

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma* sp. COMO
CONTROLADOR BIOLÓGICO DEL MOHO GRIS (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.) EN FRUTOS DE
MORA (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología
para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con énfasis en Genética y Biología
Molecular

IRENA HILJE RODRIGUEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2017

DEDICATORIA

A mi madre
A mi padre
A mi hermano
A mi esposo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero a Dios por todo. A mis padres, Ivo y Vera, a mi hermano Branko y a mi esposo Leo, por su incondicional apoyo, inagotable motivación y todo su amor. Gracias por creer en mis talentos y capacidades.

A mi comité asesor por todas las ayudas técnicas y los consejos brindados. A Federico por su ayuda con los análisis filogenéticos, Ramón por sus aportes en la parte de qPCR y análisis estadístico en R, y a don German por sus aportes en el área de fitopatología. Gracias a los tres por las revisiones que hicieron del documento escrito y por compartir sus conocimientos conmigo durante el desarrollo de esta investigación.

A mi hermano Branko y su esposa Natalie por todos sus consejos y ayuda con los análisis estadísticos en R.

A Marilyn Blanco por su amistad, todas las ayudas brindadas y por motivarme siempre.

A Ruth Rodríguez por sus consejos, motivación, por creer en mi, comprenderme y ayudarme de tantas maneras.

A Ana María Conejo y Ruth Castro por su amistad, sus consejos y todas las ayudas y apoyo en nuestro recorrido como biólogas.

A mis otros familiares y amigos por su apoyo, preocupación y motivación para seguir adelante.

A mis abuelos que dejaron un gran legado a través de mis padres que me enseñaron que los valores son irrenunciables.

A Rafael Orozco por colaborar con información del cultivo de la mora en Costa Rica y por ser el responsable del proyecto FEES-CONARE “Aplicación de tecnologías innovadoras para contribuir con el desarrollo sostenible del cultivo de higo (*Ficus carica*) y mora (*Rubus spp.*) en Costa Rica” del cual esta investigación fue parte.

A los productores de mora por su atención y por permitir la recolección de material de sus fincas.

Al Consejo Nacional de Rectores (CONARE), a la Universidad Nacional y a la Universidad de Costa Rica por el financiamiento de ese proyecto FEES y de esta investigación. A la Universidad de Costa Rica por ser mi casa de estudios desde que inicié

mi carrera universitaria. A la Universidad Nacional por permitirme trabajar en esa casa de enseñanza. Al Laboratorio de Fitopatología y al de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias Agrarias por el espacio y los insumos disponibles para trabajar en esta investigación.

A los compañeros de trabajo que me brindaron ayuda en las giras y en los laboratorios. A cada uno de los estudiantes que fueron inspiración para seguir adelante.

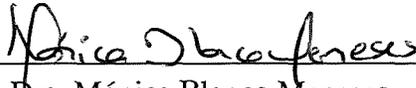
A mis compañeros de la maestría por esforzarse y luchar al igual que yo por una meta más.

A todas las personas que se preocuparon, creyeron en mí y me ayudaron de una u otra forma durante mis estudios de maestría y durante el desarrollo de esta investigación.

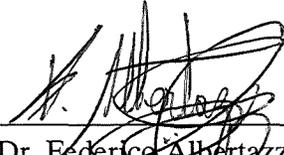
Quiero agradecer a las personas que se han cruzado por mi camino durante este largo recorrido y me han enseñado de tantas maneras lo importante de la vida.

¡Muchas gracias a todos!

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular".



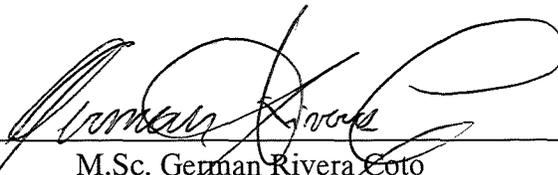
Dra. Mónica Blanco Meneses
**Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado**



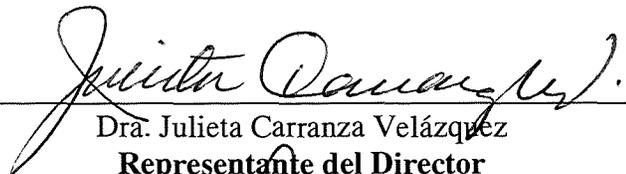
Dr. Federico Albertazzi Castro
Director de Tesis



Dr. Ramón Molina Bravo
Asesor



M.Sc. German Rivera Coto
Asesor



Dra. Julieta Carranza Velázquez
**Representante del Director
Programa de Posgrado en Biología**



Irena Hilje Rodríguez
Candidata

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
HOJA DE APROBACIÓN	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
PREFACIO	1
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr.	2
Combate biológico	5
Detección y monitoreo de hongos patógenos y antagonistas	6
JUSTIFICACIÓN	8
OBJETIVOS	9
OBJETIVO GENERAL.....	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
Capítulo I	10
Desarrollo y evaluación de una metodología múltiple para la detección y cuantificación de <i>Trichoderma</i> sp. (Hypocreaceae) y <i>Botrytis cinerea</i> (Sclerotiniaceae) en planta mediante PCR en tiempo real (qPCR).....	10
Resumen.....	10
INTRODUCCIÓN	11
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Identificación, cultivo y purificación de hongos	13
Extracción de ADN genómico total	14
PCR y secuenciación de ADN.....	15
Análisis filogenéticos	16
Diseño de la sonda.....	16
qPCR y análisis de datos	17
RESULTADOS.....	19
PCR y secuenciación de ADN.....	19
Análisis filogenéticos	20
Diseño de la sonda, qPCR y análisis de datos	23
DISCUSIÓN	27

Capítulo II.....	32
Monitoreo de la actividad antagónica de <i>Trichoderma</i> sp. como controlador biológico de <i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr. en frutos de mora (<i>Rubus adenotrichos</i> Schltdl.) mediante qPCR	32
Resumen.....	32
INTRODUCCIÓN	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Sitios de muestreo	36
Identificación, cultivo y purificación de hongos	35
Inoculación patógeno-antagonista en frutos	36
Extracción de ADN	37
qPCR	37
Análisis estadístico	39
RESULTADOS	39
qPCR y análisis estadístico.....	39
DISCUSIÓN	45
RECOMENDACIONES	49
REFERENCIAS	50
ANEXOS	62

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Sondas e imprimadores utilizados en qPCR.	18
CUADRO 2. Aislamientos del GenBank [®] que se utilizaron para los análisis filogenéticos	22
CUADRO 3. Aislamientos y sondas que se evaluaron.....	25

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: Desarrollo y evaluación de una metodología múltiplex para la detección y cuantificación de *Trichoderma* sp. (Hypocreaceae) y *Botrytis cinerea* (Sclerotiniaceae) en planta mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Fig. 1. Alineamiento múltiple de secuencias parciales del factor de elongación 1-alfa (EF1- α) de la traducción que muestra la posición de los iniciadores TrichoBV1 F/R (flechas) y la sonda TrichoBV1 (línea) diseñados para la detección del aislamiento *Trichoderma* BV1 mediante qPCR. Sólo se muestran los nucleótidos polimórficos; (.) indica un nucleótido idéntico, (-) indica un gap o espacio en la secuencia.....17

Fig. 2. Árbol filogenético generado por Mr. Bayes a partir de una región del gen EF1- α de 714 nucleótidos con 1000 reemplazos que muestra la posición de diferentes especies de *Trichoderma*. Las secuencias que se utilizaron del GenBank® se denotan con el número de accesión correspondiente. (Ama: Amazonas, Bra: Brasil, Can: Canadá, Came: Camerún, Col: Colombia, Ecu: Ecuador, Eth: Etiopía, Gal: Islas Galápagos, Ire: Irlanda del Norte, NZ: Nueva Zelanda, Per: Perú, Slo: Eslovenia, USA: Estados Unidos, UK: Reino Unido, Vie: Vietnam; *T. longibrachiatum*: especie utilizada como grupo externo).....21

Fig. 3. Evaluación de nueve combinaciones de concentración de imprimadores, mostrando el Cq promedio de cada combinación y la desviación estándar. F: *forward*, R: *reverse*.....23

Fig. 4. Evaluación de tres concentraciones de cada sonda, mostrando el Cq promedio de cada concentración y la desviación estándar. Sondas Bc2P para *B. cinerea* y sonda TrichoBV1 diseñada para el aislamiento *Trichoderma* BV1.24

Fig. 5. Curva estándar generada por la amplificación de diluciones seriadas (1:10) de ADN genómico del aislamiento *Trichoderma* BV1. La eficiencia de la reacción fue 98.80%.26

Fig. 6. Curva estándar generada por la amplificación de diluciones seriadas (1:10) de ADN genómico de *B. cinerea* BcLL. La eficiencia de la reacción fue de 94.71%26

Fig. 7. Gráfico de amplificación generado con las sondas e imprimadores Bc2F/2R/2P y TrichoBV1 F/R/P a partir del ADN de un fruto de mora inoculado con *B. cinerea* BcLL y *Trichoderma* BV1 y evaluado por duplicado.27

Capítulo II: Monitoreo de la actividad antagónica de *Trichoderma* sp. como controlador biológico de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. en frutos de mora (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) mediante qPCR

Fig. 1. Curva estándar generada por la amplificación de diluciones seriadas 1:10 de ADN genómico de *B. cinerea* BcLL. La eficiencia de la reacción fue 94.71%.....42

Fig. 2. Curva estándar generada por la amplificación de diluciones seriadas 1:10 de ADN genómico del aislamiento *Trichoderma* BV1. La eficiencia de la reacción fue 98.80%.42

Fig. 3. Cantidad de *Trichoderma* BV1 que se detectó con la sonda TrichoBV1 por día, por tratamiento (Bot: *B. cinerea* BcLL, BotTricho: *B. cinerea* BcLL + *Trichoderma* BV1, Control: frutos sin inocular, Tricho: *Trichoderma* BV1, TrichoBot: *Trichoderma* BV1 + *B. cinerea* BcLL), en los frutos de mora (A) y (B) diagrama de cajas que muestra la distribución de esos datos generados a partir de diluciones de ADN 1:1000 de los frutos de cada tratamiento. Número de copias: copias del genoma haploide de interés.....43

Fig. 4. Cantidad de *Botrytis cinerea* que se detectó con la sonda Bc2P por día, por tratamiento (Bot: *B. cinerea* BcLL, BotTricho: *B. cinerea* BcLL + *Trichoderma* BV1, Control: frutos sin inocular, Tricho: *Trichoderma* BV1, TrichoBot: *Trichoderma* BV1 + *B. cinerea* BcLL), en los frutos de mora (A) y (B) diagrama de cajas que muestra la distribución de los datos generados a partir de diluciones de ADN 1:100 de los frutos de cada tratamiento. Número de copias=copias del genoma haploide de interés.....44

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIC: criterio de Akaike

ANOVA: Análisis de Varianza

BI: inferencia bayesiana

Cq: número de ciclos en la amplificación de qPCR. El valor Cq es el ciclo en el que la señal de fluorescencia sobrepasa la fluorescencia basal que se genera en cada reacción.

ha: hectárea

DT: teoría de decisión

EF1- α : factor de elongación 1-alfa de la traducción

IGS: espaciador intergénico del ADN ribosomal

Mb: megabases

MGB: Minor Groove Binder (Ligando de unión al surco menor)

ML: máxima similitud

ml: mililitro

mM: milimolar

msnm: metros sobre el nivel del mar

nM: nanomolar

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDA: Papa Dextrosa Agar

qPCR: PCR en tiempo real o Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa

U: unidades

μ l: microlitro

μ M: micromolar

UNG: uracil-N-glicosi

PREFACIO

La mora es una planta que pertenece al género *Rubus* que incluye más de 400 especies distribuidas en América, África, Asia y Europa. Constituye uno de los géneros de mayor diversidad genética del reino vegetal (Jennings, 1988; Grijalba-Rativa, Calderón-Medellín & Pérez-Trujillo, 2010). Pertenece a la familia Rosaceae en donde se ubican especies frutales y ornamentales de importancia económica y consumo masivo como el almendro (*Prunus dulcis* Mill.), cerezo (*Prunus avium* L.), ciruelo (*Prunus domestica* L.), melocotonero (*Prunus persica* L.), frambueso (*Rubus idaeus* L.), freso (*Fragaria x ananassa* Duch.), manzano (*Malus* spp. L.), membrillo (*Cydonia oblonga* Mill.), membrillo ornamental (*Chaenomeles speciosa* Nak.), peral (*Pyrus communis* L.) y rosal (*Rosa* spp.). La mora (*Rubus* spp.) es un cultivo no tradicional de importancia económica y fuente rica en polifenoles. La mayoría de los compuestos polifenólicos presentes en sus frutos son taninos elágicos y antocianinas, los cuales tienen importantes actividades biológicas como acción antimutagénica, antiviral, anticancerígena, antitumoral, quimioprotectora y antioxidante (Soto, Pérez & Acosta, 2010). El fruto de la mora es un agregado, compuesto por múltiples drupas que poseen una semilla interior y están unidas a un receptáculo carnoso. Los frutos al inicio del proceso de maduración son de color verde. Luego adquieren un color rojo y cuando maduran toman coloraciones oscuras que varían entre púrpura y negro (Munguía, Orozco & Argüello, 2005; Sierra, Cruz & Casaca, 2005).

En Costa Rica el género *Rubus* se extiende en las partes más altas del país (entre 1400 y 2500 msnm), ubicadas principalmente en el Cerro de la Muerte y alrededores. La mayor expansión del área cultivada de mora se localiza en la zona de Los Santos (Tarrazú, Dota, León Cortés), El Guarco de Cartago y las partes altas de Pérez Zeledón (Castro & Cerdas, 2005; Soto, Pérez & Acosta, 2010). La mora en Costa Rica es producida por alrededor de 1500 agricultores en parcelas con áreas sembradas entre 0.5 y 1.5 ha, donde manejan el cultivo de forma convencional u orgánica en pequeñas unidades familiares (R. Orozco-Rodríguez, comunicación personal, 4 de Agosto, 2017). La mora se cultiva en el país de forma poco tecnificada, con bajo uso de insumos, y se considera silvestre (Segreda, 2005) debido a que no ha sido sometida a programas de mejoramiento.

El ciclo de vida del cultivo de mora es bianual, compuesto por una raíz perenne y tallos bianuales. En el trópico, esto permite que exista producción casi todo el año. Sin embargo, la mayor producción en Costa Rica ocurre en los meses de marzo y abril (Castro & Cerdas, 2005). Existen diferentes especies y variedades de mora. Los principales tipos de mora criolla cultivados en el país son: la mora Vino con espinas rojas (*R. adenotrichos*), Vino con espinas blancas (*R. adenotrichos*), Vino sin espinas (*R. adenotrichos*), Vino dulce (*R. adenotrichos*), Vino enana (*R. adenotrichos*), Caballo (*R. urticifolius*), Ratón (*R. urticifolius*), Negrita (*R. miser*), y Castilla (*R. glaucus*) (Munguía *et al.*, 2005; Varela *et al.*, 2015). La variedad Vino es la más extendida en el país debido a que presenta mejores niveles de producción, calidad y aceptación general de la fruta. Además cuenta con las mejores características sensoriales (color morado oscuro), físicas (firmeza y tamaño mediano), químicas (acidez y grados Brix), de mercado (tanto nacional como internacional) y biológicas (tolerancia a plagas y enfermedades) (Soto *et al.*, 2010). Esta variedad se ha cultivado también de forma orgánica y se introdujo en el pasado a los mercados extranjeros en mayor escala (Castro & Cerdas, 2005).

La producción mundial de mora para el 2005 fue de 154.603 toneladas de fruto comercial. El área sembrada pasó de 13 958 ha en 1995 a 20 035 ha en el año 2005, lo que corresponde a un incremento del 45% del área cultivada. El país con mayor área cultivada en el año 2005 fue Serbia, seguido de Estados Unidos y en tercer lugar México. En el caso de Costa Rica, para el 2005 se registraron 1.550 ha de mora cultivada, por lo que compartía con China el quinto lugar a nivel mundial (Strik, Clark, Finn & Bañados, 2007). Sin embargo, en la actualidad, la producción de mora en Costa Rica es utilizada sólo para consumo local como fruto fresco o procesado debido a los altos estándares de calidad que exigen los mercados internacionales para la importación de productos orgánicos y libres de patógenos.

***Botrytis cinerea* Pers.:Fr.**

Entre las enfermedades que afectan al cultivo de la mora se encuentra el moho gris causado por *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (= *Botryotinia fuckeliana*). Este patógeno se considera de gran importancia económica debido a su potencial epidémico y destructivo ya

que ocasiona daños en el campo durante el desarrollo de los cultivos, así como en el almacenamiento y el transporte de los frutos (Van Kan, 2003). *B. cinerea* es la fase asexual (anamorfo) y la forma más común en la que se encuentra este patógeno en cultivos infectados. Este hongo pertenece al phylum Ascomycota, clase Leotiomycetes, orden Helotiales, familia Sclerotiniaceae (Hawksworth, Kirk, Sutton & Pegler, 1995; Noyd, 2000; Amselem *et al.*, 2011). El genoma de *B. cinerea* es haploide, de aproximadamente 38 Mb, el cual incluye entre 13 664 y 14 279 genes (Amselem *et al.*, 2011).

Botrytis cinerea es un organismo polífago que afecta cultivos de importancia agronómica así como ornamentales, bulbos y frutos (Jarvis, 1977; Rigotti, Gindro, Richter & Viret, 2002; Suárez *et al.*, 2005; Rigotti, Viret & Gindro, 2006; Elad, Williamson, Tudzynski & Delen, 2007). Se ha identificado dicho hongo en más de 200 especies de plantas sin ninguna aparente especificidad de hospedero ocasionando serias pérdidas económicas (Benito, Arranz & Eslava, 2000; Rigotti *et al.*, 2006; Amselem *et al.*, 2011; Dean *et al.*, 2012). Este hongo posee una amplia distribución geográfica que incluye zonas tropicales, subtropicales y zonas templadas (Jarvis, 1977; Elad *et al.*, 2007). Esta enfermedad se considera una de las más comunes y serias del género *Rubus* y es el mayor problema al que se enfrenta la industria del vino en el mundo (Keller, Viret & Cole, 2003; Dean *et al.*, 2012).

Botrytis cinerea es un patógeno ubicuo que aparece de forma abundante a través del año como parásito y saprófito facultativo y se vuelve muy agresivo si las condiciones son favorables. Ataca los cultivos en cualquier estado de desarrollo e infecta cualquier parte aérea de la planta así como sus productos después de ser cosechados (Benito *et al.*, 2000; Betanzo, 2005; Cabello, 2005; Van Kan, 2003). El ciclo de vida de *B. cinerea* inicia cuando los conidios hacen contacto con la superficie de un hospedero luego de ser transportados por el viento a través de largas distancias. Posterior a la adhesión, los conidios germinan sobre la superficie del hospedero bajo condiciones de humedad y producen un tubo germinal que origina un apresorio el cual penetra la superficie. Una vez que el hongo penetra, establece sus hifas dentro de los tejidos epidérmicos y causa lesiones que pueden producir necrosis o respuestas de defensa por parte de la planta (Jarvis, 1977; Van Kan, 2003; Lo Presti *et al.*, 2015; AbuQamar, Moustafa & Phan-Tran, 2017). En algunos casos ese es el comienzo del periodo de latencia en donde se ve restringido el crecimiento del

hongo (Jarvis, 1977; Van Kan, 2003). La latencia se define como el periodo entre la infección y la aparición de síntomas visibles. En el caso de *B. cinerea*, este puede ser largo y variable. Una vez que el hongo se reactiva y esporula, puede desarrollarse sobre la superficie de hojas, flores o frutos como masas de conidios de apariencia polvorienta (Jarvis, 1977; Viret, Keller, Jaudzems & Cole, 2004; Van Kan, 2003; Holz, Coertze & Williamson, 2007; Cadle-Davidson, 2008). En consecuencia, una planta o sus productos cosechados, en apariencia sanos, pueden deteriorarse con rapidez, al contar con condiciones adecuadas para que la enfermedad se manifieste. En el caso del cultivo de la uva, fresa, frambuesa, orquídeas, así como en otros cultivos, este patógeno infecta las inflorescencias y causa la muerte de las flores, en especial durante periodos lluviosos, o produce infecciones asintomáticas que permanecen latentes, hasta inicios de la maduración de los frutos (Elmer & Michailides, 2007; Jarvis, 1977). En Costa Rica, *B. cinerea* representa un problema desde el campo hasta la poscosecha.

El combate de *B. cinerea* con fungicidas es difícil debido a los largos periodos de latencia que pueden transcurrir entre la infección del hongo y la aparición de síntomas en el hospedero, los periodos prolongados y traslapados de floración y fructificación, el desarrollo explosivo del hongo que ocurre en periodos de cosecha y el establecimiento de cepas tolerantes a los fungicidas utilizados (Droby & Lichter, 2007; Elad *et al.*, 2007; Leroux, 2007). Además, la utilización de agroquímicos es cada vez menos recomendada debido a los problemas de contaminación ambiental y problemas a la salud humana, derivados del uso indebido de estos productos. Los plaguicidas y otras sustancias tóxicas de origen sintético que se utilizan en la agricultura se han asociado a múltiples problemas de salud y hasta la muerte. Además causan contaminación de cuencas y mantos acuíferos. Costa Rica se encuentra en primer lugar, a nivel mundial, en consumo de kilogramos de plaguicidas que se utilizan por hectárea de cultivo agrícola (Araya, 2015). Por estas razones, se sugiere un manejo integrado de esta enfermedad o combate biológico como una alternativa o complemento viable para controlar este patógeno y así contribuir a la producción de un cultivo más verde con un menor uso y abuso de agroquímicos (Van Kan, 2003; Elad & Stewart, 2007; Molina-Mercader, Zaldúa-Flores, González-Vargas & Sanfuentes-Von Stowasser, 2006; Araya, 2015).

