Central Marta Abreu de las Villas de Cuba. 43p.
- Morica, S; Ragazzi, A; Mitchelson, K; Assante, G. 2001. Antagonism of two-needle pine stem rust fungus *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* *in vitro* and in planta. Phytopathology. 91(5): 457-468.
- Mukerji, K; Manoharachary, C; Singh, J. (Eds.). 2006. Microbial activity in the rhizosphere. Soil biology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 349p.
- Navarro, J; Gómez, A. 2015. Diversidad de mamíferos terrestres en bosques cercanos a cultivos de piña, Cutris de San Carlos, Costa Rica. Cuadernos de Investigación UNED. 7(1): 59-65.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist. 106(949): 283-292.
- Nicholls, I. 2008. Control biológico de insectos. Un enfoque agroecológico. Medellín. Universidad de Antioquia. CO, 282p.
- Olmedo, V; Mendoza, A; Gómez, I; Cortés, C; Herrera, A. 2002. Multiple environmental signals determine the transcriptional activation of the mycoparasitism related gene

- prb 1 in *Trichoderma atroviride*. *Molecular Genetic and Genomics*. 267(2002): 703-712.
- Oksanen, J; Blanchet, F. G; Kindt, R; Legendre, P; McGlenn, D; Minchin, P. R. (2017). *Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.4-2*. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Orozco, S. 2017. Diversidad de cepas promisorias para el combate biológico de *Fusarium oxysporum* y *Pectobacterium carotovorum* en piña (*Ananas comosus*). Artículo sometido a revisión. *Revista Uniciencia*.
- Pal, K; Gardener, B. 2009. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1117 (02): 25.
- Peakall, R; Smouse, P. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6(1):288-295.
- Ramírez, F. 2009. Problemática de la expansión piñera en Costa Rica. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) Universidad Nacional (UNA). Enlace no 86, RAP-al.
- R Core Team. (2016). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: Foundation for Statistical Computing. Retrieved from URL <https://www.R-project.org/>
- Reina, J; Torres, L; Grizale, M. 2013. Mecanismo de acción de *Trichoderma harzianum* para el control de *Fusarium subglutinans*. *Momentos de Ciencia*. 10(1):54-58.
- Reinoso, Y; Casadesus, L; García, A; Gutiérrez, J; Pozos, V. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias de género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*. 10(3): 187-191.

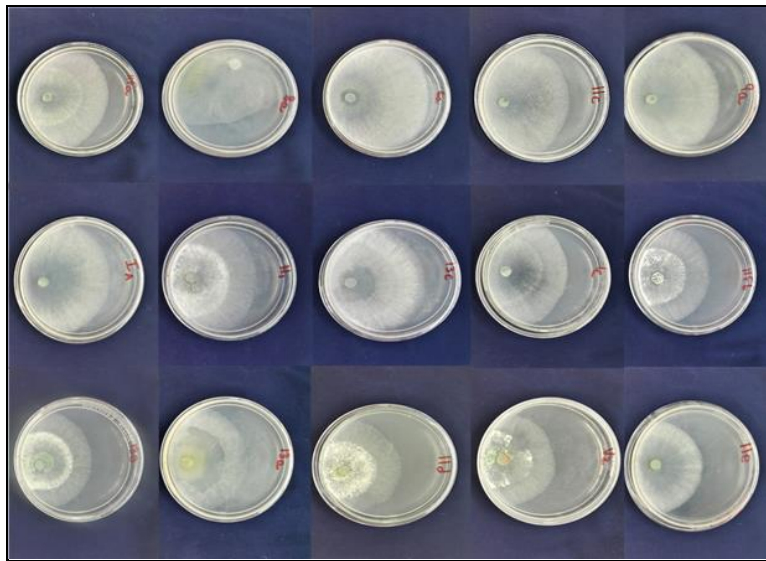
- Salazar, L; Aponte, G; Alcano, M; Sanabria, N; Guzmán, J. 2012. Importancia de las especies de *Trichoderma* para el control de *Macrophomina phaseolina* en las áreas agrícolas del estado Aragua, Venezuela. *Agronomía tropical*. 62(1): 1-4.
- Sánchez, V; Rebolledo, O. 2010. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con Agave tequilana en la región de Los Altos Sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagónica contra *Thielaviopsis paradoxa*. *Revista Mexicana de Micología*. 32(1): 11-18.
- Schoch, C; Seifert, K; Cooke, D. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(16): 6241-6246.
- Seidl, V; Seiboth, B. 2010. *Trichoderma reesei*: genetic strategies to improving strain efficiency. *Biofuels*. 1(2): 343-354.
- Shang, Y; Duan, Z; Huang, W; Gao, Q; Wang, C. 2011. Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109(1): 105-109.
- Souza, G; Costa, D; Correa, S; Murillo, J; Martins, I; Minaré, L. 2009. Potencial antagónico de *Trichoderma* spp. Originarios de diferentes agroecosistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium solani*. *Biota Neotrópica*. 9(3):145-149.
- Soriano, J. 2007. *Micotoxinas en alimentos*. Madrid, ES. Editorial Días de Santos, 397p.
- Sutton, J; Li, D; Peng, G; Yu, H; Zhang, P; Valdebenito, R. 1997. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in Strawberry leaves. *Plant Diseases*. 81(1): 315-328.
- Steyaert, J; Weld, R; Mendoza, A; Kryštofová, S; Šimkovič, M; Varečka, L; Stewart, A. (2013). *Capter 5: Asexual Development in Trichoderma: From Conidia to Chlamydospores*. CABI. 17p

