

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

**FORMULARIO PARA PRESENTACIÓN DEL INFORME FINAL
DE PROYECTOS CON RECURSOS DEL FONDO DEL SISTEMA**

1. DATOS GENERALES

1.1. Nombre del proyecto:	Efecto de hongos endófitos en la salud y la resiliencia de plantas de café.
1.2. Área temática:	Madre Tierra (cambio climático y afines)
1.3. Vigencia del proyecto:	Fecha de inicio (m/a) : 01/2018 Fecha final: 01/2020 Ampliación solicitada hasta 31/06/2021.
1.4. Fecha de presentación de informe:	21/06/2021
1.5. Nombre de la Comisión o equipo proponente si aplica:	

**CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN**

V.02

2. PARTICIPANTES ENCARGADOS DEL PROYECTO

Nombre completo*	Institución	Unidad	Teléfonos	Carga académica asignada al proyecto	Correo electrónico
Priscila Chaverri Echandi (CP)	UCR	Centro de Investigaciones en Productos Naturales; y Escuela de Biología	2511-5252	10 h/semana	priscila.chaverriechandi@ucr.ac.cr
Alejandro Zamora Meléndez (RU)	UNA	Escuela de Ciencias Agrarias	8712-1293	10 h/semana	azamoram90@gmail.com
Steffany Orozco Cayasso (participante)	UNA	Escuela de Ciencias Agrarias	2277-3301	20 h/semana administrativas	steffany.orozco.cayasso@una.cr
Aníbal Mora Villalobos (RU)	CENIBiot	Área Bioprocesos	2519-5700 ext. 6078	10 h/semana	amorav@cenat.ac.cr
Jorge Blanco Salas (RU)	UNED	Escuela de Ciencias Exactas y Naturales	8741-3775	10 h/semana	joblanco@uned.ac.cr
Braulio Vílchez Alvarado (RU)	ITCR	Escuela de Ingeniería Forestal	2550-2338	10 h/semana	bvilchez@itcr.ac.cr

*Indicar quién es el/la Coordinador(a) del Proyecto (CP) y el/la Responsable por Universidad (RU).

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

3. RESUMEN EJECUTIVO DE LOS LOGROS ALCANZADOS AL MOMENTO DEL INFORME:

Describa en forma general los logros alcanzados hasta el momento (mínimo 200, máximo 500 palabras):

Se realizaron cuatro giras a Guanacaste, Estación Biológica La Selva y Golfito. Se obtuvieron 131 aislamientos de hongos y éstos ya están identificados y preservados. Se seleccionaron algunos aislamientos para realizar las pruebas de antagonismo in vitro e in planta. Los patógenos utilizados en estos ensayos fueron “mal de talluelo”, *Mycena citricolor* y *Colletotrichum* cf. *acutatum*. Un aislamiento se utilizó para las pruebas de estrés hídrico y promoción del crecimiento. Varios aislamientos de *Trichoderma* se utilizaron para determinar su actividad quitinolítica.

Los ensayos de antagonismo demuestran que varios hongos endófitos controlan los patógenos 60-80%. En el ensayo de estrés hídrico se demostró que 100% de las plántulas sin endófitos no sobrevivieron a la falta de agua durante un mes. 50 % de las plántulas con endófito sobrevivieron. Los ensayos de promoción de crecimiento también demuestran un aumento significativo en el largo de la raíz, largo de la plántula, y peso, en las cuatro variedades de café. Los experimentos de actividad quitinolítica también demuestran una alta actividad. Todos estos resultados confirman que los endófitos proveen una protección a varios niveles (patógenos, estrés hídrico, promoción del crecimiento) y con varios mecanismos (micoparasitismo, antibiosis y enzimático).

A pesar de los atrasos iniciales del proyecto y la pandemia, el proyecto se concluyó en un 100%. Además, se entrenaron varios estudiantes de pre-grado, licenciatura y posgrado.

Se adjunta el informe detallado por objetivo.