Combate biológico

Cook (1993) define el combate biológico como la reducción en la densidad de inóculo de un patógeno o la supresión de actividades de un organismo que causa daño, a través de uno o más organismos que se conocen como enemigos naturales, adquirida de forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedero o antagonista. El combate biológico mediante microorganismos antagonistas naturales ha sido extensamente estudiado con el fin de explotar su potencial para la supresión biológica de enfermedades. Los primeros trabajos de combate biológico de *B. cinerea* involucraron la aplicación de hongos saprófitos y bacterias que inhibían el desarrollo de este patógeno. Posteriormente otros hongos han sido evaluados para el combate de *B. cinerea* (Molina-Mercader *et al.*, 2006; Elad & Stewart, 2007). Entre éstos se encuentran diferentes especies de *Trichoderma* (Molina-Mercader *et al.*, 2006; Elad & Stewart, 2007; Martínez & Moreno, 2008; Calvo-Araya, Rivera-Coto, Orozco-Cayasso & Orozco-Rodríguez, 2012; Marín-Chacón, Rivera-Coto, Villalobos-Moya, Orozco-Rodríguez & Orozco-Cayasso, 2017). El género *Trichoderma* es uno de los agentes biocontroladores más estudiados contra patógenos de plantas (Hermosa *et al.*, 2000; Chaverri, Castlebury, Samuels & Geiser, 2003; Harman, Howell, Viterbo, Chet & Lorito, 2004; Ha, 2010; López-Mondéjar, Antón, Raidl, Ros & Pascual, 2010; Moraga-Suazo, Opazo, Zaldúa, González & Sanfuentes, 2011; Sharma *et al.*, 2011). *Trichoderma* (=Hypocrea) pertenece al phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Hypocreaceae. El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794 (Cook & Baker, 1983) y en la actualidad es un hongo ampliamente estudiado. Además, se han descrito muchas especies a través de análisis moleculares complementarios.

Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Su distribución tan amplia y su plasticidad ecológica tienen una relación estrecha con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y la resistencia a inhibidores microbianos (Infante, Martínez, González & Reyes, 2009).

Se han empleado varias especies y cepas de *Trichoderma* como agentes de combate biológico contra *Botrytis* en diferentes cultivos. En el caso del cultivo de la mora (*Rubus*

adenotrichos Schltld.) en Costa Rica, se han realizado pruebas de antagonismo con varios aislamientos de *Trichoderma* contra *B. cinerea* en el laboratorio y en campo (Castillo-Jiménez, 2011; Calvo-Araya *et al.*, 2012, Marín-Chacón *et al.*, 2017). Dichas cepas se aislaron de frutos de mora cultivada provenientes del campo y mostraron resultados promisorios contra el moho gris.

Para desarrollar un programa de control biológico con hongos o bacterias como antagonistas se requiere buscar y aislar los potenciales controladores biológicos, identificarlos, reproducirlos en el laboratorio, hacer ensayos de antagonismo en el laboratorio, aplicarlos en campo y monitorearlos a través de diferentes metodologías (Molina-Mercader *et al.*, 2006; Heydari & Pessarakli, 2010). En la actualidad existen métodos sensibles y seguros basados en el análisis de ADN que permiten detectar y cuantificar hongos en tejido vegetal y por lo tanto monitorear el establecimiento de hongos que se encuentran como patógenos latentes hasta su desarrollo o infección sintomática.

Detección y monitoreo de hongos patógenos y antagonistas

La técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una herramienta útil para el diagnóstico y el estudio de hongos fitopatógenos. Esta técnica ofrece ventajas sobre los métodos tradicionales de diagnóstico debido a que los microorganismos no requieren ser cultivados para ser detectados. Además, la técnica tiene el potencial de detectar una sola molécula blanco en una mezcla compuesta y además es rápida y versátil (Henson & French, 1993). Ha contribuido a reducir algunos de los problemas asociados con la detección, control y presencia de patógenos en plantas. Dependiendo del diseño de los imprimadores que se utilicen para la amplificación del ADN, es posible una mayor o menor selectividad (Schena, Nigro, Ippolito & Gallitelli, 2004) que permita la detección o identificación de un patógeno a nivel de especie o cepa.

A pesar de las ventajas que ofrece el uso de PCR convencional para la detección rutinaria de patógenos de plantas, esta técnica no permite realizar análisis cuantitativos del inóculo de los patógenos. Es por ello que en algunos casos el uso de este tipo de PCR se ha sustituido por otras técnicas más robustas.

A finales de los años noventa se empezó a utilizar la técnica conocida como PCR en Tiempo Real (qPCR) para la detección de patógenos de plantas de forma directa a partir de tejidos vegetales y desde entonces se ha adaptado a muchos sistemas planta-patógeno. Esta técnica combina la sensibilidad del PCR convencional con la generación de una señal fluorescente específica que permite un análisis en tiempo real de la cinética de las reacciones y la cuantificación de los ADNs amplificados de los organismos de interés (Schena *et al.*, 2004; Schena, Hughes & Cooke, 2006; Hukkanen, Pietikäinen, Kärenlampi & Kokko, 2006; López-Mondéjar *et al.*, 2010; van Brouwershaven, Bruil, van Leeuwen & Kox, 2010; Postollec, Falentin, Pavan, Combrisson & Sohier, 2011). Esta técnica es más rápida que el PCR convencional ya que no requiere procesos de post-amplificación con lo que se reduce además la manipulación de las muestras. Otra de las ventajas de la técnica es el uso de diferentes fluorocromos como marcaje para facilitar la detección de varios microorganismos en una misma muestra. El qPCR permite una cuantificación precisa y segura de los organismos blanco en muestras compuestas de suelo, agua, aire y tejidos, y abrió nuevas posibilidades para estudios de diagnóstico de patógenos. Debido a la alta sensibilidad y reproducibilidad, el qPCR es ideal también para detectar pequeños cambios de resistencia y susceptibilidad de los hospederos (Schena *et al.*, 2004). En el caso de *B. cinerea*, ya se han realizado ensayos de detección y cuantificación de dicho patógeno por medio de esta técnica en diferentes especies de plantas (Rigotti *et al.*, 2002; Brouwer *et al.*, 2003; Gachon & Saindrenan, 2004; Mehli, Kjellsen, Dewey & Hietala, 2005; Suárez *et al.*, 2005; Chilvers, du Toit, Akamatsu & Peever, 2007; Cadle-Davidson, 2008; Celik *et al.*, 2009; Diguta *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2013). Asimismo, para el género *Trichoderma* se han desarrollado sondas genéricas para detectar diferentes especies así como sondas dirigidas hacia una sola especie con el fin de monitorear y cuantificar diferentes poblaciones en muestras ambientales de suelo o en ensayos con hongos fitopatógenos (Rubio, Hermosa, Keck & Monte, 2005; Hagn, Wallisch, Radl, Munch & Schloter, 2007; Kim & Knudsen, 2008; Savazzini, Oliveira-Longa, Pertot & Gessler, 2008; López-Mondéjar *et al.*, 2010).

JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia económica y nutricional de la mora (*Rubus adenotrichos* Schltld.) y a las exigencias de los mercados nacional e internacional, se han hecho intentos por producirla de manera orgánica, sin insumos químicos sintéticos, en Costa Rica. Sin embargo, el sistema de producción orgánica del país al igual que el sistema de producción convencional es afectado por la incidencia de *B. cinerea* en los frutos, lo que provoca rechazo para su comercialización y pérdidas económicas. Con el propósito de incorporar nuevas técnicas de producción y desarrollar un programa de combate biológico, se han desarrollado diferentes investigaciones con el fin de encontrar agentes biocontroladores que contribuyan a resolver dicha problemática. Anteriormente se aislaron hongos asociados al cultivo, provenientes de diferentes zonas productoras de mora en Costa Rica, con el fin de encontrar antagonistas contra *B. cinerea*. Las pruebas de antagonismo en el laboratorio y ensayos de campo mostraron que varias cepas aisladas del género *Trichoderma* lograron controlar el crecimiento de *B. cinerea* (Castillo-Jiménez, 2011; Calvo-Araya *et al.*, 2012; Marín-Chacón *et al.*, 2017). El presente estudio continuó con la siguiente fase la cual consistió en utilizar la técnica de PCR en tiempo real para monitorear y cuantificar estos hongos y estudiar así la eficacia en el establecimiento del patógeno y su antagonista sobre los frutos de mora para medir la efectividad del antagonista en combatir al patógeno.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma* sp. como controlador biológico del moho gris (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.) en fruto de mora (*Rubus adenotrichos* Schltld.) mediante PCR en tiempo real (qPCR).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener aislamientos monospóricos de *B. cinerea* de una zona productora de mora de la variedad Vino espina roja (*Rubus adenotrichos*) así como aislamientos monospóricos de cepas de *Trichoderma* sp. a partir de una micoteca para utilizarlos en los diferentes ensayos.
- Desarrollar una sonda e imprimadores para utilizar con los aislamientos de *Trichoderma* sp. seleccionados, a partir de sus secuencias.
- Estandarizar una metodología de detección y cuantificación de *Trichoderma* sp. en frutos de mora mediante qPCR.
- Analizar el crecimiento y la actividad antagónica entre *Trichoderma* sp. y *B. cinerea* a través del monitoreo y la cuantificación del complejo patógeno-antagonista (*B. cinerea*-*Trichoderma* sp.) inoculado en frutos de mora de la variedad Vino espina roja (*Rubus adenotrichos*), mediante qPCR múltiplex y no múltiplex.

CAPÍTULO I

(En formato de artículo científico para ser sometido)

Desarrollo y evaluación de una metodología múltiple para la detección y cuantificación de *Trichoderma* sp. (Hypocreaceae) y *Botrytis cinerea* (Sclerotiniaceae) en planta mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Resumen

Trichoderma es comúnmente utilizado como agente de combate biológico contra diferentes patógenos y en diferentes cultivos. En el caso del cultivo de la mora (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) en Costa Rica, aislamientos de *Trichoderma* a partir de frutos de mora provenientes del campo mostraron resultados promisorios de antagonismo en laboratorio y campo para controlar el moho gris causado por *Botrytis cinerea*. El objetivo de este estudio fue diseñar una sonda e imprimadores y estandarizar una metodología para la cuantificación de la actividad antagónica de un aislamiento de *Trichoderma* sobre *B. cinerea* en frutos de mora por medio de qPCR. Para los ensayos de qPCR, se diseñaron dos iniciadores y una sonda para el aislamiento *Trichoderma* BV1, basado en una región del factor de elongación 1-alfa (EF1- α) de la traducción. Para detectar y cuantificar *B. cinerea* se utilizó un kit comercial. Los ensayos qPCR se llevaron a cabo utilizando ADN genómico total extraído a partir de frutos de mora inoculados con *B. cinerea*, *Trichoderma* o ambos. Se evaluó el set de iniciadores y sonda diseñados, con el aislamiento BV1, así como con otros aislamientos de *Trichoderma*. Se construyó una curva estándar para la cuantificación de BV1. Los ensayos mostraron alta sensibilidad y reproducibilidad. Se logró la detección y cuantificación simultánea del aislamiento BV1 y *B. cinerea* en muestras compuestas. La sonda junto con los imprimadores diseñados en este estudio se podrían utilizar en el futuro en programas de control biológico para el monitoreo de dichos hongos.

Palabras clave: *Rubus adenotrichos*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma* sp., combate biológico, qPCR.

INTRODUCCIÓN

El control biológico mediante microorganismos antagonistas naturales ha sido muy estudiado con el fin de explotar su potencial para la supresión biológica de enfermedades. El género *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales) es uno de los agentes biocontroladores más estudiados para controlar patógenos de plantas (Bell, Wells & Markham, 1982; Hermosa *et al.*, 2000; Chaverri *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2009; Ha, 2010; López-Mondéjar *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2011; Moraga-Suazo *et al.*, 2011). Diferentes especies de *Trichoderma* se han utilizado en el combate biológico de *Botrytis cinerea* (Molina-Mercader *et al.*, 2006; Elad & Stewart, 2007; Martínez & Moreno, 2008; Calvo-Araya *et al.*, 2012; Marín-Chacón *et al.*, 2017; Merchán-Gaitán, Ferrucho & Alvarez-Herrera, 2014). *B. cinerea* es un hongo patógeno de importancia económica que afecta a más de 200 especies de plantas sin ninguna aparente especificidad de hospedero (Benito *et al.*, 2000; Van Kan, 2003; Rigotti *et al.*, 2006; Amselem *et al.*, 2011; Dean *et al.*, 2012). Causa la enfermedad conocida como moho gris la cual se considera una de las más comunes y serias del género *Rubus* (Keller *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2012). *B. cinerea* ataca cualquier estado de desarrollo de los cultivos e infecta cualquier parte aérea de la planta así como sus productos después de ser cosechados (Benito *et al.*, 2000; Betanzo, 2005; Cabello, 2005; Van Kan, 2003).

Se han descrito muchas especies del género *Trichoderma* por medio de análisis moleculares. Estas especies tienen una distribución cosmopolita (Chaverri & Samuels, 2013). Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica tienen una estrecha relación con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y la resistencia a inhibidores microbianos (Infante *et al.*, 2009). Los hábitos de *Trichoderma* spp. son diversos e incluyen el micoparasitismo o ataque directo hacia un hongo, la antibiosis que involucra la producción de metabolitos secundarios, la competencia con otros hongos por nutrientes, el saprofitismo, el endofitismo y la inducción de resistencia sistémica en la planta hospedera (Druzhinina, Kopchinskiy & Kubicek, 2006; Infante *et al.*, 2009; Gazis, Rehner & Chaverri, 2011; Chaverri & Samuels, 2013).

Existen diferentes técnicas moleculares que se han implementado para el estudio de hongos fitopatógenos y antagonistas. Dentro de ellas se encuentra la técnica de PCR en

tiempo real (qPCR), una herramienta que permite la cuantificación precisa y segura de los organismos blanco en muestras compuestas de suelo, agua, aire y tejidos, y es ideal para detectar pequeños cambios de resistencia y susceptibilidad de los hospederos (Schena *et al.*, 2004). La técnica de qPCR tiene la ventaja de que es más sensible que el PCR punto final y permite hacer análisis cuantitativos de los organismos blanco. Se han realizado ensayos de detección y cuantificación de *B. cinerea* por medio de esta técnica en diferentes especies de plantas (Rigotti *et al.*, 2002; Brouwer *et al.*, 2003; Gachon & Saindrenan, 2004; Mehli *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2005; Chilvers *et al.*, 2007; Cadle-Davidson, 2008; Celik *et al.*, 2009; Diguta *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2013). Para el género *Trichoderma* se han desarrollado sondas genéricas para detectar diferentes especies así como sondas dirigidas hacia una sola especie con el fin de monitorear y cuantificar diferentes poblaciones en muestras ambientales de suelo o en ensayos con hongos fitopatógenos (Rubio *et al.*, 2005; Hagn *et al.*, 2007; Kim & Knudsen, 2008; Savazzini *et al.*, 2008; López-Mondéjar *et al.*, 2010).

El ADN ribosomal nuclear (ADNr) es la región más común que se utiliza como blanco para el diseño de imprimadores para la detección e identificación de microorganismos fitopatógenos mediante PCR debido a que contiene regiones con alta variabilidad así como secuencias muy conservadas. Esta región contiene los genes 18S, 5.8S y 28S separados por los espaciadores internos transcritos ITS1 e ITS2, y la región espaciadora intergénica (IGS). Las regiones ITS se han secuenciado extensamente y en la actualidad se encuentran disponibles numerosas secuencias de referencia de ADNr en las bases de datos. Esto ha hecho posible que se diseñen imprimadores universales. Para las especies de *Trichoderma* se han diseñado imprimadores que amplifican las regiones ITS1 e ITS2 (White *et al.*, 1990; Rubio *et al.*, 2005; Maymon *et al.*, 2004; Druzhinina *et al.*, 2006; Siddiquee *et al.*, 2007; Savazzini *et al.*, 2008; López-Mondéjar *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque se considera la región ITS como la región oficial (código de barras del ADN) para la identificación de hongos (Larena *et al.*, 1999; Druzhinina *et al.*, 2005; Druzhinina *et al.*, 2006; Schoch *et al.* 2012), se ha visto que para algunos grupos es una región limitada e imprecisa en la identificación de especies (Gazis *et al.*, 2011; Chaverri *et al.*, 2015), como ocurre en el caso de los Hypocreales (Chaverri *et al.*, 2015). No se logra diferenciar correctamente especies muy relacionadas por medio de esta región (Samuels, 2006;

Chaverri *et al.*, 2015; Vidaurre-Montoya, Andrade-Meirelles, Chaverri & Rodrigues, 2016; ISTH-International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy) ya que comparten homología de secuencia. Se recomienda el factor de elongación 1-alfa (EF1- α) de la traducción como un segundo marcador filogenético o código de barras por ser más variable que el ADNr y mostrar más caracteres filogenéticos informativos que otras regiones (Chaverri *et al.*, 2003; Samuels, 2006; Chaverri *et al.*, 2015). Esa variabilidad permite encontrar diferencias entre y dentro de grupos de especies de *Trichoderma* con estrecha relación entre ellas (Samuels, 2006).

Contar con una sonda e imprimadores específicos para la detección de un aislamiento de *Trichoderma* antagonista de *B. cinerea*, por medio de qPCR, permitirá la medición de su crecimiento y el monitoreo de su efecto contra el patógeno o su desarrollo dentro del hospedero sin depender de la visualización de micelio distinguible. Esto permitiría cuantificar el crecimiento de *Trichoderma* como una medida indirecta de su actividad antagónica. El objetivo de este estudio fue desarrollar una sonda a partir del EF1- α , y estandarizar una metodología múltiplex de qPCR con la sonda diseñada, para la detección y cuantificación en planta de un aislamiento de *Trichoderma* inoculado sobre frutos de mora (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) infectados con *B. cinerea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación, cultivo y purificación de hongos

Se visitó una finca productora de mora (*Rubus* spp.) ubicada en La Luchita del Guarco de Cartago (N 09°44'39.9" W083°56'15.7"), se recolectaron frutos de mora de la variedad Vino espina roja (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) con visibles síntomas de infección por *B. cinerea* y se trasladaron al laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA) de la Universidad Nacional (UNA). Se hizo identificación y aislamiento directo del patógeno (BcLL) y se cultivó en placas petri estériles con PDA (papa-dextrosa-agar) y ácido láctico al 25% (French & Hebert, 1980). Se incubaron las placas petri con el hongo a temperatura ambiente (25°C) y se monitoreó su crecimiento por al menos tres días. Luego se purificó y se multiplicó BcLL en medio de cultivo fresco. Para ello se tomó una porción

de micelio del hongo y se cultivó de nuevo en placas petri estériles con PDA y ácido láctico al 25%. Se incubaron las placas con el hongo a temperatura ambiente durante ocho días o hasta que colonizara por completo el medio. Se hicieron cultivos monospóricos a partir de estos cultivos de BcLL, de acuerdo con la metodología de French y Hebert (1980). Para el cultivo del hongo antagonista *Trichoderma* sp., se tomaron varios aislamientos de la micoteca del Laboratorio de Fitopatología de la ECA. Estos aislamientos provinieron de diferentes zonas productoras de mora (*Rubus adenotrichos* Schltdl.), los cuales se encontraron asociados al cultivo y demostraron actividad antagónica contra *B. cinerea* en el laboratorio y en campo (Castillo-Jiménez, 2011; Calvo-Araya, *et al.*, 2012; Marín-Chacón *et al.*, 2017). Se reactivaron los aislamientos de *Trichoderma* BC1 de Bajo Canet de Tarrazú (N 09°42'01.3" W083°59'49.0") (Marín-Chacón *et al.*, 2017), J2.1 y J2.2 de Jardín de Pérez Zeledón (N 09°30'08.3" W083°41'29.4") (Marín-Chacón *et al.*, 2017), BV1 de Buena Vista de Pérez Zeledón (N 09°30'15.3" W083°39'28.4") (Calvo-Araya *et al.*, 2012) y SM13B de San Martín de León Cortés (N 09°43'43.2" W084°00'06.3") (Calvo-Araya *et al.*, 2012). Los aislamientos se reactivaron y se cultivaron siguiendo la metodología de French y Hebert (1980) hasta obtener cultivos monospóricos.