- Tabsova, H; Wilson; J. 1997. Effects of temperature and light on germination of uredinospores of the pearl millet rust pathogen, *Puccinia substriata* var. indica. Plant Disease. 81(9): 1049-1052.
- Umaña, J. 2014. Diversidad y secuenciación de marcadores genéticos de *Trichoderma* spp. promisorias para el combate biológico de *Fusarium oxysporum* y *Pectobacterium carotovorum* en Piña (*Ananas comosus*). Práctica profesional Supervisada B.Sc. Heredia, CR. Universidad Nacional (UNA). 15p
- Valencia, J y Castro, B. 2004. Aspectos Biológicos de aislamientos de *Trichoderma* sp. antagonicos a *Rosellini abunodes*. Cenicafé. 55(1): 16-28.
- Vargas, C. 2011. Guía para la identificación y manejo integrado de plagas en Piña. Fundación PROAGROIN. Programa de Desarrollo Agroindustrial, San Carlos. CR. 29p.
- Vásquez, J. 2009. Evaluación de la eficacia *in vitro* de sustancias químicas y microorganismos antagonicos del género *Trichoderma* spp., como herramienta para la toma de decisiones en el control de enfermedades “Caso muerte descendente del cultivo de la piña *Ananas comosus* (L). Tesis Lic. San Carlos, CR, Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC).70p.
- Velasco, N. 2013. Identificación morfológica de aislamientos del género *Trichoderma* presentes en suelos cultivados con banano y caña de azúcar. Tesis Lic. Oaxaca, MEX. Universidad del Papaloapan. 61p.
- Verma, P; Chakrabarty, D; Jena, S; Mishra, D; Singh, P; Sawant, S; Tuli, R. 2009. The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: Comparative results for RAPD and ISSR. Industrial Crops and Products. 29(1):581–589.
- Villamil, C; Viteri, R; Villegas, O. 2014. Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora roreri* en *Theobroma cacao* bajo condiciones de

- campo. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. Colombia. 68(1): 7441-7450.
- Watanabe, S; Kumakura, K; Kato, H; Iyozumi, H; Togawa, M; Nagayama, K. 2005. Identification of *Trichoderma* SKT-1, a biological control agent against seedborne pathogens of rice. *Journal of General Plant Pathology* 71(5): 351-356.
- Xu, M; Jeffries, P; Pautasso, M; Jeger, M. 2011. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*. 101(1):1024-1031.
- Xu, Z, Xia, L. 2016. Expression of *Talaromyces thermophilus* lipase gene in *Trichoderma reesei* by homologous recombination at the *cbhl* locus. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 44(1): 1-9.
- Zietkiewicz, E; Rafalski, A; Labuda, D. 1993. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - Anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20(1): 179-183.
- Zúñiga, E. 2013. Efecto antagonista de *Trichoderma harzianum* contra *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfsii*, agentes causales de la pudrición de la cebolla. Instituto politécnico Nacional. Tesis Mag. Sc. Michoacán, MEX, Universidad de Michoacán, MX. 67p.

ANEXOS

Anexo 1. Crecimiento de aislamientos de *Trichoderma* las 72hr de su desarrollo, a una temperatura ambiente de 25°C



Anexo 2. Códigos y procedencia de las muestras de *Trichoderma* aisladas de suelo en zonas boscosas en la zona Norte de Costa Rica.

Código de la muestra	Zona de recolección
TRICHO 1 (11fa): <i>T. koningiopsis</i>	Río Cuarto de Grecia
TRICHO 2 (8a): <i>T. reesei</i>	Río Cuarto de Grecia
TRICHO 3 (V2)	Pital de San Carlos
TRICHO 4 (11fb): <i>T. asperelloides</i>	Muelle de San Carlos
TRICHO 5 (13b): <i>T. asperelloides</i>	Pital de San Carlos
TRICHO 6 (I3)	IDEM
TRICHO 7 (1c): <i>T. koningiopsis</i>	IDEM
TRICHO 8 (9a): <i>T. koningiopsis</i>	Río Cuarto de Grecia
TRICHO 9 (11e): <i>T. spirale</i>	Sarapiquí
TRICHO 10 (11d)	IDEM
TRICHO 11 (H1): <i>T. asperelloides</i>	IDEM
TRICHO 12 (11C): <i>T. koningiopsis</i>	Muelle de San Carlos
TRICHO 13 (6a): <i>T. koningiopsis</i>	IDEM
TRICHO 14 (13C): <i>T. spirale</i>	Sarapiquí
TRICHO 15 (13a): <i>T. spirale</i>	Sarapiquí
TRICHO 16 (Ia): <i>T. koningiopsis</i>	Muelle de San Carlos