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

4. DESARROLLO Y EJECUCIÓN (más detalle por objetivo se encuentra después de este cuadro):

Objetivos específicos	Metas	Actividades desarrolladas
<p>1. Producir una colección de hongos endófitos de plantas de Rubiaceae en bosque natural de Costa Rica. (Objetivo liderado principalmente por la UCR. La UNED y el ITCR también participaron)</p>	<p>1.1. Una colección de hongos endófitos aislados de tallos (albura) de varias especies y géneros de Rubiaceae en todo el país, pero con énfasis en bosques naturales de regiones cafetaleras y también de zonas muy secas (e.g. Guanacaste), para incrementar la probabilidad de encontrar endófitos adaptados a las regiones donde se crece el café y a estrés hídrico.</p> <p>1.2. Una colección de varios <u>aislamientos de los hongos <i>Bionectria</i>, <i>Trichoderma</i> y <i>Tolypocladium</i></u> que se utilizarán en los Objetivos específicos 3 y 4 (actividad enzimática y pruebas de antagonismo).</p>	<p>1.1.1. Trámites de permisos de recolecta y pasaportes científicos; realización de 4 giras de campo (1 a Guanacaste, 2 a Sarapiquí, 1 a Golfito; recolección de 92 muestras (arbustos o árboles), identificación de las plantas.</p> <p>1.1.2. Aislamiento de 131 hongos endófitos de los tallos (albura), purificación de los cultivos y preservación de los cultivos a -80 C en el CIPRONA.</p> <p>1.2.1. Realización de un filtro visual inicial para determinar cuáles aislamientos no pertenecen a los grupos de interés. Se seleccionaron 11 aislamientos de hongos para continuar. Las especies seleccionadas son de <i>Trichoderma</i>, <i>Bionectria</i> (<i>Clonostachys</i>), <i>Daldinia</i>, <i>Simplicillium</i>, <i>Hypocreales</i>.</p>
<p>2. Identificar taxonómicamente los hongos colectados para predecir su potencial utilidad y actividad biológica. (Objetivo liderado por la UCR)</p>	<p>2.1. Obtención de varios aislamientos puros de <u><i>Bionectria</i>, <i>Tolypocladium</i> y <i>Trichoderma</i></u>, y otros endófitos.</p>	<p>2.1.1. Observaciones, clasificaciones y selección de los cultivos basados en las características macroscópicas de sus colonias. Utilizando características morfológicas, es posible determinar que ya se cuentan con aislamientos de <i>Bionectria</i> y <i>Trichoderma</i>. También <i>Simplicillium</i>, <i>Daldinia</i> y otros <i>Hypocreales</i>.</p>