Extracción de ADN genómico total

Se rasparon los conidios y el micelio de dos placas petri con cultivo monospórico de cada hongo. El tejido se colocó en tubos de 1.5 ml. Se utilizó el protocolo de extracción de Castle *et al.* (1998) con algunas modificaciones realizadas por Hoyos, Chaparro, Abramsky, Chet y Orduz (2008) y se ajustó en el laboratorio para trabajar con volúmenes pequeños (Anexo I). Además, se extrajo ADN de frutos de mora maduros (*R. adenotrichos* Schltdl.) inoculados en ensayos previos con *B. cinerea* (BcLL) y *Trichoderma* BV1 (Hilje-Rodríguez *et al.*, en progreso). Cada fruto de mora se maceró de forma manual con ayuda de un mortero y pistilo de porcelana y luego se siguió el protocolo antes mencionado sin modificaciones. Se cuantificó la calidad y cantidad de todos los ADNs extraídos mediante electroforesis en geles de agarosa TopVision™ (ThermoScientific™) al 0.8% con GelRed™ (Biotium Inc.) a 1X y espectrofotometría de luz UV (NanoDrop™2000,

ThermoScientific™). Se utilizaron columnas “DNeasy Mini spin” del DNeasy Plant Mini kit® de QIAGEN® para limpiar ADNs que presentaron impurezas.

PCR y secuenciación de ADN

Por medio de PCR se amplificaron las regiones entre los espaciadores internos transcritos ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales nucleares y una región del gen que codifica para el factor de elongación 1-alfa (EF1- α) de la traducción, que incluye el cuarto y quinto intrón. Inicialmente se utilizaron cuatro imprimadores universales denominados ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCTTCATCGATGC-3'), ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White, Bruns, Lee & Taylor, 1990; Larena, Salazar, González, Julián & Rubio, 1999; Chaverri *et al.*, 2003; Freeman, Minz, Jurkevitch, Maymon & Shabi, 2000; Freeman *et al.*, 2004, Maymon *et al.*, 2004; Druzhinina *et al.*, 2006; Siddiquee, Abdullah, Soon-Guan, & Rohaza-Aziz, 2007; Chaverri *et al.*, 2015) y luego los imprimadores EF1-728M (5'-CATYGAGAAGTTCGAGAAGG -3'), EF-2R (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3'), Ef700f (5'- TCTACCAGTGCGGTGGTA-3') y tef1R (5'-GCCATCCTTCGAACCAGC -3') para el factor de elongación (Carbone & Kohn, 1999; Chaverri *et al.*, 2003; Chaverri & Samuels, 2013; Chaverri *et al.*, 2015). Se utilizaron los mismos imprimadores para amplificar ADN de todos los aislamientos de *Trichoderma* así como de *B. cinerea* y de plántulas de mora cultivadas *in vitro*, libres de hongos. Se realizaron reacciones de PCR de 25 μ l para lo cual se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1.25 U de DreamTaq™ polimerasa, DreamTaq™ Buffer (ThermoScientific™) a una concentración 1X, dNTPs a una concentración de 0.2 mM cada uno, imprimadores a 1 μ M cada uno, 100-200 ng/ μ l de ADN y agua libre de nucleasas. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti™ (Applied Biosystems™) bajo el siguiente perfil de temperaturas: un primer paso de desnaturalización a 95°C por 3 min, 95°C por 1 min, 56°C por 30 s, 72°C por 30 s; repetido por 40 ciclos, y un último paso de extensión a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa TopVision™ al 1% con GelRed™ y se enviaron a purificar y a secuenciar en ambas direcciones a la compañía Macrogen Inc. (Corea del Sur). Las secuencias se editaron y se ensamblaron con

el programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall 1999) y luego se utilizó el BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para compararlas con secuencias depositadas en GenBank[®] del NCBI (National Center for Biotechnology Information) e identificarlas.

Análisis filogenéticos

Se hicieron alineamientos y análisis de agrupamiento de las secuencias de ADN de los aislamientos de *Trichoderma* spp. para calcular relaciones e identificarlos. Se evaluaron tres tipos de alineamientos: Clustal W v.2.0 (Larkin *et al.*, 2007), MUSCLE (Edgar, 2004) y MAFFT v.7.017 (Kato, Misawa, Kuma & Miyata, 2002). Se utilizó el programa jModelTest v.2.1.4 (Darriba, Taboada, Doallo & Posada, 2012) para determinar el mejor modelo de sustitución de nucleótidos para generar los árboles. Se evaluaron los criterios de asignación de modelo por máxima similitud (ML) (Hemmerle & Hartley, 1973), inferencia bayesiana (BI) (Schwarz, 1978), teoría de decisión (DT) (Minin, Abdo, Joyce & Sullivan, 2003) y el criterio de Akaike (AIC) (Akaike, 1973). Por último se utilizaron los programas PhyML v.3.0 (Guindon *et al.*, 2010), RAxML v.7.2.8 (Stamatakis, 2006) (modelo GTR Gamma) y Mr. Bayes v.3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) ("chain length"=1.100.000, "heat chains"=4, "burn-in length"= 100.000, "sub-sampling frequency"=200, "random seed"=26.500) con 1000 reemplazos para generar los árboles según los modelos de sustitución con mayor probabilidad para cada alineamiento.

Diseño de la sonda

Se diseñaron dos imprimadores y una sonda hidrolítica (TaqMan[®]) para detectar el aislamiento *Trichoderma* BV1 con ayuda de los programas BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) y Primer Express[®] v3.0 de Applied Biosystems[®], con base en una región del factor de elongación 1-alfa (EF1- α) de la traducción (Fig. 1). Se siguieron las recomendaciones de diseño de Applied Biosystems[®] (Anexo II). Los imprimadores y la sonda fueron fabricados por Invitrogen[™]. La sonda TrichoBV1 se diseñó con un fluoróforo reportero VIC[™]

conjugado en el extremo 5' y un ligando de unión al surco menor ("MGB") conjugado en el extremo 3' junto con un quencher o apantallador no fluorescente (Anexo III).

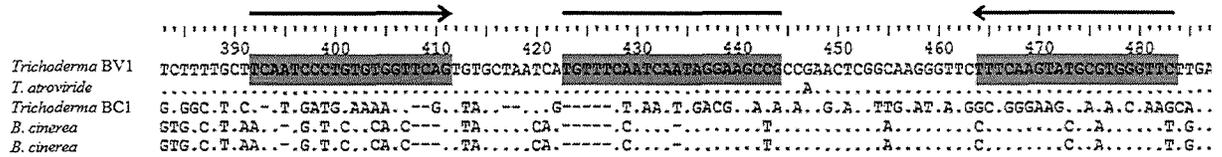


Fig.1. Alineamiento múltiple de secuencias parciales del factor de elongación 1-alfa (EF1- α) de la traducción que muestra la posición de los iniciadores TrichoBV1 F/R (flechas) y la sonda TrichoBV1 (línea) diseñados para la detección del aislamiento *Trichoderma* BV1 mediante qPCR. Sólo se muestran los nucleótidos polimórficos; (.) indica un nucleótido idéntico, (-) indica un gap o espacio en la secuencia.

qPCR y análisis de datos

Para la cuantificación de BV1 se utilizaron los imprimadores (TrichoBV1 F/TrichoBV1R) y la sonda (TrichoBV1 Probe) que se diseñaron previamente para ese aislamiento (Cuadro 1). Se evaluó la sonda y los imprimadores diseñados, con ADN extraído de los otros aislamientos de *Trichoderma*, así como con el ADN de plántulas de mora y de *B. cinerea*. Además, se evaluó una sonda diseñada por López-Mondéjar *et al.* (2010) para la especie *T. harzianum*, basada en la región ITS y otra sonda que utiliza la *Environmental Protection Agency* (EPA) de los Estados Unidos para la especie *T. atroviride*. Para la detección de *B. cinerea* se utilizó el kit de detección y cuantificación Genesig de PrimerDesign™ Ltd. Este kit incluyó imprimadores específicos que amplificaron la región IGS (espaciador intergénico) del ADN ribosomal nuclear y una sonda específica para esa región diseñada por Suárez *et al.* (2005) (Cuadro 1).

CUADRO 1. Sondas e imprimadores utilizados en qPCR.

Imprimadores y sonda	Secuencia (5'-3')	Gen blanco	Referencia
Bc2 F	TTCGTGATTATCACCTGGGTG	IGS	Suárez <i>et al.</i> 2005
Bc2 R	GCTCCTAGAACGTACGACCACA	IGS	
Bc2 Probe ¹	CTATCCTTTATCAGTTTAGCG	IGS	
ITS1 S Tharz	TACAACTCCCAAACCCAATGTGA	ITS	López-Mondéjar <i>et al.</i> 2010
ITS1 R Tharz	CCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTT	ITS	
ITS1 TM Tharz Probe ¹	AACTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGT	ITS	
Tvirif1	CCCAAACCCAATGTGAACCA	ITS	EPA USA
Tvirir1	TCCGCGAGGGGACTACAG	ITS	
TviridP1 Probe ¹	CCAAACTGTTGCCTCGGCGGG	ITS	
TrichoBV1 F	TCAATCCCTGTGTGGTTCAG	EF-1 α	Presente estudio
TrichoBV1 R	GAACCCACGCATACTGAAA	EF-1 α	
TrichoBV1 Probe ²	CGGCTTCCTATTGATTGAAACA	EF-1 α	

¹Sonda marcada con el fluorocromo FAM en el extremo 3'

²Sonda marcada con el fluorocromo VIC en el extremo 3'

Se construyeron curvas estándar de cuantificación absoluta de ADN para *Trichoderma* BV1 y *B. cinerea* BcLL basadas en el número de ciclos de la amplificación o ciclos de cuantificación (Cq). Se siguieron las recomendaciones de las casas comerciales Applied Biosystems[®] y PrimerDesign[™]. Para ello, se tomó ADN de cada hongo y se hicieron seis diluciones seriadas (1:10) que se evaluaron por triplicado cada una. La concentración de las diluciones incluyeron desde 3×10^5 hasta 3×10^0 copias del genoma haploide de *Trichoderma* BV1 y de 5×10^5 a 5×10^0 copias del genoma haploide de *B. cinerea*. Por medio del software StepOne[™] v2.3. se generó una curva estándar con las cantidades de ADN de cada serie de diluciones transformadas logarítmicamente contra los valores Cq obtenidos y se generó una ecuación de regresión lineal para cada hongo. Además se calculó la eficiencia (E) de cada reacción de PCR con la ecuación $E = [10^{(-1/\text{pendiente})} - 1] \times 100$. De seguido, se prepararon y se corrieron reacciones múltiplex con diluciones de los ADNs de los frutos de mora inoculados con BcLL y BV1 en un termociclador para PCR en tiempo real StepOne[™] (Applied Biosystems[®]). Cada mezcla de reacción de qPCR fue de 10 μ l y contuvo lo siguiente: TaqMan[®] Universal Master Mix II con UNG, Amperase[®] (ThermoScientific[™]) a una concentración 1X, los imprimadores Bc2F/Bc2R para *B. cinerea* y TrichoBV1F/TrichoBV1R para *Trichoderma* BV1 a 300 nM cada uno, la sonda Bc2P para *B. cinerea* y TrichoBV1P para *Trichoderma* BV1 a 250 nM cada una, agua libre de

nucleasas y 2.5 µl de dilución 1:20, 1:100 o 1:1000 de ADN. El perfil de temperaturas utilizado fue el siguiente: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min; 50 ciclos a 95°C por 15 s y 55°C por 1 min con captura de datos. Cada reacción de qPCR se hizo por duplicado.

Se hicieron pruebas de estandarización previas para determinar la mejor concentración de imprimadores y sondas a utilizar en las reacciones múltiplex. Se evaluaron las concentraciones de los imprimadores *forward* y *reverse* usando una matriz de optimización con concentraciones de 50, 300 y 900 nM (Anexo IV). También se evaluó la concentración de cada sonda a 100, 150 y 250 nM en diferentes ensayos, siguiendo las recomendaciones de Applied Biosystems®. Como controles positivos de qPCR se utilizó ADN de *B. cinerea* del kit Genesisg, y ADN de los aislamientos BcLL y BV1. Como controles negativos se utilizaron ADNs de plántulas de mora cultivadas *in vitro*, libres de hongos, así como reacciones de PCR a las que se les agregó agua en vez de ADN en el tubo de reacción. Posterior a las reacciones de qPCR, se hizo un análisis de correlación entre los valores Cq de la curva estándar y la cantidad de ADN de cada hongo o complejo de hongos en las muestras desconocidas.

RESULTADOS

PCR y secuenciación de ADN

Se generaron productos de PCR de aproximadamente 300 pb con los imprimadores ITS1/ITS2. Con los imprimadores ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, EF1-728M/EF-2R y Ef700f/tef1R se generaron fragmentos de 600-700 pb. Al hacer los alineamientos, se observó que cuando se limitó a que el BLAST® sólo utilizara o buscara en GenBank® secuencias depositadas de material tipo (ejemplares de especies anotadas en bases de datos taxonómicas) para comparar, la identificación de especies fue diferente a la que se obtuvo sin limitar la búsqueda (al tomar cualquier secuencia similar depositada). Los análisis del BLAST® al comparar con todas las secuencias del GenBank®, determinaron que los aislamientos BC1, J2.1 y J2.2 fueron similares a otros aislamientos identificados como *T. harzianum*. Además, J2.1 también fue similar a *T. lentiforme* y J2.2 a *T. camerunense* y *T. rifaii*. Por su parte, BV1 mostró similitud únicamente con *T. atroviride* y SM13B con *T. asperellum*. Sin embargo, cuando se hicieron los análisis del BLAST® más específicos,

comparando sólo con secuencias depositadas de material tipo se encontró similitud de BC1, J2.1 y J2.2 con todas las siguientes especies: *T. harzianum*, *T. rifaii*, *T. afarasin*, *T. camerunense*, *T. inhamatum*, *T. aggressivum*, *T. afroharzianum*, mientras que BV1 resultó similar a *T. atroviride*, *T. paratroviride*, *T. viride*, *T. scalesiae* y *T. martiale*. El aislamiento SM13B mostró similitud con la misma especie, *T. asperellum*, en ambos análisis.

Análisis filogenéticos

El programa jModelTest determinó que el mejor modelo de sustitución de nucleótidos para generar el árbol filogenético fue el HKY+I+G con el criterio AIC, HKY+I con los criterios BI, DT y el JC con el criterio ML (Anexo V). Por lo tanto, se utilizó el modelo HKY+I (-lnL = 3564.3774) para generar los árboles con los diferentes programas. Se escogió el árbol generado con el programa Mr. Bayes a partir del alineamiento generado con MAFFT porque mostró valores de reemplazo mayores (Fig. 2). En total se utilizaron 19 secuencias de la base de datos del GenBank[®] para comparar con los aislamientos de *Trichoderma* de este estudio y generar el árbol (Cuadro 2).

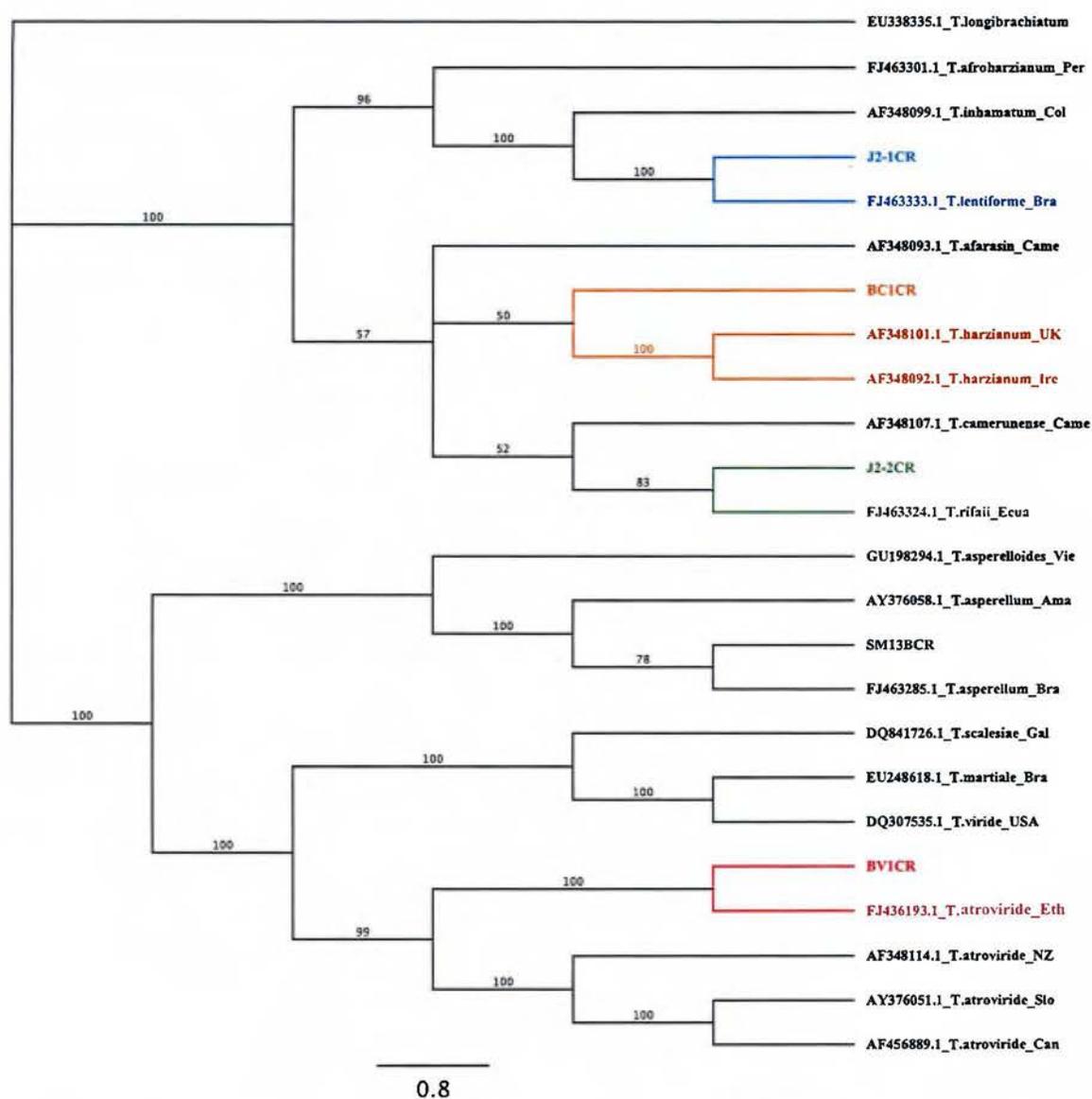


Fig. 2. Árbol filogenético generado por Mr. Bayes a partir de una región del gen EF1- α de 714 nucleótidos con 1000 reemplazos que muestra la posición de diferentes especies de *Trichoderma*. Las secuencias que se utilizaron del GenBank[®] se denotan con el número de accesión correspondiente. (Ama: Amazonas, Bra: Brasil, Can: Canadá, Came: Camerún, Col: Colombia, Ecu: Ecuador, Eth: Etiopía, Gal: Islas Galápagos, Ire: Irlanda del Norte, NZ: Nueva Zelanda, Per: Perú, Slo: Eslovenia, USA: Estados Unidos, UK: Reino Unido, Vie: Vietnam; *T. longibrachiatum*: especie utilizada como grupo externo).

CUADRO 2. Aislamientos del GenBank® que se utilizaron para los análisis filogenéticos

No. Accesion en Genbank	Especie	Origen geográfico	Hospedero/Sustrato donde se encontró	No. Youcher/Cultivo	Cultivo tipo	Referencia
EU338335.1	<i>T. longibrachiatum</i>	Canadá	Suelo	DAOM 166989	si	Chaverri & Samuels, 2013
FJ463301.1	<i>T. afroharzianum</i>	Perú	Sobre basidioma de <i>Moniliophthora roreri</i> en fruto de <i>Theobroma cacao</i>	CBS 124620=G.J.S. 04-186	si	Chaverri <i>et al.</i> , 2015
AF348099.1	<i>T. inhamatum</i>	Colombia	Suelo	CBS 273.78=IMI 287526	si	Chaverri <i>et al.</i> , 2015
FJ463333.1	<i>T. lentiforme</i>	Brasil	Endófito en tronco de <i>Theobroma cacao</i>	Dis 167e	si	Chaverri <i>et al.</i> , 2015
AF348093.1	<i>T. afarasin</i>	Camerún	Suelo	CBS 130755=IMI 393967=G.J.S. 99-227	si	Chaverri <i>et al.</i> , 2015
AF348101.1	<i>T. harzianum</i>	Reino Unido	Suelo	CBS 226.95	si	Chaverri <i>et al.</i> , 2015
AF348092.1	<i>T. harzianum</i>	Irlanda del Norte	Compost de hongo	IMI 359823	no	Chaverri <i>et al.</i> , 2015
AF348107.1	<i>T. camerunense</i>	Camerún	Suelo	CBS 137272=G.J.S. 99-230	si	Chaverri <i>et al.</i> , 2015
FJ463324.1	<i>T. rifaii</i>	Ecuador	Endófito en tronco de <i>Theobroma gileri</i>	CBS 130746= Dis 355b	si	Chaverri <i>et al.</i> , 2015
GU198294.1	<i>T. asperelloides</i>	Vietnam	Suelo de <i>Ananas comosus</i>	G.J.S. 04-111	no	Samuels <i>et al.</i> , 2010
AY376058.1	<i>T. asperellum</i>	Amazonas	Esclerocio de <i>Sclerotinia minor</i> enterrado en suelo	CBS 433.97	no (ex-tipo)	Holmes <i>et al.</i> , 2004
FJ463285.1	<i>T. asperellum</i>	Brasil	Suelo	G.J.S. 91-162	si	Chaverri & Samuels, 2013
DQ841726.1	<i>T. scalesiae</i>	Isla Galápagos	Endófito en tronco de <i>Scatesia pedunculata</i>	G.J.S. 03-74	si	Jaklitsch <i>et al.</i> , 2006
EU248618.1	<i>T. martiale</i>	Brasil	Endófito en <i>Theobroma cacao</i>	CBS 123052	si	Chaverri & Samuels, 2013
DQ307535.1	<i>T. viride</i>	Estados Unidos	Madera decorticada	G.J.S. 90-95=IMI 352470	no	Jaklitsch <i>et al.</i> , 2006
FJ436193.1	<i>T. atroviride</i>	Etiopía	Suelo de <i>Theobroma cacao</i>	PPRC S37	no	Mulaw <i>et al.</i> , 2010
AF348114.1	<i>T. atroviride</i>	Nueva Zelanda	Sauce infectado con <i>Armillaria</i>	G.J.S. 95-10	no	Samuels <i>et al.</i> , 2002
AY376051.1	<i>T. atroviride</i>	Eslovenia	Galería de escarabajo	CBS 142.95	si	Holmes <i>et al.</i> , 2004
AF456889.1	<i>T. atroviride</i>	Canadá	Compost de hongo	DAOM 222144	si	Chaverri & Samuels, 2013

CBS = CBS Fungal Biodiversity Centre culture collection, The Netherlands; DAOM = Agriculture and Agri-Food Canada National Mycological Culture Collection; G.J.S. = G. J. Samuels; Dis = H.C. Evans endophyte cultures, IMI = CABI-Bioscience, Egham, U.K.