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

Objetivos específicos	Metas	Actividades desarrolladas
	<p>2.2. Seleccionados por lo menos cinco aislamientos por grupo endófito (<i>Bionectria</i>, <i>Tolyposcladium</i> y <i>Trichoderma</i>) de una manera más objetiva y científicamente sólida y prudente las especies de hongos antagonistas que estén taxonómica- y filogenéticamente relacionadas a otras especies conocidas como endófitas y con propiedades antifúngicas. Luego de la selección, se probará y validará la utilidad de estos aislamientos/especies endófitas en ensayos de control biológico y actividad enzimática (Objetivos específicos 3 y 4).</p>	<p>2.2.1. Extracción de ADN, PCR, secuenciación de ADN, análisis filogenético, incluyendo otras especies con una predicha acción antagonista. Ya se identificaron molecularmente los 11 aislamientos.</p> <p>2.2.2. Selección de aislamientos de <i>Bionectria</i>, <i>Trichoderma</i>, <i>Simplicillium</i>, <i>Daldinia</i> y otros <i>Hypocreales</i>. para ser utilizados en Objetivos específicos 3 y 4.</p>
<p>3. Determinar, por medio de ensayos <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>, cuales hongos tienen potencial en control biológico, protección y promoción del crecimiento en condiciones de estrés hídrico y en plantas previamente inoculadas y precolonizadas con los endófitos. (Objetivo liderado por la UCR y UNA. Los ensayos de antagonismo fueron realizados por la UCR y UNA. Ensayos de promoción de crecimiento :UNA, y estrés hídrico: UNA).</p>	<p>3.1. Descubrimiento de uno o varios hongos endófitos que controlan patógenos <i>in vitro</i>.</p> <p>3.2. Producción de plántulas/almácigo de café precolonizadas sistémicamente con los hongos endófitos benéficos.</p> <p>3.3. Descubrimiento de uno o varios hongos endófitos que controlen patógenos <i>in planta</i>.</p> <p>3.4. Descubrimiento de uno o varios hongos endófitos que promuevan el crecimiento de plántulas de café y que las protejan contra estrés hídrico (en este caso, poca agua).</p>	<p>3.1. Se realizaron pruebas <i>in vitro</i> contra <i>Mycena citricolor</i>, mal de talluelo y <i>Colletotrichum acutatum</i>.</p> <p>3.2. Se produjeron e inocularon plántulas con endófitos para todos los ensayos <i>in planta</i>. Las plántulas <i>in vitro</i> (embriogénesis) se produjeron en el CENiBiot y desde semilla, en Coopetarrazu. Se confirmó la colonización sistémica.</p> <p>3.3. Dos especies de <i>Trichoderma</i> controlan mal de talluelo y <i>Mycena citricolor</i> <i>in planta</i>.</p> <p>3.4. Dos especies de <i>Trichoderma</i> promueven el crecimiento de 4 variedades de café y las protegen del estrés hídrico.</p>

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)

ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

Objetivos específicos	Metas	Actividades desarrolladas
<p>4. Determinar las posibles enzimas asociadas a micoparasitismo por las cuales el endófito (específicamente <i>Trichoderma</i>) protege a la planta de café. (Objetivo liderado y ejecutado por CENIBiot)</p>	<p>4.1. Contar con al menos una metodología cualitativa que permita tamizar la actividad quitinolítica a partir de <i>Trichoderma</i> spp. endófitas de plantas de la familia Rubiaceae.</p> <p>4.2. Desarrollo de un protocolo escala matraz para la síntesis de enzimas asociadas a micoparasitismo (quitinasas) a partir de <i>Trichoderma</i> spp. endófitas de plantas de la familia Rubiaceae.</p> <p>4.3. Determinación de la actividad catalítica quitinasa producidas a partir de <i>Trichoderma</i> spp. endófitas de plantas de la familia Rubiaceae.</p> <p>4.4. Tamizaje de al menos un aislamiento con potencial quitinilítico y otra celulolítico producidas a partir de <i>Trichoderma</i> endófitas seleccionadas en etapas anteriores.</p>	<p>4. Una de las primeras actividades de este objetivo era contar con una metodología cualitativa que permita tamizar la actividad quitinolítica a partir de <i>Trichoderma</i> spp. endófitas de plantas de la familia Rubiaceae. Se estandarizó la metodología y se determinó la alta actividad quitinolítica de los aislamientos.</p>

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

Detalles de los resultados:

Objetivo 1. Producir una colección de hongos endófitos de plantas de Rubiaceae en bosque natural de Costa Rica.