Según el dendrograma generado por BI (Fig. 2), se observaron los siguientes agrupamientos: el aislamiento *Trichoderma* BV1 agrupó con la especie *T. atroviride* y el aislamiento *Trichoderma* SM13B con la especie *T. asperellum*. Por su parte, el aislamiento J2.1 agrupó con *T. lentiforme* y J2.2 con *T. rifaii*. El aislamiento BC1 agrupó con la especie *T. harzianum* así como con las especies *T. afarasin* y *T. camerunense*. Sin embargo, mostró bajos valores de reemplazo (<50%) con esos agrupamientos. No se encontraron especies nuevas pero al ser el primer reporte de secuencias de estos aislamientos, se registraron en GenBank®.

Diseño de la sonda, qPCR y análisis de datos

Los imprimadores y la sonda TrichoBV1 diseñados en el presente estudio permitieron la detección y cuantificación del aislamiento BV1 a partir de cultivos puros y en muestras compuestas que también presentaban *B. cinerea* (BcLL). El ADN fue cuantificable y los resultados fueron reproducibles después de todas las estandarizaciones. Todas las concentraciones de imprimadores y de sonda que se evaluaron se desempeñaron adecuadamente (Figs. 3 y 4). Se escogió la concentración de 300 nM (Fig. 3) para ambos imprimadores (*forward* y *reverse*) y la de 250 nM (Fig. 4) para cada sonda, las cuales dieron valores intermedios de Cq y desviación estándar.

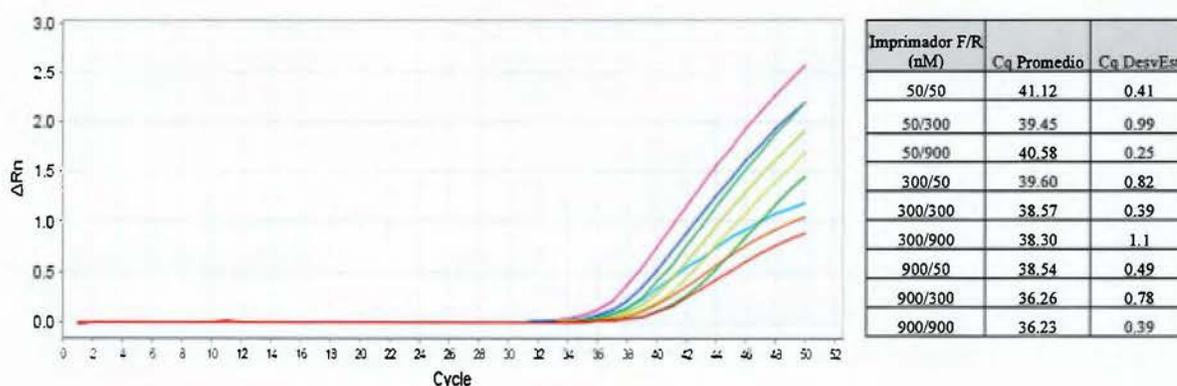


Fig. 3. Evaluación de nueve combinaciones de concentración de imprimadores, mostrando el Cq promedio de cada combinación y la desviación estándar. F: *forward*, R: *reverse*.

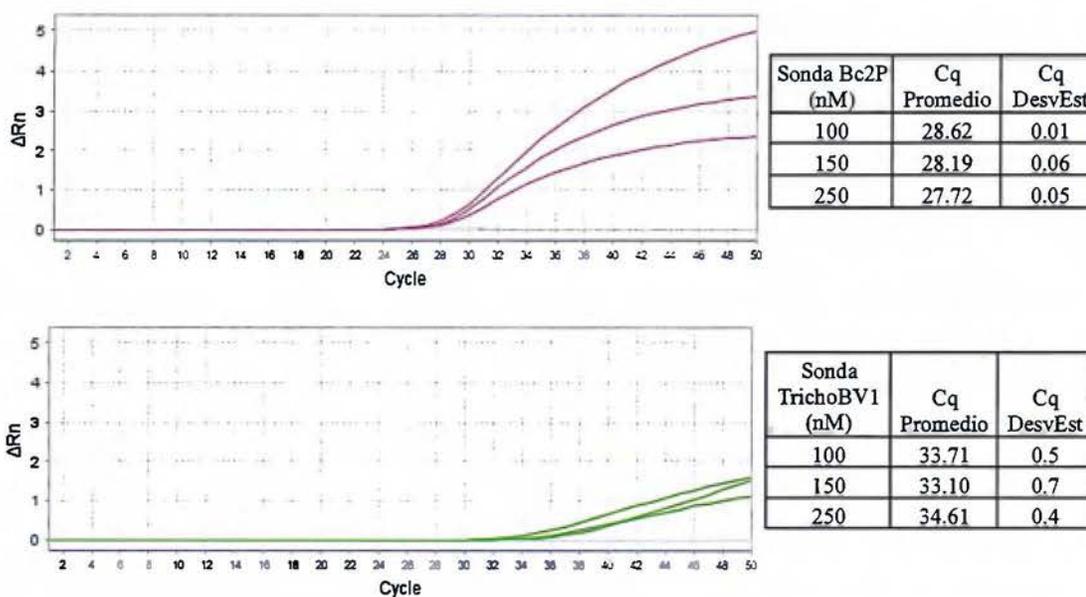


Fig. 4. Evaluación de tres concentraciones de cada sonda, mostrando el Cq promedio de cada concentración y la desviación estándar. Sonda Bc2P para *B. cinerea* y sonda TrichoBV1 diseñada para el aislamiento *Trichoderma* BV1.

La sonda TrichoBV1 y los imprimadores diseñados (TrichoBV1F/TrichoBV1R) no mostraron amplificación con el ADN genómico de plántulas de mora, *B. cinerea*, ni con los aislamientos *Trichoderma* BC1 y SM13B, pero sí mostraron curva de detección con los aislamientos J2.1 (Cq=40.14) y J2.2 (Cq=44.70) (Cuadro 3). El juego de imprimadores con sonda Bc2 (Bc2F/Bc2R/Bc2P) diseñados por Suárez y colaboradores (2005), detectaron ADN genómico del aislamiento *B. cinerea* BcLL de manera específica y sin interferir con la sonda TrichoBV1. En cuanto a la sonda diseñada por López-Mondéjar *et al.* (2010) (ITS1 STharz/ITS1 RTharz/TM TharzP) y la de la EPA (TviriF/TviriR/TviridP), éstas amplificaron con ADN de dos de los aislamientos de *Trichoderma* y con *B. cinerea* del presente estudio (Cuadro 3), a pesar de que fueron diseñadas para detectar las especies *T. harzianum* y *T. viride* respectivamente.

CUADRO 3. Aislamientos y sondas que se evaluaron.

Aislamiento	Origen	Amplificación			
		Bc2F/Bc2R & Bc2P	ITS1 S/R Tharz & TM Tharz P	TviriF1/R1 & TviriidP1 P	TrichoBuViF/R & TrichoBuVi P
<i>Trichoderma</i> BV1	Costa Rica	-	-	+(Cq=39.53)	+(Cq=31.72)
<i>Trichoderma</i> BC1	Costa Rica	-	+(Cq=21.61)	+(Cq=41.89)	-
<i>Trichoderma</i> J2.1	Costa Rica	-	No se evaluó	-	+(Cq=40.14)
<i>Trichoderma</i> J2.2	Costa Rica	-	+(Cq=30.44)	-	+(Cq=44.70)
<i>Trichoderma</i> SM13B	Costa Rica	-	No se evaluó	-	-
<i>Botrytis cinerea</i> (BcLL)	Costa Rica	+(Cq=31.07)	+(Cq=36.82)	+(Cq=44.09)	-

+ : Amplificación positiva

- : Amplificación negativa

Cq: Cq promedio

La sonda TrichoBV1 fue más eficiente cuando se trabajó con diluciones de ADN 1:1000. Cuando se utilizaron diluciones 1:20 y 1:100 de los ADNs en la mezcla de reacción de qPCR hubo inhibición parcial de la sonda, en donde se reportaron Cq tardíos, después de los 40 ciclos de reacción de qPCR o inhibición total en donde no se reportó un Cq debido a que no hubo curva de detección (Anexo VI). Esta inhibición se observó también al obtener la curva estándar de *Trichoderma* BV1, donde la dilución 1 (D1), la más concentrada (3×10^5 copias del ADN de interés), mostró los valores Cq más altos (más tarde en la reacción) en vez de mostrar los valores más bajos (Anexo VII). Por lo tanto, se tomaron los datos de la curva estándar a partir de la dilución dos (D2) (Fig. 5). En el caso de la sonda Bc2P para *B. cinerea*, no se presentó inhibición por lo que se tomaron los datos de las diluciones D1 a la D6 de la curva estándar (Fig. 6) y los datos de las diluciones 1:100 de los ADNs para los análisis. Ambas curvas estándar mostraron alta correlación entre los valores Cq y las cantidades de ADN de cada hongo ($R^2 = 1$, *B. cinerea*; $R^2 = 0.91$, *Trichoderma* BV1) y una eficiencia alta de las reacciones, 94.71% para *B. cinerea* y 98.80% para *Trichoderma* BV1. La figura 7 muestra un ejemplo de las curvas que se generaron al cuantificar *B. cinerea* BcLL y *Trichoderma* BV1 en un fruto de mora inoculado con ambos hongos.

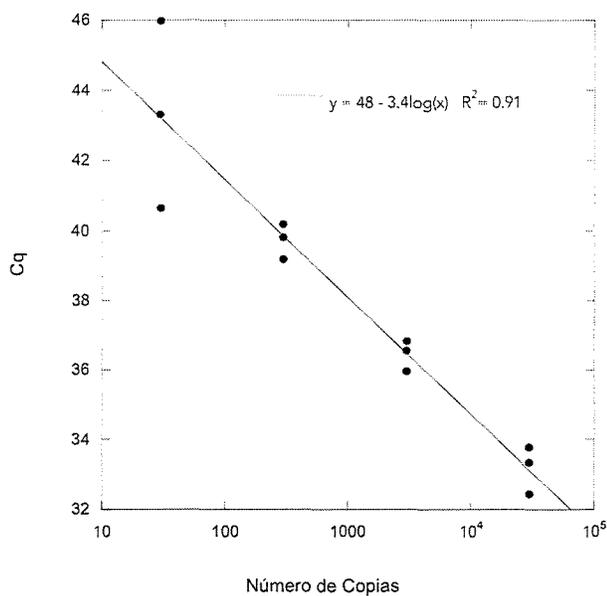


Fig. 5. Curva estándar generada por la amplificación de diluciones seriadas (1:10) de ADN genómico del aislamiento *Trichoderma* BV1. La eficiencia de la reacción fue 98.80%.

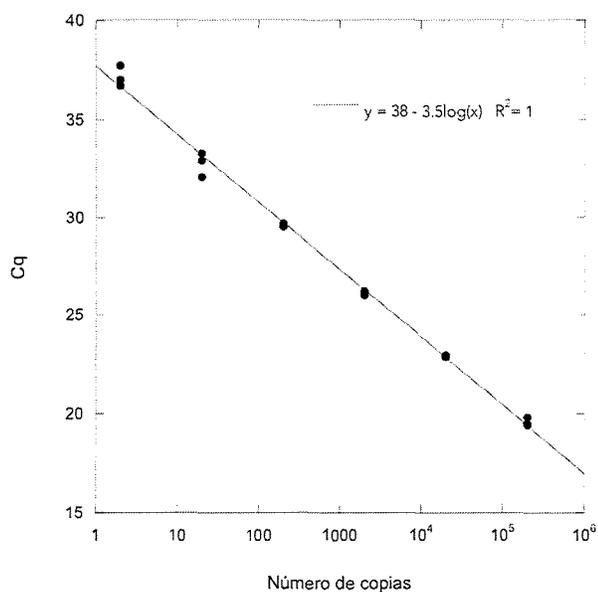


Fig. 6. Curva estándar generada por la amplificación de diluciones seriadas (1:10) de ADN genómico de *B. cinerea* BcLL. La eficiencia de la reacción fue 94.71%.

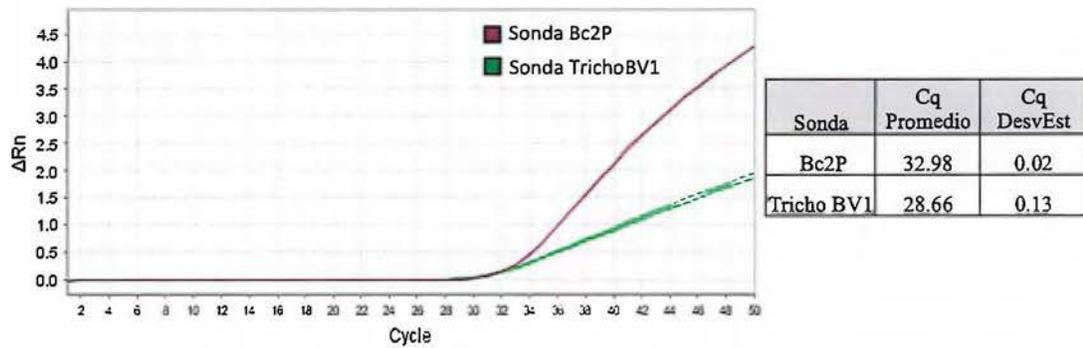


Fig. 7. Gráfico de amplificación generado con las sondas e imprimadores Bc2F/2R/2P y TrichoBV1 F/R/P a partir del ADN de un fruto de mora inoculado con *B. cinerea* BcLL y *Trichoderma* BV1 y evaluado por duplicado.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los análisis de datos de Chaverri *et al.* (2003), a partir de secuencias de ADN de cuatro genes (región ITS, EF1- α , calmodulina y α -actina) en la especie *T. harzianum* se demostró que cada una de esas regiones del genoma tiene diferente porcentaje de caracteres informativos (1.5, 20.9, 14.8 y 5.8%, respectivamente). No obstante, la secuenciación de las regiones entre los ITSs de los genes ribosomales de *Trichoderma* spp. aún se utiliza de rutina como un análisis de identificación preliminar (Gazis *et al.*, 2011; Chaverri *et al.*, 2015; Vidaurre-Montoya *et al.*, 2016). Por consiguiente, en el presente estudio también se secuenciaron esas regiones como un análisis previo. No obstante, se tomaron las secuencias correspondientes al factor de elongación de todos los aislamientos de *Trichoderma* para los análisis filogenéticos y para el diseño de la sonda. Esas secuencias se depositaron en GenBank® y a partir de ellas se generó el dendrograma. Aunque no se logró identificar de manera precisa uno de los aislamientos, *Trichoderma* BC1, esto no afectó el diseño de los imprimadores y la sonda para el aislamiento *Trichoderma* BV1 (*T. atroviride*) ni su desempeño. Cuando se trabaja con secuencias de ADN y en particular de *Trichoderma*, en ocasiones no se logra la identificación correcta de alguna especie y esto se debe a que en GenBank® existen muchas secuencias depositadas que han sido mal identificadas (Samuels, 2006; Federhen, 2015). De acuerdo con Federhen (2015), “las secuencias reportadas en GenBank® se han identificado con diferentes grados

de certeza. Algunas se han tomado de especímenes o cultivos que pueden ser identificados de forma independiente por un especialista y algunos de estos vienen con identificación a nivel de especie (nombre formal). Otros poseen nombres informales que vienen de diferentes fuentes. Las especies que tienen un nombre formal en el código de nomenclatura apropiado están indexadas en *Taxonomy Entrez* con la propiedad especificada (a quién pertenece). Las secuencias de especímenes que no se han identificado a nivel de especie están anotadas con un nombre informal y de diferentes formas. Estas representan el 66% de los nombres en *Taxonomy* y el 20% de las entradas en Genbank[®]. Por su parte, muchas de las especies nuevas que se describen son “especies crípticas” (morfológicamente no se diferencian). No son especies que se reconocen con facilidad como nuevas sino especies existentes que resultan ser un complejo de especies cuando se observan más de cerca (a nivel de secuencia).”

Para el género *Botrytis*, las regiones ITS también poseen pocas diferencias en las secuencias de nucleótidos entre las diferentes especies y por lo tanto los imprimadores desarrollados para la detección de este patógeno se han diseñado para otras regiones del genoma. La región IGS entre los genes ribosomales evoluciona más rápido que las regiones ITS y presenta más polimorfismos en la secuencia por lo que permite discriminar entre especies más cercanas (Pantou, Mavridou & Typas, 2003; Suárez *et al.*, 2005; Sanzani, Schena, de Cicco & Ippolito, 2012). Es por ello que Suárez y colaboradores (2005) diseñaron una de las sondas de qPCR con base en esta región y lograron que fuera específica para *B. cinerea*. Esta sonda fue la que se utilizó con éxito en la presente investigación para detectar *B. cinerea* BcLL a partir de una matriz biológica, y la que han utilizado otros investigadores para hacer estudios de qPCR con este patógeno (Celik *et al.*, 2009; Diguta *et al.*, 2010; Sanzani *et al.*, 2012).

En el caso del género *Trichoderma*, se han desarrollado sondas genéricas así como sondas dirigidas a la detección y cuantificación de una especie o aislamiento en particular con el fin de monitorear y cuantificar sus poblaciones (Rubio *et al.*, 2005; Hagn *et al.*, 2007; Savazzini *et al.*, 2008; López-Mondéjar *et al.*, 2010). En todos estos estudios se demostró la efectividad y rapidez de la técnica de qPCR y su aplicabilidad a programas de detección y monitoreo de hongos. Sin embargo, debido a que las sondas se diseñaron con base en regiones del genoma con poca diferenciación interespecífica, como lo es la región ITS, no se obtuvo alta especificidad y por ello esas sondas amplificaron también con *B.*

cinerea BcLL y varios de los aislamientos de *Trichoderma* como BC1 y J2.2 en el caso de la sonda de López-Mondéjar *et al.* (2010) (Cuadro 3) y BV1, BC1 en el caso de la sonda de la EPA (USA), que no eran *T. harzianum* ni *T. viride*. En cuanto a la sonda que se diseñó en esta investigación (TrichoBV1), ésta también amplificó con los aislamientos J2.1 y J2.2 que mostraron alto porcentaje de similitud con las especies *T. lentiforme* y *T. rifaii* respectivamente. Esto quiere decir que la sonda funciona tanto para esas dos especies como para *T. atroviride* BV1 para la cual fue diseñada. Esto no afectó su desempeño ni la obtención de datos debido a que los frutos de mora fueron inoculados con el aislamiento BV1.

Applied Biosystems® (2010) recomienda hacer pruebas de estandarización cuando se trabaja con varias sondas al mismo tiempo en una reacción duplex o múltiplex. Esto debido a que uno de los genes blanco puede estar presente en mayor cantidad que el otro, como es el caso de la región IGS en comparación con el EF1- α , y esto puede provocar que la amplificación de una especie domine sobre la otra y se inhiba la detección. Para evitar que esto ocurra, Applied Biosystems® recomienda limitar las concentraciones de los imprimadores que se utilizan para amplificar la especie más abundante, de manera que la amplificación se “desactive” poco después de establecer el Cq. La limitación del imprimador hace que los componentes de la reacción comunes a ambos ensayos no se agoten, lo que permite que la amplificación de la especie menos abundante también se realice con eficiencia. Esto produce valores altos de ΔRn que indican que el ensayo fue robusto y eficiente (Applied Biosystems® 2010), lo que se deriva en una buena generación de producto y permite medir con precisión el ADN blanco, como ocurrió en los ensayos de cuantificación simultánea de *B. cinerea* y *Trichoderma*.

La inhibición que se presentó con la sonda diseñada en esta investigación se debió a la alta concentración del ADN de *Trichoderma* BV1 presente en las muestras y no a la concentración de los imprimadores o la sonda en la reacción de acuerdo con lo observado en los ensayos de estandarización. Tampoco se debió a competencia entre la sonda de *B. cinerea* y la de *T. atroviride* porque el efecto se observó tanto en reacciones múltiplex como en reacciones individuales con cada sonda por separado (singlex). De acuerdo con Keer (2008), en algunos experimentos puede ocurrir una disminución en la señal de fluorescencia luego de la fase exponencial. A esto se le conoce como “efecto gancho” por

la forma de la curva que se genera (Anexo IX). Esto se da por la hibridación competitiva que ocurre entre las hebras simple banda del producto de PCR y la sonda. A baja concentración de producto, la sonda compete de forma eficiente por la hibridación y por lo tanto fluoresce. Sin embargo, cuando la cantidad de producto de PCR es alta, las dos hebras simple banda del producto de PCR se unen entre ellas más rápido que la sonda a su secuencia blanco o sitio de unión de modo que disminuye la cantidad de fluorescencia emitida. Según Keer (2008), este descenso en la fluorescencia no afecta la eficiencia o la especificidad de la amplificación o la detección del ADN blanco y se puede reducir este efecto optimizando la concentración de ADN en la reacción o disminuyendo la cantidad de ciclos de amplificación. En el caso de *Trichoderma* BV1, se observó una detección tardía de dicho hongo con curvas con Cqs altos o en ocasiones no hubo detección del hongo (falsos negativos en frutos cubiertos por completo con este hongo) cuando se utilizaron reacciones de qPCR con los ADNs más concentrados (diluciones 1:20 y 1:100). Al optimizar la concentración de ADN en la reacción con diluciones 1:1000 se pudo detectar y cuantificar con éxito *Trichoderma* BV1 presente en las muestras.

La caracterización e identificación de aislamientos de hongos y otros organismos a nivel de especie es esencial para su estudio y utilización, y el uso de controladores biológicos requiere que existan métodos para monitorear su presencia o ausencia en el ambiente donde se aplican. Tradicionalmente se han utilizado técnicas de cultivo en el laboratorio mediante medios selectivos e identificación morfológica y morfométrica. Sin embargo este método requiere de tiempo, no siempre permite distinguir entre especies con morfología muy similar, como en el caso de *Trichoderma*, y no permite hacer análisis cuantitativos ni análisis directos en tejidos. El PCR en tiempo real utilizando imprimadores y una sonda específica es un método efectivo para monitorear y cuantificar la cantidad de ADN de un organismo de interés presente en una muestra y por lo tanto es una técnica útil cuando se trabaja con controladores biológicos. Los ensayos de qPCR realizados en esta investigación mostraron ser rápidos, selectivos, consistentes y sensibles. Se logró trabajar con muestras de ADN compuestas (varios ADNs) lo que lo hace una herramienta útil para el estudio de estos y otros hongos que crecen sobre o dentro de tejidos. Se propone el uso de la sonda TrichoBV1P junto con los imprimadores diseñados en este estudio (TrichoBV1F/TrichoBV1R) para utilizar en el futuro en programas de combate biológico y evaluaciones en campo con el aislamiento *Trichoderma* BV1 o con los aislamientos

Trichoderma J2.1 y J2.2 con los que también mostraron amplificación. Adicional a lo que se ha hecho en otros estudios, la presente investigación aporta una sonda más específica porque se basa en una región del genoma que es más informativa para la diferenciación de especies de *Trichoderma* (Chaverri *et al.*, 2003). Además, este estudio permitió estandarizar una metodología múltiplex para evaluar la acción de *Trichoderma* BV1 como antagonista de *B. cinerea* sobre frutos de mora.

CAPÍTULO II

(En formato de artículo científico para ser sometido)

Monitoreo de la actividad antagónica de *Trichoderma* sp. como controlador biológico de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. en frutos de mora (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) mediante qPCR

Resumen

Botrytis cinerea es un fitopatógeno de importancia agrícola, ampliamente estudiado, que produce la enfermedad conocida como moho gris. Se ha identificado dicho hongo en más de 200 especies de plantas sin ninguna aparente especificidad de hospedero y ocasiona serias pérdidas económicas. Debido a la necesidad de encontrar agentes biocontroladores que contribuyan a resolver dicha problemática, se han evaluado algunas especies del género *Trichoderma* como controladores biológicos contra un amplio espectro de hongos fitopatógenos incluyendo a *B. cinerea*. En Costa Rica se han aislado cepas de *Trichoderma* asociadas a frutos de mora (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) cultivada y han mostrado resultados promisorios contra el moho gris. En la actualidad existen métodos sensibles y seguros basados en el análisis de ADN que permiten detectar y cuantificar hongos en tejido vegetal y por lo tanto monitorear su comportamiento desde el establecimiento hasta su desarrollo o infección. La técnica de PCR en tiempo real (qPCR) es una herramienta útil para detectar y monitorear la prevalencia de hongos, tanto fitopatógenos como antagonistas aún cuando no haya síntomas de su presencia en su hospedero o tejido infectado. Por lo tanto, la presente investigación tenía como objetivo evaluar la interacción de *Trichoderma* sp. como controlador biológico del moho gris, mediante qPCR, en frutos de mora inoculados de forma artificial con *B. cinerea*. Para ello se monitoreó y cuantificó el crecimiento y avance de ambos hongos en el tiempo. La reacción de qPCR se basó en la detección simultánea de ambos hongos por medio de una sonda diseñada para detectar una secuencia de la región IGS y otra sonda para el factor de elongación 1-alfa (EF1- α) de la traducción. Los análisis mediante qPCR permitieron evaluar el crecimiento del aislamiento *Trichoderma* BV1 y *B. cinerea*, y demostraron que BV1 logró controlar el crecimiento del

patógeno en los frutos de mora. Este tipo de análisis podrían ser implementados para el monitoreo de estos hongos en un programa de control biológico.

Palabras clave: *Rubus adenotrichos*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma* sp., qPCR, hongos fitopatógenos, control biológico.

INTRODUCCIÓN

La mora (*Rubus adenotrichos* Schldtl.) es un cultivo no tradicional de importancia económica y fuente rica en polifenoles. La mayoría de los compuestos polifenólicos presentes en sus frutos son taninos elágicos y antocianinas, los cuales tienen importantes actividades biológicas como acción antimutagénica, antiviral, anticancerígena, antitumoral, quimioprotectora y antioxidante (Soto, Pérez & Acosta, 2010). En Costa Rica se produce mora de forma convencional y orgánica. Por parte de los agricultores ha crecido el interés de producirla de manera orgánica ya que existe una mayor demanda de productos orgánicos y mejores precios para estos productos, preferidos por consumidores que buscan alimentos libres de pesticidas sintéticos y de mayor calidad. Sin embargo, el manejo orgánico ha obligado a los productores de mora a introducir nuevas prácticas agrícolas con el objetivo de combatir los problemas fitosanitarios que presenta este cultivo (R. Orozco-Rodríguez, comunicación personal, 30 de Agosto, 2012).

El cultivo de la mora es atacado principalmente por *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (= *Botryotinia fuckeliana*), un hongo fitopatógeno que causa la enfermedad conocida como moho gris o pudrición del fruto (Jennings, 1988; Castro & Cerdas, 2005). Esta es una de las enfermedades más comunes y de mayor importancia económica en el género *Rubus* y otras especies frutales en el ámbito mundial (Dean *et al.* 2012; Molina, de la Rotta & Torres, 2004; Elad *et al.*, 2007). *B. cinerea* representa un problema tanto en campo como en poscosecha debido a que puede permanecer latente por largos períodos y por su alto potencial destructivo, particularmente en zonas de clima muy húmedo (Benito *et al.*, 2000; Betanzo, 2005). Para su combate se han empleado diferentes fungicidas químicos. No obstante, esta práctica no es cien por ciento efectiva y provoca que se desarrollen razas con

tolerancia a los agroquímicos, debido a la plasticidad genética de este hongo (Leroux, 2007).

El combate biológico es una herramienta que permite aumentar la producción de los cultivos por medio de la supresión o destrucción de inóculos de patógenos, protege las plantas contra infecciones o aumenta la tolerancia de las plantas para resistir el ataque de agentes infecciosos (Cook, 1993). Los hongos antagonistas resultan importantes para el combate biológico de los fitopatógenos. En este sentido, las especies del género *Trichoderma* se destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de hongos causantes de enfermedades (Bell *et al.*, 1982; Labudova & Gogorova, 1988; Infante *et al.*, 2009; Ha, 2010; Kumar, Amaresan, Bhagat, Madhuri & Srivastava, 2012). Entre los modos de acción de *Trichoderma* spp. se encuentra el micoparasitismo contra hongos fitopatógenos mediante la secreción de enzimas hidrolíticas y compuestos antibióticos, la competencia por espacio y nutrientes con otros microorganismos, la estimulación del crecimiento de las plantas y la inducción de mecanismos de resistencia a las plantas en presencia de estrés biótico y abiótico (Harman *et al.*, 2004; Ha, 2010; Kowalska, 2011; Sharma *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012; Mukherjee, Horwitz & Kenerley, 2012; Dubey *et al.*, 2013). Se han evaluado varias especies de este género como controladores biológicos contra un amplio espectro de hongos fitopatógenos que incluye a *B. cinerea* (Molina-Mercader *et al.*, 2006; Elad & Stewart, 2007; Martínez & Moreno, 2008; Moraga-Suazo *et al.*, 2011; Calvo-Araya *et al.*, 2012; Marín-Chacón *et al.*, 2017). Para el caso de la mora en Costa Rica, se han realizado pruebas de antagonismo con varios aislamientos de *Trichoderma* contra *B. cinerea* tanto en el laboratorio como en campo (Castillo-Jiménez, 2011; Calvo-Araya *et al.*, 2012, Marín-Chacón *et al.*, 2017).

Para detectar y monitorear la prevalencia de hongos, tanto fitopatógenos como antagonistas, existen diferentes técnicas moleculares basadas en el análisis de ADN. Dentro de ellas se encuentra la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) que permite hacer análisis cuantitativos para dar seguimiento al progreso de los hongos desde su establecimiento o infección hasta la expresión de síntomas por parte de sus hospederos. El monitorear la actividad de los hongos en el hospedero mediante esta técnica permite estudiar la eficacia en el establecimiento y la efectividad de un antagonista en combatir a un determinado patógeno. El objetivo de la presente investigación fue evaluar mediante qPCR el progreso y la actividad antagonista del hongo *Trichoderma* sp. como controlador biológico del moho

gris (causado por *B. cinerea* Pers.:Fr), en frutos de mora inoculados de forma artificial. Contar con este método de detección permitiría evaluar directamente en fruto el establecimiento de *Trichoderma* e implementar la técnica en programas de combate biológico aún con plantas asintomáticas o tejidos que no muestren la presencia de estos dos hongos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

Se recolectaron frutos de mora de la variedad Vino espina roja (*Rubus adenotrichos*) con visibles síntomas de infección por *B. cinerea* de una finca productora de mora (*Rubus* spp.) ubicada en La Luchita del Guarco de Cartago (N 09°44'39.9" W083°56'15.7") para hacer aislamientos directos del patógeno. Para ensayos posteriores de qPCR se recolectaron manualmente alrededor de 500 frutos rojos (estado intermedio de madurez) en apariencia sanos de una finca productora de mora ubicada en La Trinidad de Copey de Dota de San José (N 09°39'58.7" W083°53'32.1"). El material recolectado se colocó en bolsas plásticas dentro de una hielera y se trasladó a los laboratorios de Fitopatología y de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA) de la Universidad Nacional (UNA) para su procesamiento.

Identificación, cultivo y purificación de hongos

Para el cultivo de *B. cinerea* se hizo identificación visual y aislamiento directo del hongo (BcLL) a partir de los frutos de mora infectados provenientes del campo y se cultivó en placas petri estériles con PDA (papa-dextrosa-agar) y ácido láctico al 25% (French & Hebert, 1980). Se incubaron las placas petri con *B. cinerea* a temperatura ambiente (25°C) y se observó su crecimiento por al menos tres días. Luego se purificó y se multiplicó el hongo en medio de cultivo fresco. Para ello se tomó una porción de micelio y se cultivó de nuevo en placas estériles con PDA y ácido láctico al 25%. Se incubaron las placas con el hongo a temperatura ambiente durante ocho días o hasta que colonizara por completo el

medio. Se hicieron cultivos monospóricos a partir de estos cultivos de *B. cinerea* de acuerdo con la metodología de French y Hebert (1980).

Para el cultivo del hongo antagonista *Trichoderma* sp., se tomaron dos aislamientos de la micoteca del Laboratorio de Fitopatología de la ECA. Estos correspondieron a aislamientos del género *Trichoderma* provenientes de dos zonas productoras de mora, los cuales se encontraron asociados al cultivo (Calvo-Araya *et al.*, 2012; Marín-Chacón *et al.*, 2017). Se reactivaron los aislamientos *Trichoderma* BV1 de Buena Vista de Pérez Zeledón (N 09°30'15.3" W083°39'28.4") y BC1 de Bajo Canet de Tarrazú (N 09°42'01.3" W083°59'49.0"), obtenidos por Calvo-Araya *et al.* (2012) y Marín-Chacón *et al.* (2017) respectivamente. Estos aislamientos mostraron su antagonismo hacia *B. cinerea* en ensayos previos en platos petri así como sobre frutos de mora en el laboratorio y en el campo (Castillo-Jiménez, 2011; Calvo-Araya *et al.*, 2012; Marín-Chacón *et al.*, 2017). Se reactivaron y se cultivaron siguiendo la misma metodología empleada para *B. cinerea* hasta obtener cultivos monospóricos. Se hicieron suspensiones de conidios a partir de los cultivos monospóricos de *B. cinerea* y *Trichoderma* spp. para utilizarlas en inoculaciones.

Inoculación patógeno-antagonista en frutos

Se realizó un ensayo preliminar de inoculación de frutos para determinar con cuál de los dos aislamientos de *Trichoderma* hacer las evaluaciones posteriores y se escogió el aislamiento *Trichoderma* BV1 por ser más eficiente que BC1 contra *B. cinerea* en el laboratorio y en campo (Marín-Chacón *et al.*, 2017). Para las inoculaciones se tomaron 250 frutos rojos de mora en apariencia sanos y se sometieron a una secuencia de desinfección superficial sumergiéndolos en etanol al 75% durante 30 segundos, hipoclorito de sodio al 0.5% durante un minuto y por último en agua destilada estéril. Luego se colocó cada fruto dentro de una placa petri estéril con agar-agua y se inoculó con 20 μ l de suspensión de conidios de *B. cinerea* o *Trichoderma* BV1 a una concentración de 1×10^6 conidios/ml de manera superficial con ayuda de una micropipeta. Se cuantificó la concentración de conidios con ayuda de una cámara de Neubauer, según la metodología propuesta por French y Hebert (1980). Se trabajó con cinco tratamientos de inoculación: (i) frutos con *B. cinerea* BcLL, (ii) frutos con *B. cinerea* BcLL y *Trichoderma* BV1, (iii) frutos con *Trichoderma* BV1, (iv) frutos con *Trichoderma* BV1 y *B. cinerea* BcLL, (v) frutos sin

inocular (controles). Se inocularon 50 frutos por cada tratamiento. Para los tratamientos ii y iv se inoculó cada hongo del tratamiento con tres horas de diferencia entre la primera y la segunda inoculación. Los frutos se incubaron a temperatura ambiente durante diez días para evaluar el crecimiento y antagonismo entre los hongos. Se tomaron submuestras de cada tratamiento para monitorear y cuantificar por medio de qPCR el desarrollo de cada hongo y del complejo patógeno-antagonista sobre los frutos de mora a los días 0, 3, 5, 7 y 10 después de la inoculación inicial. Se tomaron diez frutos de cada tratamiento por día (total= 50 frutos por día). Estas submuestras se colocaron en tubos plásticos de 15 ml y se conservaron en congelación a -20°C para su posterior extracción de ADN y análisis.

Extracción de ADN

Se extrajo el ADN genómico total de los frutos con el protocolo de extracción de Castle *et al.* (1998) con algunas modificaciones realizadas por Hoyos *et al.* (2008). Cada fruto de mora congelado se maceró de forma manual con ayuda de un mortero y pistilo de porcelana. Además, se extrajo ADN de los aislamientos *B. cinerea* BcLL y *Trichoderma* BV1. Para ello se utilizaron dos placas petri con cultivo monospórico de cada hongo y se rasparon para recolectar el micelio y los conidios. Se colocó el tejido en tubos de 1.5 ml y se extrajo el ADN genómico total siguiendo el protocolo de Hoyos *et al.* (2008) modificado para trabajar con volúmenes pequeños (Anexo I). Se cuantificó la calidad y cantidad de los ADNs extraídos mediante electroforesis en geles de agarosa TopVision™ (ThermoScientific™) al 0.8% teñido con GelRed™ (Biotium Inc.) a 1X y espectrofotometría de luz UV (NanoDrop™2000, ThermoScientific™). Se utilizaron columnas “DNeasy Mini spin” del DNeasy Plant Mini kit® de QIAGEN® para limpiar ADNs que presentaron impurezas.

qPCR

Inicialmente se construyeron curvas estándar de cuantificación absoluta de ADN para *B. cinerea* BcLL y *Trichoderma* BV1, basadas en el número de ciclos de la amplificación o ciclos de cuantificación (Cq). Se siguieron las recomendaciones de Applied Biosystems® y PrimerDesign™. Se tomó ADN de cada hongo y se hicieron seis diluciones seriadas (1:10)

que se evaluaron por triplicado cada una. La concentración de las diluciones incluyeron desde 3×10^5 hasta 3×10^0 copias del genoma haploide de *Trichoderma* BV1 que mostró ser *T. atroviride* en análisis previos (Hilje-Rodríguez *et al.*, en progreso) y de 5×10^5 a 5×10^0 copias en el caso de *B. cinerea*. Por medio del software StepOne™ v2.3 se generó una curva estándar con las cantidades de ADN de cada serie de diluciones transformadas logarítmicamente contra los valores C_q obtenidos y se generó una ecuación de regresión lineal para cada hongo. Además se calculó la eficiencia (E) de cada reacción de PCR con la ecuación $E = [10^{(-1/\text{pendiente})} - 1] \times 100$. Posteriormente se prepararon reacciones múltiplex con diluciones de los ADNs extraídos a partir de los 250 frutos de mora de los cinco tratamientos. En el caso de *B. cinerea*, se utilizó el kit de detección y cuantificación Genesis de PrimerDesign™ Ltd. Este kit amplificó la región IGS (espaciador intergénico) del ADN ribosomal nuclear (Suárez *et al.* 2005). En el caso de *Trichoderma* BV1, se utilizaron dos imprimadores y una sonda que se diseñaron previamente para ese aislamiento, que amplifica una región del factor de elongación 1-alfa (EF1- α) de la traducción (Hilje-Rodríguez *et al.*, en progreso). Cada mezcla de reacción de qPCR fue de 10 μ l e incluyó lo siguiente: TaqMan® Universal Master Mix II con UNG Amperase® (ThermoScientific™) a una concentración de 1X, los imprimadores Bc2F (5'-TTCGTGATTATCACCTGGGTTG-3') y Bc2R (5'-GCTCCTAGAACGTACGACCAC-3') (Suárez *et al.* 2005) para *B. cinerea* BcLL, TrichoBV1 F (5'-TCAATCCCTGTGTGGTTCAG-3') y TrichoBV1 R (5'-GAACCCACGCATACTTGAAA-3') (Hilje-Rodríguez *et al.*, en progreso) para *Trichoderma* BV1 a 300 nM cada uno, las sondas Bc2P (5'-CTATCCTTTATCAGTTTAGCG-3') (Suárez *et al.* 2005) y TrichoBV1 P (5'-CGGCTTCTATTGATTGAAACA-3') (Hilje-Rodríguez *et al.*, en progreso) para *B. cinerea* BcLL y BV1, respectivamente, a 250 nM cada una, y 2.5 μ l de dilución 1:100 y 1:1000 de ADN. Las reacciones se evaluaron por duplicado en un termociclador StepOne™ (Applied Biosystems®) utilizando el siguiente perfil térmico: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, y 50 ciclos a 95°C por 15 s y 55°C por 1 min con lectura de datos. Se utilizó ADN de *B. cinerea* del kit Genesis, ADN del aislamiento *B. cinerea* BcLL y *Trichoderma* BV1 como controles positivos de las reacciones de qPCR. Se utilizaron ADNs de plántulas de mora cultivadas *in vitro*, libres de hongos, y agua ultrapura en vez de ADN como controles

negativos de las reacciones. Para obtener la cantidad de ADN de cada hongo de interés presente en cada muestra, se tomaron los valores Cq de cada una y se interpolaron con los valores Cq de la curva estándar diseñada para cada hongo.

Análisis estadístico

Se hizo un análisis de correlación entre los valores Cq y la cantidad de ADN de cada hongo o complejo de hongos analizados en este estudio. Los datos no presentaron una distribución normal ni homogeneidad de varianzas según una prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) y una prueba de Bartlett (Shanks & Hutton, 1986) con los datos de *B. cinerea* BcLL ($p=0.01217$) ni con los de *Trichoderma* BV1 ($p=0.0305$). Por lo tanto, se hizo una prueba de Scheirer-Ray-Hare (Scheirer, Ray & Hare, 1976) para las muestras analizadas con la sonda de *B. cinerea* y por aparte para las muestras analizadas con la sonda de *Trichoderma* BV1 con el programa R v3.3.1 (R Core Team, 2016).