Se realizaron de 4 giras de campo (1 a Guanacaste, 2 a Sarapiquí, 1 a Golfito). Se recolectaron 92 muestras de hojas y corteza de arbustos árboles de la familia Rubiaceae, y se identificaron las plantas como: *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich., *Allenanthus erythrocarpus* Standl., *Arachnothryx costaricensis* (Borhidi) Standl., *Bertiera bracteosa* (Donn. Sm.) B. Ståhl & L. Andersson, *Chimarrhis latifolia* Standl., *Chomelia costaricensis* C.M. Taylor, *Ch. microloba* Donn. Sm., *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum., *Coussarea loftonii* (Dwyer & M.V. Hayden) Dwyer, *Cotalamancana* Standl., *Cosmibuena macrocarpa* (Benth.) Klotzsch ex Walp., *Duroia costaricensis* Standl., *Faramea tamberlikiana* Müll. Arg., *Genipa americana* L., *Gonzalagunia osaensis* C.M. Taylor, *Guettarda macrosperma* Donn. Sm., *Isertia haenkeana* DC., *Macrocnemum roseum* (Ruiz & Pav.) Wedd., *Notopleura polyphlebia* (Donn. Sm.) C.M. Taylor, *Randia grandifolia* (Donn. Sm.) Standl., *Palicourea eurycarpa* (Standl.) C.M. Taylor, *Pa. adusta* Standl., *Pentagonia costaricensis* (Standl.) W.C. Burger & C.M. Taylor, *Posoqueria grandiflora* Standl., *Po. Latifolia* (Rudge.) Schult., *Psychotria berteriana* de Candolle, *Ps. brachiata* Sw., *Ps. guianensis* Raeusch., *Ps. horizontalis* Sw., *Ps. marginata* Sw., *Ps. mertoniana* Standl., *Ps. panamensis* Standl., *Ps. pubescens* Sw., *Ps. solitodinum* Standl., *Ps. subsessilis* Benth. Ex Oerst., *Randia grandifolia* (Donn. Sm.) Standl., *Ra. lasiantha* (Standl.) Standl., *R. aculeata* L., *Ronabea emetica* (L. f.) A. Rich., *Ro. latifolia* Aubl., *Rudgea cornifolia* (Kunth) Standl., *Rustia costaricensis* (Standl.) Lorence, *Simira maxonii* (Standl.) Steyerem, *Sommerera donnell-smithii* Standl., *Tocoyena pittieri* (Standl.) Standl., and *Warszewiczia coccinea* (Vahl) Klotzsch.

Para los aislamientos, se removió un área de la corteza de aproximadamente 8 × 6 cm a la altura del hombro (ca. 1.5 m) usando un cuchillo previamente calentado al rojo vivo. Posteriormente, la parte expuesta se esterilizó y se cortaron 20 fragmentos de alrededor de 1 × 1 cm por planta (Evans *et al.* 2003). Igualmente, se tomaron hojas vivas asintomáticas y se cortaron fragmentos de aproximadamente 5 x 5 mm. En seguida, como lo mencionan Chaverri *et al.* (2011), se aislaron los tejidos vivos usando técnicas asépticas, se pasaron los fragmentos de tejidos por una secuencia de inmersiones: primero en hipoclorito de sodio (2%), luego alcohol (70%) y finalmente en agua estéril. Los fragmentos de tejido se colocaron en placas Petri con papa dextrosa agar (PDA) con antibiótico (para prevenir el crecimiento de bacterias endófitas). Estas placas se incubaron a temperatura ambiente hasta que el micelio del hongo comienza emerger del tejido vegetal. Una vez que el micelio emergió del fragmento de tejido, este se trasladó a otra placa Petri con PDA para obtener los cultivos puros. Se hizo un control de esterilidad mediante la imprimación de la superficie del fragmento en una placa Petri con el mismo medio. De esas muestras de plantas, se aislaron 132 hongos endófitos, se purificaron y se preservaron a -80 °C y temperatura ambiente en agua estéril y glicerol, en el CIPRONA.

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

Objetivo 2. Identificar taxonómicamente los hongos colectados para predecir su potencial utilidad y actividad biológica.