RESULTADOS

qPCR y análisis estadístico

Los análisis de qPCR permitieron cuantificar la presencia del hongo patógeno y su antagonista en los frutos de mora aún cuando estos no mostraban síntomas de infección por parte de *B. cinerea* BcLL o la presencia de *Trichoderma* BV1. Se logró detectar y cuantificar cada hongo por separado así como el complejo patógeno-antagonista en las reacciones múltiplex. El ADN fue cuantificable y los resultados fueron reproducibles. El límite inferior de detección estimado fue de 0.0055 copias del genoma haploide de *B. cinerea* y 1.3092 copias del de *T. atroviride* BV1 con la sonda correspondiente. Las figuras 1 y 2 muestran la curva estándar que se generó para cada hongo. En el caso de *B. cinerea* BcLL (Fig. 1), se pudieron cuantificar todas las diluciones. En el caso de *Trichoderma* BV1 (Fig. 2), hubo inhibición de la sonda a altas concentraciones de ADN (D1) (Anexo VII). Por lo tanto, se tomaron los datos de la curva estándar a partir de la dilución dos (D2).

Ambas curvas estándar mostraron alta correlación entre los valores Cq y las cantidades de ADN de cada hongo ($R^2=1$, *B. cinerea* BcLL; $R^2=0.91$, *Trichoderma* BV1) y una eficiencia alta de las reacciones, 94.71% para BcLL y 98.80% para BV1 (Figs. 1 y 2).

La prueba de Scheirer-Ray mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.001$), entre días ($p<0.001$) y entre tratamientos por día ($p<0.001$) para el caso de *Trichoderma* BV1. Para el caso de *B. cinerea*, sólo se encontraron diferencias significativas entre días ($p<0.05$) y entre tratamientos por día ($p<0.01$) (Anexo X).

La figura 3 muestra los datos que se generaron con la sonda TrichoBV1. Algunos de los frutos inoculados solo con *B. cinerea* (BcLL) y algunos frutos del tratamiento control presentaron *Trichoderma* BV1. La cantidad de BV1 que se detectó en todos los tratamientos fue en aumento a partir del día de la inoculación (Día 0), pero en el caso de los tratamientos BcLL y el control, tratamientos donde no fue inoculado BV1, a partir del día tres disminuyó la cantidad de *Trichoderma* que se detectó. Los dos tratamientos con el complejo patógeno-antagonista (BcLL+BV1 y BV1+BcLL) tuvieron un comportamiento similar entre ellos, en donde la cantidad de *Trichoderma* que se detectó con la sonda Tricho BV1 fue en aumento con los días. Este hongo disminuyó un poco a partir del día cinco pero siempre se mantuvo presente hasta el día diez. Cuando se inoculó *Trichoderma* solo (BV1), el crecimiento del hongo no se vio afectado o disminuido por la presencia de *B. cinerea* y creció en forma exponencial hasta el día diez (Fig 3A).

La figura 4 muestra la distribución de los datos que se generaron con la sonda Bc2P. Algunos de los frutos inoculados solo con *Trichoderma* (BV1) y algunos de los frutos del tratamiento control presentaron *B. cinerea*. Los dos tratamientos con el complejo patógeno-antagonista (BcLL+BV1 y BV1+BcLL) tuvieron un comportamiento similar entre ellos y la cantidad de *B. cinerea* que se detectó con esta sonda fue mayor el día tres pero a partir de ese día fue decreciendo en el tiempo hasta llegar a cero. Además, en estos dos tratamientos, la cantidad de *B. cinerea* disminuyó días antes en comparación con el tratamiento donde se inoculó solo (BcLL) (Fig. 4A). Esto se le atribuye a la presencia de *Trichoderma* BV1 que fue inoculado. El tratamiento de solo *B. cinerea* (BcLL) no mostró un crecimiento exponencial de acuerdo a la sonda Bc2P (Fig. 4A) como sí ocurrió con *Trichoderma* cuando se inoculó solo (BV1), según los análisis de la sonda TrichoBV1 (Fig. 3A). En ese tratamiento BcLL, de acuerdo con la sonda Bc2P (Fig. 4A), la cantidad de *B. cinerea* que se detectó tuvo su punto máximo el día cinco y a partir de ahí disminuyó. Por su parte, en el

tratamiento BV1 se observó que a pesar de que algunos frutos mostraron la presencia de *B. cinerea* sin ser inoculado, la cantidad que se detectó fue cercana a cero y no tuvo un crecimiento exponencial por la presencia de su antagonista BV1 que sí había sido inoculado.

Los datos generados con ambas sondas mostraron que el aislamiento *T. atroviride* BV1 logró controlar el crecimiento de *B. cinerea* BcLL en los frutos de mora y por lo tanto disminuyó la cantidad de ADN del patógeno que se detectó con el pasar de los días. Se observó la disminución del patógeno y el aumento del antagonista en el tiempo (Figs. 3A y 4A).

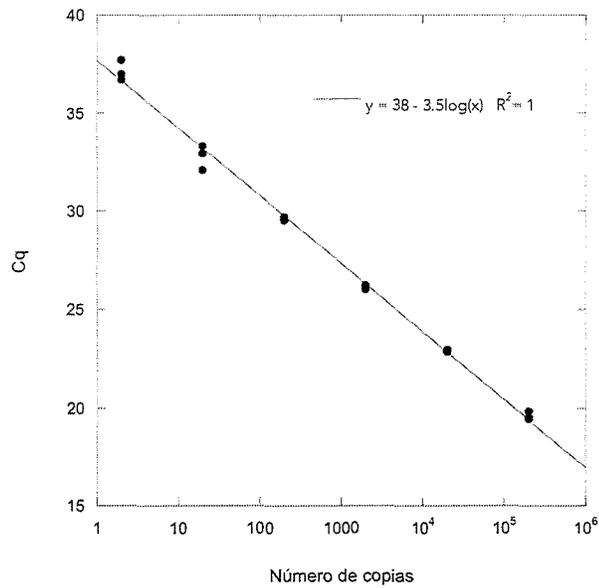


Fig. 1. Curva estándar generada por la amplificación de diluciones seriadas 1:10 de ADN genómico de *B. cinerea* BcLL. La eficiencia de la reacción fue 94.71%.

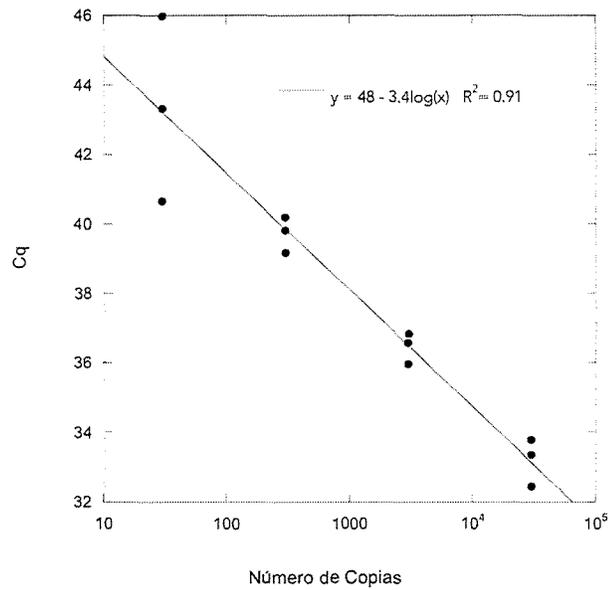


Fig. 2. Curva estándar generada por la amplificación de diluciones seriadas 1:10 de ADN genómico del aislamiento *Trichoderma* BV1. La eficiencia de la reacción fue 98.80%.

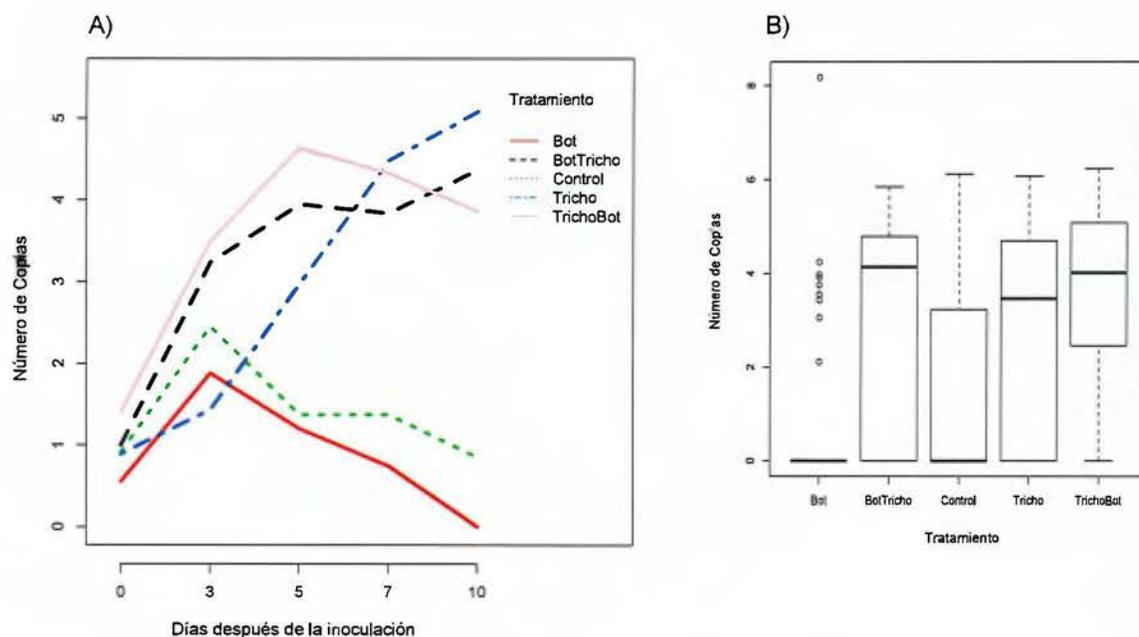


Fig. 3. Cantidad de *Trichoderma* BV1 que se detectó con la sonda TrichoBV1 por día, por tratamiento (Bot: *B. cinerea* BcLL, BotTricho: *B.cinerea* BcLL + *Trichoderma* BV1, Control: frutos sin inocular, Tricho: *Trichoderma* BV1, TrichoBot: *Trichoderma* BV1 + *B. cinerea* BcLL), en los frutos de mora (A) y (B) diagrama de cajas que muestra la distribución de esos datos generados a partir de diluciones de ADN 1:1000 de los frutos de cada tratamiento. Número de copias: copias del genoma haploide de interés.

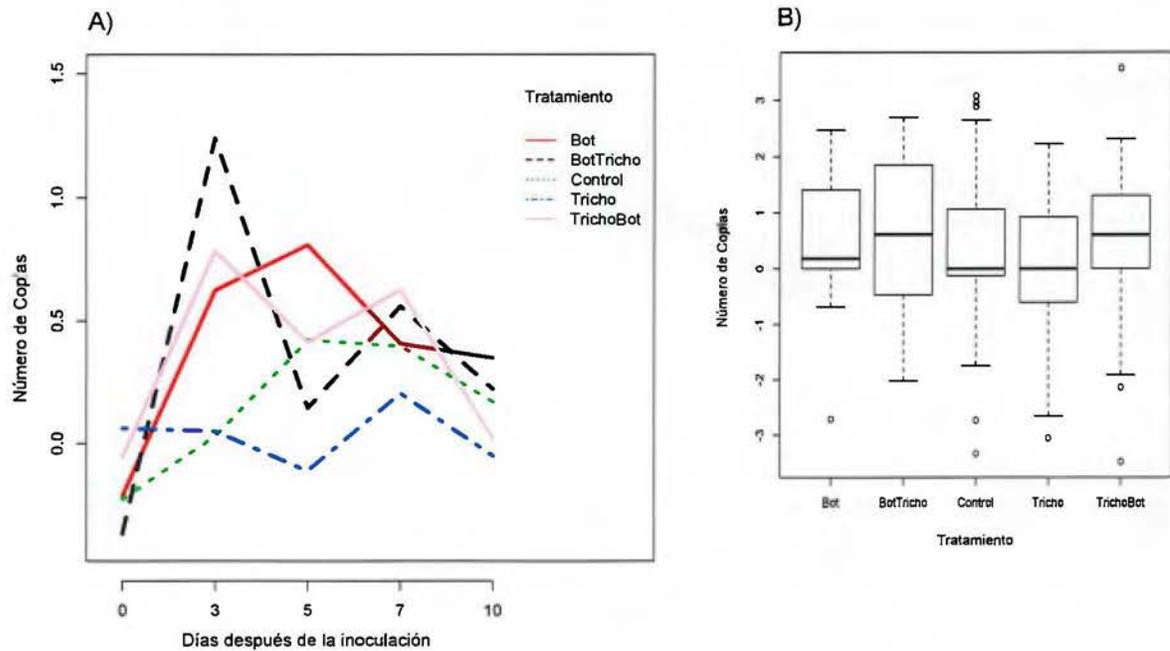


Fig. 4. Cantidad de *Botrytis cinerea* que se detectó con la sonda Bc2P por día, por tratamiento (Bot: *B. cinerea* BcLL, BotTricho: *B. cinerea* BcLL + *Trichoderma* BV1, Control: frutos sin inocular, Tricho: *Trichoderma* BV1, TrichoBot: *Trichoderma* BV1 + *B. cinerea* BcLL), en los frutos de mora (A) y (B) diagrama de cajas que muestra la distribución de los datos generados a partir de diluciones de ADN 1:100 de los frutos de cada tratamiento. Número de copias: copias del genoma haploide de interés.

DISCUSIÓN

Trichoderma BV1 mostró resultados que ubican este hongo como uno de los mejores antagonistas contra *B. cinerea*, *in vitro* y en campo (Castillo-Jiménez, 2011; Calvo-Araya *et al.*, 2012; Marín-Chacón *et al.*, 2017). Este estudio demostró que efectivamente BV1 logró controlar el crecimiento de este patógeno en los frutos de mora y se pudo evaluar mediante qPCR aún en frutos asintomáticos. En este estudio al igual que en el estudio de Castillo-Jiménez (2011), se detectó *B. cinerea* aún en frutos de mora donde no se inoculó. Lo mismo sucedió con *Trichoderma* BV1 en el presente estudio. *Botrytis cinerea* es un hongo patógeno que puede permanecer latente dentro de su hospedero por largos períodos luego de la infección y no provocar síntomas visibles (Jarvis, 1977; Jarvis, 1994; Viret *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2005; Van Kan, 2003; Elmer & Michailides, 2007; Holz *et al.*, 2007; Cadle-Davidson, 2008). Conforme los frutos maduran, las infecciones latentes de *B. cinerea* se reactivan y se expresan los síntomas de la enfermedad (Jarvis, 1977; Agrios, 2005; Castillo-Jiménez, 2011), como ocurrió en los ensayos. Por su parte, las plantas poseen una microbiota endosimbionte que incluye una alta diversidad de hongos, algunos de los cuales pueden proveer protección a las plantas contra patógenos, como sucede con *Trichoderma* (Gazis & Chaverri, 2015) y los resultados demuestran que este es el caso. *Trichoderma* BV1 se aisló a partir de frutos de mora cultivada (Calvo-Araya *et al.*, 2012) y por lo tanto no es extraño que estuviera presente como microbiota endosimbionte en *Rubus* y se encontrara en el interior de los frutos procedentes del campo al igual que *B. cinerea*.

Según análisis previos (Hilje-Rodríguez *et al.*, en progreso), *Trichoderma* BV1 mostró alto porcentaje de similitud (99%) con la especie *T. atroviride* que tiene hábitos de micoparasitismo (Seidl *et al.*, 2009; Kubicek *et al.*, 2011; Atanasova *et al.*, 2013; Chaverri & Samuels, 2013). Al igual que en este estudio, Card *et al.* (2009) demostraron que un aislamiento identificado como *T. atroviride* LU132 fue capaz de inhibir el desarrollo de lesiones por parte de *B. cinerea* en hojas de fresa en un ensayo donde el patógeno ya estaba establecido. Además, ese aislamiento LU132 fue capaz de suprimir significativamente la esporulación del patógeno en hojas de plantas cultivadas *in vitro* tratadas, y en hojas y flores recolectadas del campo (Card *et al.*, 2009).

En esta investigación se observó que *T. atroviride* BV1 ejerció su efecto antagónico contra *B. cinerea* BcLL y esto fue evidente en los tratamientos donde se inocularon ambos hongos (patógeno-antagonista) juntos (BcLL+BV1 y BV1+BcLL). Los mecanismos específicos involucrados en las interacciones directas entre *Trichoderma* spp. y *Botrytis cinerea* comprenden el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia (Elad, 1996; Card, Walter, Jaspers, Szejnberg & Stewart, 2009; Vos, De Cremer, Cammue & De Coninck, 2014). Se han observado estructuras de superenrollamiento y penetración propios del micoparasitismo que desarrolla *Trichoderma* en la zona de contacto con *B. cinerea*, en los márgenes entre áreas necróticas y sanas, lo que previene la dispersión de este patógeno (Harman *et al.*, 2004; Elad & Stewart, 2007; Martínez & Moreno, 2008; Card *et al.*, 2009; Seidl, *et al.*, 2009). Además, se han asociado algunas enzimas degradadoras de pared celular con micoparasitismo en diferentes especies de *Trichoderma* que actúan como controladores biológicos (Labudova & Gogorova, 1988; Adams, 1990; Geremia *et al.*, 1993; Elad, 1996; Viterbo, Haran, Friesem, Ramot & Chet, 2001). En dichas especies, entre las que se encuentran *T. atroviride* y *T. virens*, se ha encontrado sobrerrepresentación de genes que codifican para esas enzimas, en comparación con otras especies de hongos relacionadas (Kubicek *et al.*, 2011; Mukherjee, Horwitz, Herrera-Estrella, Schmoll & Kenerley, 2013; Vos *et al.*, 2014). Específicamente en *T. atroviride*, se han identificado 66 genes que se sobreexpresan durante la fase inicial de micoparasitismo al hacer contacto físico con *B. cinerea* (Seidl *et al.*, 2009). En presencia de *B. cinerea*, se inducen quitinasas del subgrupo C (Gruber *et al.*, 2011).

Los datos generados con la sonda Tricho BV1 (Fig. 3) mostraron que la presencia de *B. cinerea* no afectó el crecimiento de *Trichoderma* BV1 e incluso lo estimuló porque en los tratamientos BcLL y control, donde no se inoculó este antagonista, aunque estuvo presente en la muestra proveniente del campo, no aumentó su crecimiento de forma exponencial con los días como sí lo hizo cuando fue inoculado solo o junto con *B. cinerea*. Los datos también mostraron que *B. cinerea* inoculado solo, tuvo un punto máximo de crecimiento en los frutos de mora y pasado este tiempo empezó a disminuir su detección. Esto podría deberse a la presencia de BV1 como hongo endófito o asociado a los frutos y también a que conforme pasan los días, los frutos se van madurando hasta descomponerse, se agotan los recursos disponibles para el patógeno y al no tener competencia con otro organismo, detiene su crecimiento.

Algunos estudios han indicado que la presencia de *B. cinerea* estimula la producción de endoquitinasas, celulasas, proteasas, xylanases y glucanasas como 1,3- α , β -glucanasas, enzimas extracelulares capaces de degradar polímeros de glucosa unidos por enlaces 1,3- α , β -glucosídicos, por parte de *Trichoderma* spp. (Sanz, Montero, Redondo, Llobell & Monte, 2005; Yang, Yang, Peng, Lo & Liu, 2009). Estas enzimas son secretadas por el micelio para hidrolizar las paredes celulares de *B. cinerea* (Yang *et al.*, 2009). Por otra parte, los genomas de algunas especies micoparásitas de *Trichoderma*, como *T. virens* y la especie de este estudio, *T. atroviride*, también están enriquecidos con genes involucrados en la producción de metabolitos secundarios en comparación con otras especies que no poseen hábitos de micoparasitismo como *T. reesei* (Kubicek *et al.*, 2011; Atanasova *et al.*, 2013; Chaverri & Samuels, 2013). Estos metabolitos secundarios poseen actividad inhibitoria contra diversos organismos y la producción puede ser dependiente del aislamiento. Dentro de estos metabolitos secundarios se encuentran compuestos no polares como pironas, butenólides, azafilonas, antraquinonas, tricotecenos, terpenoides y esteroides así como péptidos no ribosomales como sideróforos y peptaiboles (Vos *et al.*, 2014). En cuanto a competencia, *Trichoderma* spp. ejerce esta acción con *B. cinerea* por nutrientes al colonizar heridas, tejidos senescentes o aberturas naturales del hospedero, que son los puntos de infección de este patógeno por ser ricos en exudados de azúcares y aminoácidos (Vos *et al.*, 2014).

En cuanto a las interacciones indirectas entre *Trichoderma* spp. y *B. cinerea*, éstas involucran la interacción *Trichoderma*-planta-*B. cinerea* y la activación de vías de transducción de señales y respuestas de defensa que desencadenan una resistencia sistémica inducida en la planta hospedera y finalmente el efecto de estos mecanismos sobre las respuestas de la planta hacia *B. cinerea* (Vos *et al.*, 2014). Esta resistencia sistémica inducida involucra la activación de las MAP quinasas (MAPK) (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) como respuesta primaria de la planta, en donde estímulos extracelulares son convertidos en respuestas intracelulares. Las vías específicas involucradas en dicha interacción van a depender de la especie de *Trichoderma* así como de la planta hospedera (Van Wees, Van der Ent & Pieterse, 2008; Tucci, Ruocco, De Masi, De Palma & Lorito, 2011; Vos *et al.*, 2014). Posteriormente se activan otros mecanismos de defensa de la planta contra *B. cinerea* como vías de señalización hormonales (etileno, ácido jasmónico, ácido

salicílico), producción de metabolitos secundarios (p.e fitoalexinas) y una explosión oxidativa que involucra la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Vos *et al.*, 2014).

Una vez que se han seleccionado aislamientos promisorios para control biológico, es importante elucidar sus mecanismos de acción y entender la ecología de sus poblaciones en ambientes naturales (Elad & Stewart, 2007). De acuerdo con Gazis y Chaverri (2015), son múltiples los factores que actúan en conjunto y crean un escenario complejo en donde los organismos patógenos, los benéficos y sus plantas hospederas coexisten de forma balanceada y por lo tanto se deberían implementar prácticas agrícolas para el combate de enfermedades de plantas que repliquen esta dinámica de control biológico. Una estrategia de este tipo debe estar basada en la ecología del patógeno y de su antagonista para lograr alcanzar el máximo efecto.

La técnica de qPCR permitió monitorear el progreso de *B. cinerea* y su antagonista *Trichoderma* BV1 desde el momento de la inoculación hasta su colonización y el desarrollo de síntomas en los frutos de mora. Es una herramienta útil para la detección y cuantificación de patógenos u otros organismos con largos períodos de latencia o interacciones quiescentes. Esta técnica se podría incorporar en programas de control biológico con el fin de monitorear y tratar de disminuir la incidencia del moho gris en la producción de mora. El monitorear el progreso de esta enfermedad así como los controladores biológicos del patógeno, en este caso *T. atroviride* BV1, permite un mejor manejo de ésta y puede reducir costos de producción y mejorar la calidad de los cultivos y las cosechas.

RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar la sonda e imprimadores diseñados en este estudio con otros aislamientos de *Trichoderma* y con otros aislamientos de otros géneros de hongos que pertenezcan a la misma familia. Además, se recomienda hacer ensayos en donde se monitoree el crecimiento de los hongos en intervalos más cortos. Por otra parte, se recomienda hacer investigaciones a futuro que estudien la expresión de genes y las vías metabólicas involucradas en las interacciones patógeno-antagonista de los hongos de este estudio.

REFERENCIAS

(Esta sección incluye las referencias del prefacio, primer capítulo y segundo capítulo)

- AbuQamar, S., Moustafa, K., & Phan-Tran, L.S. (2017). Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 262-274.
- Adams, P. B. (1990). The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 28(1), 59-72.
- Akaike, H. (1973). Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In B. N. Petrov & F. Csaki. (Eds.), *Second International Symposium on Information Theory*. Budapest (pp. 267-281). Hungary: Akademiai Kiado.
- Amselem, J., Cuomo, C.A., Van Kan, J.A.L., Viaud, M., Benito, E.P., Couloux, A., ... Dickman, M. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*, 7(8), e1002230.
- Applied Biosystems. (2010). TaqMan® Universal Master Mix II Protocol. 79p.
- Araya, J. (2015, Junio 3). Costa Rica es el consumidor más voraz de plaguicidas en el mundo. *Semanario Universidad*. Recuperado de <https://www.semanariouniversidad.com>
- Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC genomics*, 14(1), 121.
- Bell, D.K., Wells, H.D., & Markham, C.R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. *Ecology and Epidemiology*, 72(4), 379-382.
- Benito, E.P., Arranz, M., & Eslava, A.P. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S43-S46.
- Betanzo, C.L. (2005). Evaluación de diferentes fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., agente causal del “moho gris” en un huerto de arándano alto o “highbush” (*Vaccinium corymbosum*) de la IX Región. Tesis de Lic., Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Brouwer, M., Lievens, B., Van-Hemelrijck, W., Van-den-Ackerveken, G., Cammue, B.P.A., & Thomma, B.P.H.J. (2003). Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 228, 241-248.
- Cabello, D.A. (2005). Evaluación de cuatro fungicidas, en el control de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. endógena en frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), cultivar de BlueRay. Tesis de Lic., Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

- Cadle-Davidson, L. (2008). Monitoring pathogenesis of natural *Botrytis cinerea* infections in developing grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(4), 387-395.
- Calvo-Araya, J.A., Rivera-Coto, G., Orozco-Cayasso, S., & Orozco-Rodríguez, R. (2012). Aislamiento y evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 225-231.
- Carbone, I., & Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.
- Card, S.D., Walter, M., Jaspers, M.V., Szejnberg, A., & Stewart, A. (2009). Targeted selection of antagonistic microorganisms for control of *Botrytis cinerea* of strawberry in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 38, 183-192.
- Castillo-Jiménez, J.P. (2011). Evaluación del efecto antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis cinerea* Pers. en frutos de mora (*Rubus* spp.) bajo condiciones controladas de laboratorio. Práctica Profesional Supervisada, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D., & Bissett J. (1998). Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 133-137.
- Castro, J.J., & Cerdas, M.M. (2005). *Mora (Rubus spp.): cultivo y manejo poscosecha*. MAG, San José, Costa Rica.
- Celik, M., Kalpulov, T., Zutahy, Y., Ish-shalom, S., Lurie, S., & Lichter, A. (2009). Quantitative and qualitative analysis of *Botrytis* inoculated on table grapes by qPCR and antibodies. *Postharvest Biology and Technology*, 52, 235-239.
- Chaverri, P., & Samuels, G. 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.
- Chaverri, P., Castlebury, L.A., Samuels, G.J., & Geiser, D.M.. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27, 302-313.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., & Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558-590.

- Chilvers, M.I., du Toit, L.J., Akamatsu, H., & Peever, T.L. (2007). A real time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. *Plant Disease*, 91, 599-608.
- Cook, R. J. (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, 31(1), 53-80.
- Darriba, D., Taboada G.L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772-772.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., ... Foster, G.D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430.
- Diguta, C.F., Rousseaux, S., Weidmann, S., Bretin, N., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., & Alexandre, H. (2010). Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes. *FEMS Microbiology Letters*, 313(1), 81-87.
- Droby, S., & Lichter, A. (2007). Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In Y.B., Elad, B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen. (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (p.349-367). Dordrecht: Springer.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Komón, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek C.P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 813-828.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G. & Kubicek, C.P. (2006). The first *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47, 55-64.
- Dubey, M.K., Broberg, A., Sooriyaarachchi, S., Ubhayasekera, W., Jensen, D.F., & Karlsson, M. (2013). The glyoxylate cycle is involved in pleiotropic phenotypes, antagonism and induction of plant defence responses in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviridae*. *Fungal Genetics and Biology*, 58-59, 33-41.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- Elad, Y. (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 102(8), 719-732.
- Elad, Y., & Stewart, A. (2007). Microbial control of *Botrytis* spp. In Y.B. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen. (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp.223-241). Dordrecht: Springer.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., & Denle, N. (2007). *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems-an introduction. In Y.B. Elad, B. Williamson, P.

- Tudzynski & N. Delen. (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp.1-8). Dordrecht: Springer.
- Elmer, P.A.G., & Michailides, T.J. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In Y.B. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen. (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp.243-272). Dordrecht: Springer.
- Federhen, S. (2015). Type material in the NCBI taxonomy database. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D1086-D1098.
- Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., & Shabi, E. (2000). Molecular analysis of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology*, 90(6), 608-614.
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., et al. (2004). *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 361-370.
- French, E.R., & Hebert, T.T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica* (No. 43). San José: IICA.
- Gachon, C., & Saindrenan, P. (2004). Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(5), 367-371.
- Gazis, R., Rehner, S., & Chaverri, P. (2011). Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Molecular Ecology*, 20, 3001-3013.
- Gazis, R., & Chaverri, P. (2015). Wild trees in the Amazon basin harbor a great diversity of beneficial endosymbiotic fungi: is this evidence of protective mutualism? *Fungal Ecology*, 17, 18-29.
- Geremia, R.A., Goldman, G.H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S.B., Montagu, M., & Herrera-Estrella, A. (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Molecular Microbiology*, 8(3), 603-613.
- Grijalba-Rativa, C.M., Calderón-Medellín, L.A., & Pérez-Trujillo, M.M. (2010). Rendimiento y calidad de la fruta en mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), con y sin espinas, cultivada en campo abierto en Cajicá (Cundinamarca, Colombia). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 6(1), 24-41.
- Gruber, S., Kubicek, C. P., & Seidl-Seiboth, V. (2011). Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7217-7226.

- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321.
- Ha, T.N. (2010). Using *Trichoderma* species for biological control of plant pathogens in Viet Nam. *J. ISSAAS*, 16(1), 17-21.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hagn, A., Wallisch, S., Radl, V., Munch, J.C., & Schloter, M. (2007). A new cultivation independent approach to detect and monitor common *Trichoderma* species in soil. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 86-92.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., & Pegler, D.N. (1995). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. Wallingford, Oxon: CABI internacional.
- Henson, J.M., & French, R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1), 81-109.
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Díaz, J.M., Castro, C., Monte, E., & García, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1890-1898.
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10(4), 273-290.
- Holmes, K. A., Schroers, H. J., Thomas, S. E., Evans, H. C., & Samuels, G. J. (2004). Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress*, 3(3), 199-210.
- Holz, G., Coertze, S., & Williamson, B. (2007). The ecology of *Botrytis* on plants surfaces. In Y.B. Elad, , B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen. (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp.9-27). Dordrecht: Springer.
- Hoyos, 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.

- Huelsenbeck, J.P., & Ronquist, F. (2001). MrBayes: bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.
- Hukkanen, A., Pietikäinen, L., Kärenlampi, S., & Kokko, H. (2006). Quantification of downy mildew (*Peronospora sparsa*) in *Rubus* species using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 116, 225-235.
- Hemmerle, W. J., & Hartley, H.O. (1973). Computing maximum likelihood estimates for the mixed AOV model using the W transformation. *Technometrics*, 15(4), 819-31.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21.
- Jaklitsch, W. M., Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B. S., & Druzhinina, I. S. (2006). *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology*, 56, 135-177.
- Jarvis, W.R. (1977). *Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology and pathogenicity* (No. 15). Manitoba: Hignell.
- Jarvis, W. R. (1994). Latent infections in the pre-and postharvest environment. *HortScience*, 29(7), 749-751.
- Jennings, D.L. (1988). *Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth*. San Diego, CA: Academic Press.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059-3066.
- Keer, J.T. 2008. Quantitative real-time PCR analysis. In J.T. Keer & L. Birch (Eds.), *Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach* (pp. 132–155). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Keller, M., Viret, O., & Cole, F.M. (2003). *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology*, 93(3), 316-322.
- Kim, T.G., & Knudsen, G.R. (2008). Quantitative real-time PCR effectively detects and quantifies colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. *Applied Soil Ecology*, 40(1), 100-108.
- Kowalska, J. (2011). Effects of *Trichoderma asperellum* [T1] on *Botrytis cinerea* [Pers.:Fr.], growth and yield of organic strawberry. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 10(4), 107-114.

- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., ... Mukherjee, M. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12(4), R40, 1-15.
- Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K., & Srivastava, R.C. (2012). Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for the antagonistic activity against root and foliar pathogens. *Indian Journal of Microbiology*, 52(2), 137-144.
- Labudova, I., & Gogorova, L. (1988). Biological control of phytopathogenic fungi through lytic action of *Trichoderma* species. *FEMS Microbiology Letters*, 52(3), 193-198.
- Larena, I., Salazar, O., González, V., Julián, M.C., & Rubio, V. (1999). Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*, 75(2), 187-194.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., ... Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X versión 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Leroux, P. (2007). Chemical Control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In Y.B. Elad, , B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen. (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp.195-222). Dordrecht: Springer.
- Liu, K., Raghavan, S., Nelesen, S., Linder, C.R., & Warnow, T. (2009). Rapid and accurate large-scale co-estimation of sequence alignments and phylogenetic trees. *Science* 324(5934), 1561-1564.
- Lo Presti, L. Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., ... & Kahmann, R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 513-545.
- López-Mondéjar, R., Antón, A., Raidl, S., Ros, M., & Pascual, J.A. (2010). Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to hyphal biomass. *Bioresource Technology*, 101(8), 2888-2891.
- Marín-Chacón, M.A., Rivera-Coto, G., Villalobos-Moya, K., Orozco-Rodríguez, R., Orozco-Cayasso, S. (2017). Evaluación de hongos antagonistas de *Botrytis cinerea* Pers., en plantaciones de mora, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 41(1), 7-18.
- Martínez, M.A., & Moreno, Z.Y. (2008). Estandarización de una metodología para la evaluación de eficacia de productos para la protección de cultivo (PPC) preventivos para el control de *Botrytis* spp., en condiciones semicontroladas. Tesis de Lic. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

- Maymon, M., Minz, D., Barbul, O., Zveibil, A., Elad, Y., & Freeman, S. (2004). Identification of *Trichoderma* biocontrol isolates to clades according to ap-PCR and ITS sequence analysis. *Phytoparasitica*, 32(4), 370-375.
- Mehli, L., Kjellens, T.D., Dewey, F.M., & Hietala, A.M. (2005). A case study from the interaction of strawberry and *Botrytis cinerea* highlights the benefits of comonitoring both partners at genomic and mRNA level. *New Phytologist Journal*, 168, 465-474.
- Merchán-Gaitán, J.B., Ferrucho, R.L., & Alvarez-Herrera, J.G. (2014). Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(1), 44-56.
- Minin, V., Abdo, Z., Joyce, P., & Sullivan, J. (2003). Performance-based selection of likelihood models for phylogeny estimation. *Systematic Biology*, 52(5), 674-683.
- Molina, G.S., de la Rotta, M.C.F., & Torres, E. (2004). Incidencia de infecciones quiescentes de *Botrytis cinerea* en flores y frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.). *Agronomía Colombiana*, 22(2), 101-109.
- Molina-Mercader, G., Zaldúa-Flores, S., González-Vargas, G., Sanfuentes-Von Stowasser, E. (2006). Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque*, 27(2), 126-134.
- Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldúa, S., González, G., & Sanfuentes, E. (2011). Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(3), 412-417.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., & Kenerley, C. M. (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. *Microbiology*, 158(1), 35-45.
- Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C.M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 105-129.
- Mulaw, T. B., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2010). The rhizosphere of *Coffea arabica* in its native highland forests of Ethiopia provides a niche for a distinguished diversity of *Trichoderma*. *Diversity*, 2(4), 527-549.
- Munguía, S., Orozco, R., & Argüello, F. (2005). Conservación y caracterización fenotípica de germoplasma de mora (*Rubus* spp.). En D. Flores, & F. Argüello. (Eds.), Cultivo de la mora: innovaciones tecnológicas (pp. 13-55). Cartago: Editorial Tecnológica de Costa Rica.
- Noyd, R.K. (2000). *Mycology reference cards*. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society.

- Pantou, M.P., Mavridou, A., & Typas, M.A. (2003). IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis, *Fungal Genetics and Biology*, 38(2), 159-174.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., & Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28(5), 848-861.
- R Core Team. (2016). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rehner, S.A. (2001). Primers for elongation factor 1-alpha (EF1- α). <http://www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf>.
- Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H., & Viret, O. (2002). Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), 169-174.
- Rigotti, S., Viret, O., & Gindro, K. (2006). Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(3), 253-260.
- Rubio, M.B., Hermosa, M.R., Keck, E., & Monte, E. (2005). Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbial Ecology*, 49(1), 25-33.
- Saito, S., Dunne, K.J., Evans, K.J., Barry, K., Cadle-Davidson, L., & Wilcox, W.F. (2013). Optimisation of techniques for quantification of *Botrytis cinerea* in grape berries and receptacles by quantitative polymerase chain reaction. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(1), 68-73.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195-206.
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M. C., De Respini, S., & Petrini, O. (2010). *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, 102(4), 944-966.
- Sanz, L., Montero, M., Redondo, J., Llobell, A., & Monte, E. (2005). Expression of an α -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *The FEBS Journal*, 272(2), 493-499.

- Sanzani, S. M., Schena, L., De Cicco, V., & Ippolito, A. (2012). Early detection of *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grapes. *Postharvest biology and technology*, 68, 64-71.
- Savazzini, F., Oliveira-Longa, C. M., Pertot, I., & Gessler, C. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. *Journal of Microbiological Methods*, 73(2), 185-194.
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, 6(2):461-464.
- Scheirer, C. J., Ray, W. S., & Hare, N. (1976). The analysis of ranked data derived from completely randomized factorial designs. *Biometrics*, 429-434.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., & Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European journal of plant pathology*, 110(9), 893-908.
- Schena, L., Hughes, K.J.D., & Cooke, D.E.L. (2006). Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology*, 7(5), 365-379.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... Miller, A. N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- Segreda, A.C. (2005). Estudio fisicoquímico y desarrollo de productos a base de mora. En D. Flores, & F. Argüello. (Eds.), *Cultivo de la mora: innovaciones tecnológicas* (pp. 95-109). Cartago: Editorial Tecnológica de Costa Rica.
- Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., ... Kubicek, C.P. (2009). Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC genomics*, 10(1), 567.
- Shanks, A. M., & Hutton, J. C. (1986). Bartlett's test. *Department of Agriculture and Fisheries for Scotland, Marine Laboratory, Working Paper No 8/86* <http://www.gov.scot/Uploads/Documents/SFWP886.pdf>
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.

- Sharma, P., Kumar, V., Ramesh, R., Saravanan, K., Deep, S., Sharma, M., Mahesh, S., & Dinesh, S. (2011). Biocontrol genes from *Trichoderma* species: a review. *African Journal of Biotechnology*, 10(86), 19898-19907.
- Siddiquee, S., Abdullah F., Soon-Guan, T., & Rohaza-Aziz, E. (2007). Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* based on the sequence analysis of the internal transcribed spacer region-1 of the rDNA. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(9), 896-903.
- Sierra, E., Cruz, J., & Casaca, A.D. (2005). *El cultivo de la mora*. DICTA, Tegucigalpa, Honduras.
- Soto, M., Pérez, A.M., & Acosta, O. (2010). La mora: una fruta pequeña beneficiosa para la salud. *Alimentica*, 11, 1-6.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), 2688-2690.
- Strik, B.C., Clark, J.R., Finn, C.E., & Bañados, M.P. (2007). Worldwide blackberry production. *HortTechnology*, 17(2), 205-213.
- Suárez, M.B., Walsh, K., Boonham, N., O'Neill, T., Pearson, S., & Barker, I. (2005). Development of real-time PCR (Taqman[®]) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(9), 890-899.
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 341-354.
- Van Brouwershaven, I. R., Bruil, M. L., Van Leeuwen, G. C. M., & Kox, L. F. F. (2010). A real-time (TaqMan) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other brown rot fungi of fruit crops. *Plant Pathology*, 59(3), 548-555.
- Van Kan, J. A. (2003, August). Infection strategies of *Botrytis cinerea*. In *VIII International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants* 669 (pp. 77-90).
- Van Wees, S. C., Van der Ent, S., & Pieterse, C. M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current opinion in plant biology*, 11(4), 443-448.
- Varela-Ramírez, O., Arguello-Delgado, J. & Orozco-Rodríguez, R. (2015). *Descriptor para moras criollas costarricenses*. San José, Costa Rica: UNED.

- Vidaurre-Montoya, Q., Andrade-Meirelles, L., Chaverri, P., & Rodrigues, A. (2016). Unraveling *Trichoderma* species in attine ant environment: description of three new taxa. *Antonie van Leeuwenhoek*, *109*(5), 633-651.
- Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V. G., & Cole, F. M. (2004). *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology*, *94*(8), 850-857.
- Viterbo, A., Haran, S., Friesem, D., Ramot, O., & Chet, I. (2001). Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiology Letters*, *200*(2), 169-174.
- Vos, C. M., De Cremer, K., Cammue, B., & De Coninck, B. (2015). The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Molecular plant pathology*, *16*(4), 400-412.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, *18*(1), 315-322.
- Yang, H. H., Yang, S. L., Peng, K. C., Lo, C. T., & Liu, S. Y. (2009). Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycological research*, *113*(9), 924-932.

ANEXOS

Anexo I. Protocolo de extracción de ADN de hongos (Hoyos *et al.*, 2008) modificado para trabajar con cantidades pequeñas.