Debido a que la identificación morfológica de cientos de cultivos de endófitos es bastante lenta y puede llevar años, nos enfocamos primero en la identificación molecular. En la colección que tenemos en el CIPRONA, hay aproximadamente 1000 cultivos de endófitos de este proyecto FEES y otros donde se han aislado de Rubiaceae también 132 cultivos son específicamente del proyecto FEES, y se han identificado 90, aunque no todos a especie (Ver cuadro 1). Se realizaron las identificaciones moleculares utilizando la región ITS del ADN ribosomal. Dicha región fue establecida como el código de barras fúngico (Schoch *et al.*, 2012); además que es más eficiente y acertado que las identificaciones basadas solo en características microscópicas. En general, la mayoría de los endófitos no formaron esporas y por lo tanto identificaciones usando morfología fue imposible. Esto también aplica para Hypocreales tales como *Clonostachys*, *Tolypocladium* y *Trichoderma*, y otros potenciales hongos antagonistas, las cuales requirieron de la secuenciación de marcadores moleculares adicionales (factor de elongación *Tef1 α* , polimerasa del ARN *rpb2*, y tal vez beta-tubulina *btub*) para una identificación exacta y análisis filogenéticos (Chaverri *et al.*, 2003).

Para la extracción de ADN se usó un kit comercial (Prepman Ultra) para extraer ADN. Luego se usarán las técnicas descritas en varias publicaciones por Chaverri *et al.* para hacer PCR y secuenciación (Herrera *et al.*, 2013; Hirooka *et al.*, 2012; Salgado-Salazar *et al.*, 2013). Para la identificación y filtro inicial, se usará la región ITS del ribosoma nuclear (solamente en una dirección, imprimador ITS5, para ahorrar costos). Para identificar precisamente los hongos de interés y hacer análisis filogenéticos, se usó una región del factor de elongación-traslación (imprimadores *tef1-728Mf* y *tef1-986r*) para *Trichoderma*, *Tolypocladium* y *Clonostachys*, y dependiendo de los resultados, se necesitó secuenciar una región más (polimerasa del ARN subunidad 2, *rpb2*, primers 5f2, 7cr, 7cf, 11ar; o beta-tubulina, imprimadores *Btub-T1*, *Btub-T2*) (Schoch *et al.*, 2012). Los productos de PCR se enviaron a Psomagen (Corea) para su purificación y secuenciación. Luego de obtener las secuencias, primero se compararon con bases de datos públicas (GenBank, BLAST) para una identificación inicial. Luego, dependiendo de los resultados de esta identificación, se secuenciaron otros genes para clasificaciones más precisas y análisis filogenéticos multiloci. Las secuencias se alinearon con el programa Geneious, y se construyeron árboles filogenéticos con los programas MrBayes (Inferencia Bayesiana) y GARLI (Máxima Verosimilitud). Las secuencias disponibles hasta el momento fueron depositadas en Dryad: <https://doi.org/10.5061/dryad.0cfxpnvxt>. La figura 1 muestra el árbol filogenético de ITS.

Basado en la identificación molecular y filogenia (Figura 1), se seleccionaron varios aislamientos para realizar pruebas de antagonismo (objetivo 3). Las especies son: *Trichoderma inhamatum*, *Trichoderma rifaii*, *Trichoderma* sp.1, *Trichoderma* sp.2, Nectriaceae sp., *Simplicillium lamellicola*, *Clonostachys rosea*, e Hypocreales sp. del orden de los Hypocreales; y *Daldinia starbaeckii* e Xylariaceae sp., del orden de los Xylariales.

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

Objetivo 3. Determinar, por medio de ensayos *in vitro* e *in planta*, cuales hongos tienen potencial en control biológico, protección y promoción del crecimiento en condiciones de estrés hídrico y en plantas previamente inoculadas y precolonizadas con los endófitos.

Ensayos *in vitro* hongo endófito vs. hongo patógeno

Los cultivos puros de los hongos que se han utilizado hasta el momento, e.g., endófitos de Hypocreales y Xylariales (objetivo 2), y patógenos de café *Colletotrichum cf. acutatum* y *Mycena citricolor*, se cultivaron por separado en papa dextrosa agar (PDA), y se midieron cada 24 h durante 5 días a 25 ± 2 °C para obtener la tasa de crecimiento control. Cuando los hongos alcanzaron siete días de crecimiento, un disco de 5 mm de diámetro se cortó del borde de la colonia y se transfirió a una nueva placa Petri de 9 mm de diámetro con PDA. Después de dos días, se colocaron los discos miceliales de tamaño idéntico en oposición en la misma placa Petri (en un extremo el endófito y en el otro el patógeno) y se incubaron a 25 ± 2 °C (Royse & Ries, 1978; Landum *et al.*, 2016). Se realizaron cinco réplicas para cada experimento. La inhibición del crecimiento (% GI) del patógeno se midió mediante la siguiente ecuación (Abo-Elyousr *et al.*, 2014):