- 1-Pesar 20mg aproximadamente de micelio del hongo y colocarlo en un tubo de 1.5ml
- 2-Macerar con pistilo.
- 3-Agregar 500µl de buffer de extracción (200mM de Tris-HCL pH=7.2; 50Mm de EDTA; 3% de SDS; 1M de NaCl).
- 4-Incubar a 60°C durante 30 min mezclando cada 10 min.
- 5-Adicionar 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)(500µl) y mezclar por inversión del tubo hasta formar una emulsión.
- 6-Centrifugar a 4°C, 10000 g por 15 min.
- 7-Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 8-Repetir del paso 5 hasta el 8 nuevamente con el sobrenadante transferido al nuevo tubo.
- 9-Añadir 0,54 volúmenes de isopropanol y mezclar por inversión. Almacenar a -20°C o colocar el tubo en hielo por al menos 15 min.
- 10-Centrifugar a 4°C, 10000 g por 15 min. y descartar el sobrenadante por decantación del líquido.
- 11-Secar el botón al vacío por 10 min. y resuspender en 400 µl de buffer TE 1X (Tris-EDTA).
- 12-Agregar RNasa A a una concentración de 10µg/ml (1 µl de enzima por cada 50 µl de muestra).
- 13-Incubar a 37°C por una hora.
- 14-Agregar 1/10 de acetato de sodio (0.3M pH=5.2) y dos volúmenes de etanol absoluto.
- 15-Centrifugar a 4°C, 10000 g durante 10 min.
- 16-Descartar el sobrenadante.
- 17-Lavar el precipitado con 500µl de etanol al 70%. Incubar 10 min a 37 °C.
- 18-Centrifugar a 4°C, 3000 g durante 10 min
- 19-Secar al vacío el precipitado o botón y resuspender en 50 o 100µl de buffer TE 1X.
- 20-Centrifugar a 4°C, 3000 g durante 10 min.
- 21-Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

Anexo II. Directrices de diseño de imprimadores y sondas MGB (Tomado de la Guía de reactivos Applied Biosystems® StepOne™ Real-Time PCR System, 2010).

Resumen de las directrices de diseño de cebadores y sondas MGB

Directrices de sondas	Directrices de cebadores
Primero, seleccione la sonda y, a continuación, diseñe los cebadores de la manera más parecida posible a la sonda sin superponerse a la sonda (se recomiendan encarecidamente amplicones de 50 a 150 pares base).	
Mantenga el contenido de G/C en un rango del 30 al 80%.	
Evite repeticiones de un nucleótido idéntico, especialmente de guanina, en los que se deberían evitar repeticiones de cuatro o más G.	
Si se utiliza el software Primer Express®, la T _m debería ser de 68 a 70 °C.	Si se utiliza el software Primer Express®, la T _m debería ser de 58 a 60 °C.
Sin G en el extremo 5'.	Los cinco nucleótidos del extremo 3' no deberían tener más de 2 bases G y/o C.
Las sondas TaqMan MGB® deberían ser lo más cortas posible, sin llegar a tener menos de 13 nucleótidos.	

Anexo III. Esquema de amplificación qPCR por medio de una sonda con MGB en el extremo 3' (Tomado del manual TaqMan® Universal Master Mix II Protocol de Applied Biosystems®, 2010).

The 5' nuclease assay process (Figure 5 through Figure 8) takes place during PCR amplification. This process occurs in every cycle and does not interfere with the exponential accumulation of product.

-  = Nonfluorescent quencher
-  = Minor groove binder
-  = Reporter
-  = Hot-start DNA polymerase

Figure 4 Legend for Figure 5 through Figure 8

During PCR, the TaqMan® MGB probe anneals specifically to a complementary sequence between the forward and reverse primer sites (Figure 5)

When the probe is intact (Figure 5 and Figure 6), the proximity of the reporter dye to the quencher dye results in suppression of the reporter fluorescence primarily by Förster-type energy transfer (Förster, 1948; Lakowicz, 1983).

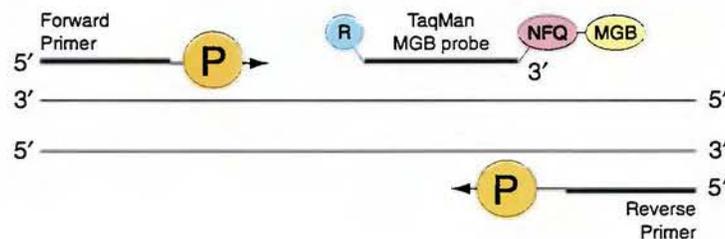


Figure 5 Polymerization

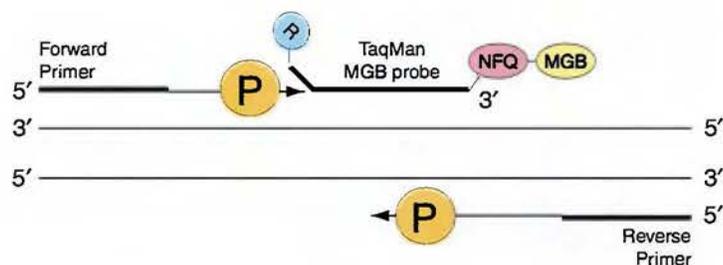


Figure 6 Strand displacement

The DNA polymerase cleaves only probes that are hybridized to the target (Figure 7) Cleavage separates the reporter dye from the quencher dye; the separation of the reporter dye from the quencher dye results in increased fluorescence by the reporter. The increase in fluorescence occurs only if the target sequence is complementary to the probe and is amplified during PCR. Because of these requirements, nonspecific amplification is not detected.

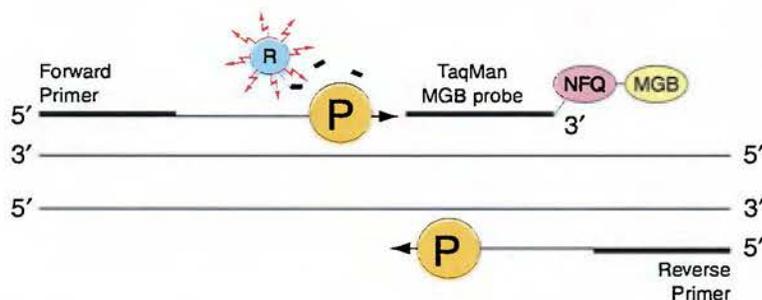


Figure 7 Cleavage

Polymerization of the strand continues, but because the 3' end of the probe is blocked, no extension of the probe occurs during PCR (Figure 8)

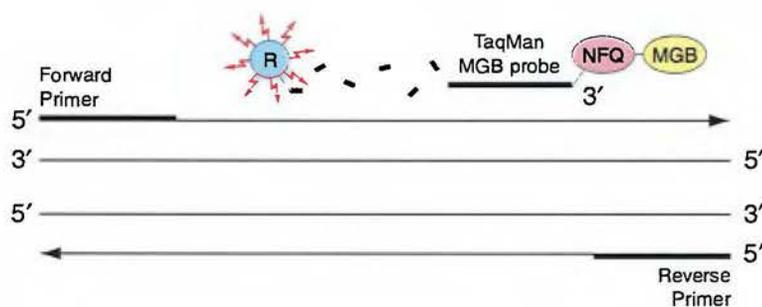


Figure 8 Completion of polymerization

Anexo IV. Esquema de estandarización de las concentraciones de imprimadores y sonda que se probaron para las reacciones de qPCR (Tomado del manual TaqMan® Universal Master Mix II Protocol de Applied Biosystems®, 2010).

		Forward primer (nM)		
		50	300	900
Reverse primer (nM)	50	50/50	300/50	900/50
	300	50/300	300/300	900/300
	900	50/900	300/900	900/900

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50/50 U	50/50 U	50/50 U	50/50 U	300/50 U	300/50 U	300/50 U	300/50 U	900/50 U	900/50 U	900/50 U	900/50 U
B	50/300 U	50/300 U	50/300 U	50/300 U	300/300 U	300/300 U	300/300 U	300/300 U	900/300 U	900/300 U	900/300 U	900/300 U
C	50/900 U	50/900 U	50/900 U	50/900 U	300/900 U	300/900 U	300/900 U	300/900 U	900/900 U	900/900 U	900/900 U	900/900 U

Anexo V. Resultados de estimación del mejor modelo de sustitución de nucleótidos generado con el jModelTest v2.1.4 (Darriba *et al.* 2012) con diferentes criterios a partir de los alineamientos Clustal W v2.0 (Larkin *et al.* 2007), MAFFT v7.017 (Kato *et al.* 2002) y MUSCLE (Edgar 2004).

	Clustal	MAFFT	MUSCLE
AIC	TPM1uf+G (-lnL = 3534.0972)	HKY+I+G (-lnL = 3561.9647)	TPM1uf+G (-lnL = 3568.2226)
BI	HKY+G (-lnL= 3535.1034)	HKY+I (-lnL = 3564.3774)	HKY+G (-lnL= 3569.3617)
DT	HKY+G (-lnL= 3535.1034)	HKY+I (-lnL = 3564.3774)	HKY+G (-lnL= 3569.3617)
ML	JC (-lnL= 3745.4767)	JC (-lnL= 3778.7633)	JC (-lnL= 3778.3722)

Anexo VI. Resultados de qPCR de muestras a partir de diferentes diluciones de ADN de frutos de mora inoculados con *Trichoderma* BV1 (ejemplo de inhibición de la sonda, Cq=0).

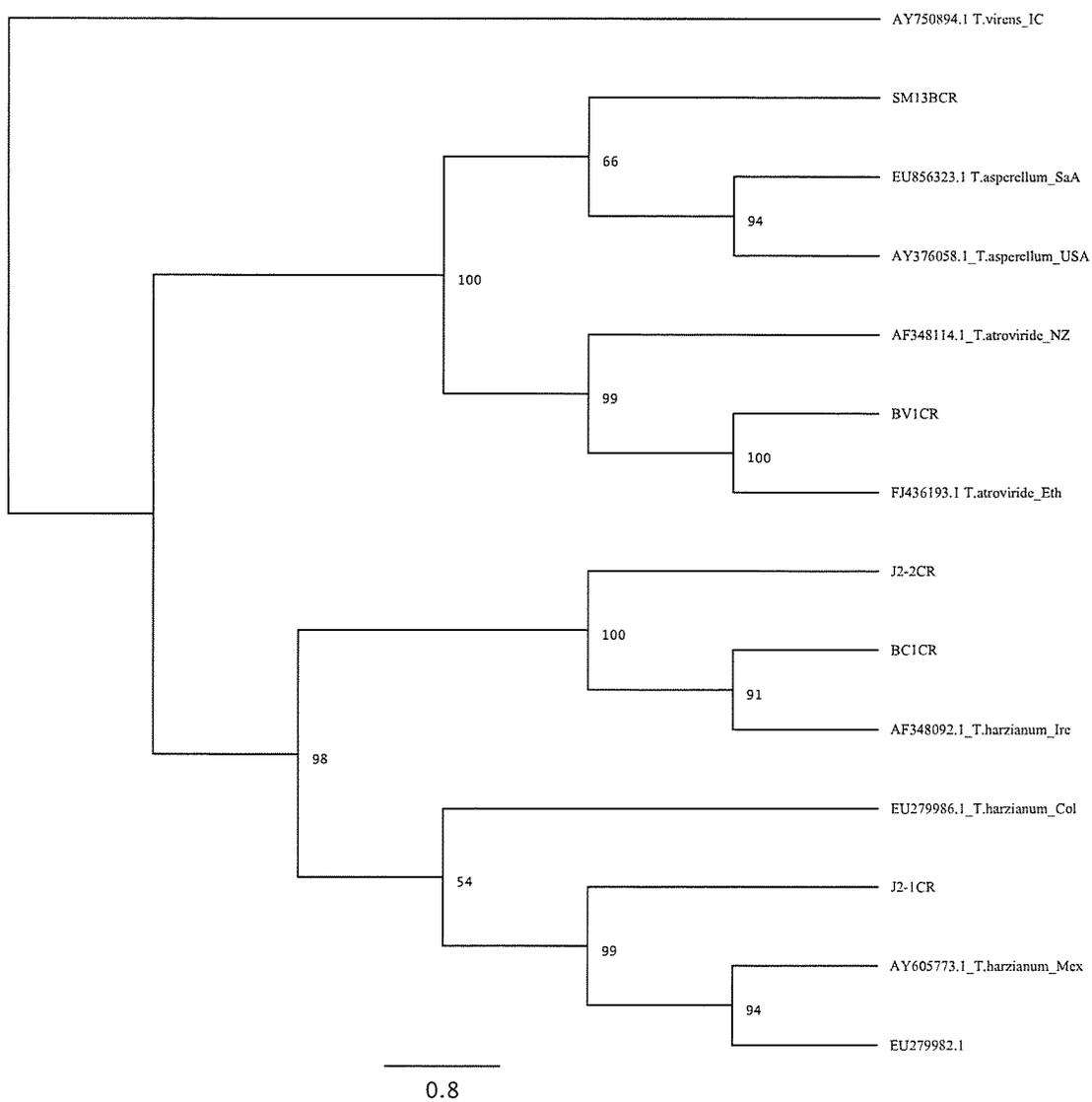
Pozo	ID Muestra	Sonda	Tratamiento	Día	Cq	CqPromedio	CORRIDA	Dilución	Concentración Final
B1	F145i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F8	1:20	0
B2	F145i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F8	1:20	0
B3	F146i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F8	1:20	0
B4	F146i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F8	1:20	0
B5	F147i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F8	1:20	0
B6	F147i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F8	1:20	0
A7	F145i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F21	1:100	0
A8	F145i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F21	1:100	0
B1	F146i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F21	1:100	0
B2	F146i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F21	1:100	0
B3	F147i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F21	1:100	0
B4	F147i	Tricho BV1	Tricho	10	0	0	F21	1:100	0
E1	F145i	Tricho BV1	Tricho	10	30,51325989	30,68303108	F34	1:1000	5,209778847
E2	F145i	Tricho BV1	Tricho	10	30,85280228	30,68303108	F34	1:1000	5,209778847
E3	F146i	Tricho BV1	Tricho	10	29,5840416	29,50847054	F34	1:1000	5,560289306
E4	F146i	Tricho BV1	Tricho	10	29,43289948	29,50847054	F34	1:1000	5,560289306
E5	F147i	Tricho BV1	Tricho	10	30,00121117	30,11785889	F34	1:1000	5,37843662
E6	F147i	Tricho BV1	Tricho	10	30,2345047	30,11785889	F34	1:1000	5,37843662

Anexo VII. Ejemplo de inhibición parcial de la sonda en la curva estándar de *Trichoderma* BV1 (Cq D1 > Cq D5).

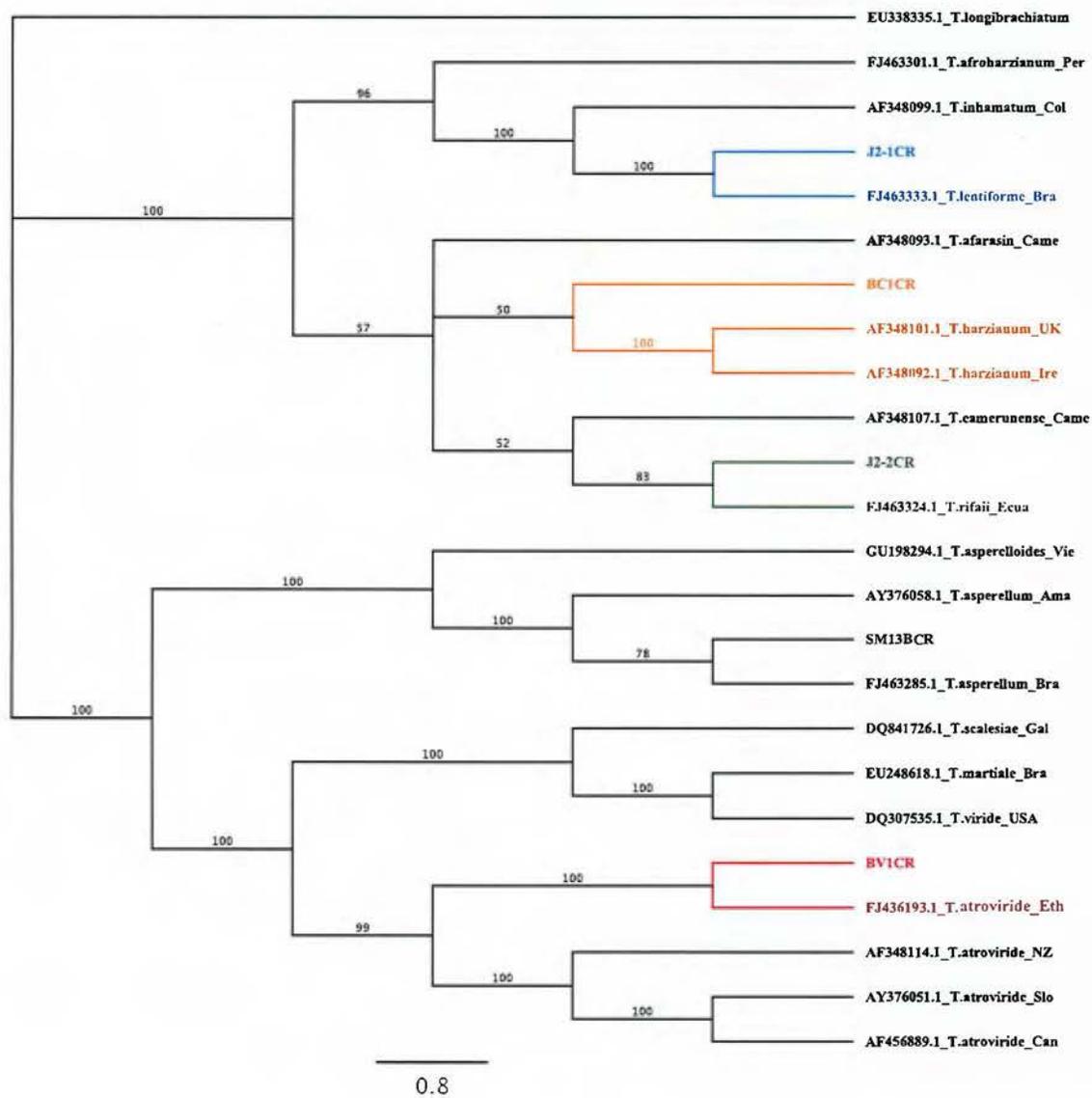
Pozo	ID Muestra	Sonda	Task	Reportero	Quencher	Cq	Cq Promedio	Cq SD	Cantidad
A1	Dilución 1	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	46,96709442	46,25699997	1,290501356	30000
A2	Dilución 1	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	47,03650665	46,25699997	1,290501356	30000
A3	Dilución 1	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	44,76739502	46,25699997	1,290501356	30000
A4	Dilución 2	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	33,6079216	33,46640015	0,127671778	3000
A5	Dilución 2	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	33,4314003	33,46640015	0,127671778	3000
A6	Dilución 2	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	33,35987854	33,46640015	0,127671778	3000
A7	Dilución 3	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	35,60497284	35,40603638	0,175668567	300
A8	Dilución 3	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	35,27225113	35,40603638	0,175668567	300
B1	Dilución 3	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	35,34088516	35,40603638	0,175668567	300
B2	Dilución 4	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	38,10359955	38,78221893	0,735904515	30
B3	Dilución 4	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	38,6786232	38,78221893	0,735904515	30
B4	Dilución 4	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	39,56443024	38,78221893	0,735904515	30
B5	Dilución5	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	Undetermined	40,92792511	0,877930343	3
B6	Dilución5	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	40,30713272	40,92792511	0,877930343	3
B7	Dilución5	Tricho BV1	STANDARD	VIC	NFQ-MGB	41,54871368	40,92792511	0,877930343	3

Anexo VIII. Árboles filogenéticos generados a partir del BLAST[®] con secuencias reportadas en el GenBank[®]. a) Árbol generado sin limitar la búsqueda de secuencias, b) Árbol generado con secuencias de material tipo.

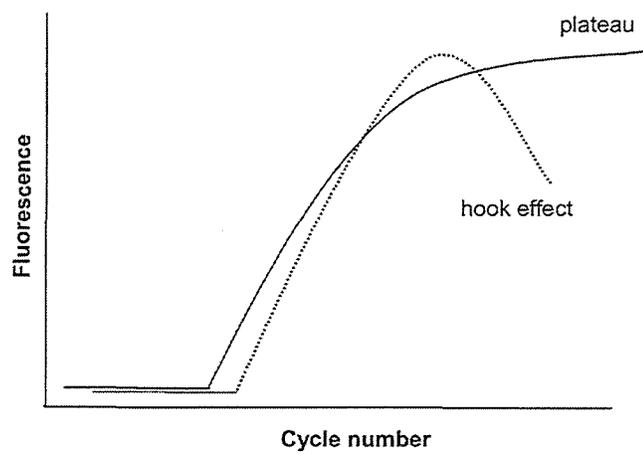
a)



b)



Anexo IX. Gráfico que ilustra el “efecto gancho” que se observa cuando hay altas concentraciones de ADN blanco en la reacción de qPCR (Tomado del Keer 2008).



Anexo X. Resultados de la prueba Schreirer-Ray-Hare con cada una de las sondas.

a) Sonda Bc2P

Botrytis 1 100	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Rank_Tratamiento	1	43611	43611	1.714	0.19098
Rank_Dia	1	130693	130693	5.137	0.02380
Rank_Tratamiento:Rank_Dia	1	189520	189520	7.450	0.00655
Residuals	557	14170348	25440		

b) Sonda Tricho BV1

Trichoderma 1 1000	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Rank_Tratamiento	1	1045030	1045030	60.76	3.48e-14
Rank_Dia	1	825348	825348	47.98	1.26e-11
Rank_Tratamiento:Rank_Dia	1	364895	364895	21.21	5.16e-06
Residuals	526	9047607	17201		