$$\% \text{ GI} = [(C - T) / C] \times 100$$

Donde, GI = inhibición del crecimiento, C = crecimiento radial del patógeno en el control, T = crecimiento radial del patógeno bajo tratamiento.

Como resultados preliminares, se logró encontrar varios aislamientos que podían controlar los dos patógenos (Figura 2). También, diseñamos una prueba de concepto con uno de los endófitos de Xylariales (*Daldinia*), para comprobar si el control de crecimiento de *M. citricolor* se debía efectivamente a un compuesto químico. Esto en colaboración con la Dra. Giselle Tamayo (CIPRIONA). Hasta el momento, hemos evaluado lo que se denominan sustancias volátiles orgánicas (VOCs por sus siglas en inglés), empleando la microextracción en fase sólida para análisis en cromatografía gaseosa acoplada masas (SPME-GC-MS de sus siglas en inglés). Los resultados obtenidos son muy promisorios, indicando que el hongo endófito exhibe la secreción de sustancias volátiles (VOCs de sus siglas en inglés) que causan un daño visible en las estructuras reproductivas de *M. citricolor*, y que además el endófito produce dos componentes exclusivos como respuesta del enfrentamiento (Figura 3).

Ensayos *in planta* de antagonismo:

Los aislamientos que hayan funcionado mejor *in vitro*, o que se hayan seleccionado basadas en su relación filogenética (Objetivo específico 2), se usaron para los ensayos *in planta*. Las especies seleccionadas fueron de *Trichoderma*. En general, la metodología utilizada fue: Dos o tres bocados del aislamiento del endófito ya esporulado en PDA, se colocaron en bolsas con suelo esterilizado. Luego de una semana, se sembró la plántula o semilla de café. Se confirmó que el cultivo del endófito colonizara internamente los tejidos de las plántulas previo a que se inocule la plántula con

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)

ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

el patógeno. Luego de cada 1-2 meses, se hicieron las inoculaciones del patógeno. Se midió la incidencia y severidad de la enfermedad y se comparó con controles: plántula sin el endófito y plántulas sometidas a fungicida. Se realizaron 10 réplicas del experimento. Incidencia se refiere al número o porcentaje de plántulas afectadas. Severidad se refiere al porcentaje área aproximada de follaje afectada por el patógeno.

- Resultados pruebas contra Mal de Talluelo:

En una cama de germinación, 100 semillas se trataron con el fungicida Rizolex y otras 100 semillas sólo con la *Trichoderma* endófito. Los resultados muestran que la mortalidad sin endófito es significativamente más alta que con endófito (Figura 4).

- Resultados de pruebas contra *Mycena citricolor*:

En colaboración con la Dra. Milagro Granados-Montero (Agronomía), se realizaron pruebas in planta de antagonismo contra el hongo que causa ojo de gallo. Se seleccionaron grupos de 10 plantas con alturas y número de hojas similares por cada tratamiento. Se visitaron fincas en San Marcos de Tarrazú donde hubiera presencia del patógeno. Se recolectó material foliar infectado y se trasladó a Coopetarrazu donde con ayuda de un estereoscopio, se recolectaron gemas de *M. citricolor* y se fueron colocando sobre las hojas de cada planta a razón de 2-3 gemas por hoja y dos a tres hojas por planta según el tamaño de la planta; alcanzando un total de 30 gemas por tratamiento. Para ubicar la posición de las gemas se hicieron círculos con plasticina. Las plantas se colocaron dentro de cajas plásticas de 100 L, y se inundaron con 1 cm de agua. Se atomizó agua sobre la superficie de las hojas y se colocó un sensor de humedad y temperatura dentro de cada caja. Se preinocularon plántulas (desde semilla) con el endófito *Trichoderma rifaii* (T1) y *Trichoderma* sp. (T2). Luego de varias semanas, las plántulas de inocularon con el patógeno *Mycena*. 10 plántulas sin endófito (T3) fue el control.

Luego de dos semanas, se reportaron infecciones en dos plantas (20% incidencia) del tratamiento con *Trichoderma rifaii* (T1) y del tratamiento sin endófito (T3). Los radios (severidad) de la infección causada por *M. citricolor* son de 35 y 60 mm en el T1, mientras que en el T3 son de 55 y 70 mm en el T3. Ninguna de las primeras diez plantas el T2 presentó signos de infección (Figura 5).

Ensayos in planta de promoción del crecimiento:

Con el objetivo de conocer si el endófito *T. rifaii* confiere alguna ventaja al café durante sus primeras etapas, desde la germinación hasta el establecimiento inicial, y también si este endófito interactúa de forma diferencial con variedades de distintos genotipos, conseguimos semillas certificadas del ICAFE de cuatro variedades de café: Catuaí, Caturra, CR95 y Obatá (18 junio 2020). Hicimos pruebas de germinación e inoculación con *T. rifaii*. En estas pruebas no hubo diferencia en el porcentaje de germinación, pero las semillas que no fueron inoculadas con el endófito fueron atacadas durante la germinación por algún hongo no identificado.

Adicionalmente, diseñamos un experimento en colaboración con CoopeTarrazú. Iniciando en el 2020, nuestro colaborador Eduardo Alvarado, de CoopeTarrazú, compró semilla certificada en el ICAFE de cuatro variedades de café, a saber: Caturra, Catuaí, CR95 y Obatá. Posteriormente

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

desarrolló almácigo e inoculó semillas de las cuatro variedades con *T. rifai*. También desarrolló un tratamiento control al que no inoculó con *T. rifai*, sino que aplicó el tratamiento químico Rizolex. Se hicieron mediciones de la germinación y el desarrollo inicial de las plántulas inoculadas vs. las no inoculadas. En este experimento se determinó que *T. rifaii* promueve el desarrollo inicial de las plántulas a partir de su germinación, encontrando diferencias significativas con respecto al control en el desarrollo radical de la plántula en las primeras semanas en la cama de germinación y también se determinó que hay diferencias significativas en la altura de las plantas y el número de hojas luego de dos meses de trasplantadas a bolsas negras de 6X8.

Para determinar si el aislamiento del endófito puede promover el crecimiento, se inocularon plántulas de café de cuatro variedades: Obatá, CR95, Caturra y Catuaí con el hongo endófito de la misma manera que en el punto anterior. Se midió el crecimiento (peso, largo de la raíz y largo de la plántula) de la plántula con y sin el endófito (y sin patógeno). Se realizaron 15 réplicas en el invernadero de Coopetarrazú. Resultados muestran que *Trichoderma rifaii* es un endófito que coloniza las plantas y mejora su crecimiento en todas las variables medidas. En algunos casos, los tratamientos no variaron en algunas variedades (Figura 6).

Ensayos de endófitos contra estrés hídrico:

- Experimentos iniciales de deshidratación con dos variedades de café, Obatá y CR95 en el invernadero 4 de la Finca Experimental Santa Lucía.

Estas plantas las utilizamos para hacer mediciones de prueba con los diferentes equipos, especialmente con el LICOR 6400XT, para poner a punto el instrumental, para entrenar el personal, así como para determinar las variables que debíamos medir en experimentos de deshidratación posteriores. Estos experimentos iniciales fueron muy importantes para generar experiencia en el equipo de trabajo incluyendo estudiantes de tesis y voluntarios y permitió a muchos estudiantes familiarizarse con las necesidades de mantenimiento de las plantas en invernadero, incluyendo riego, fertilización y control fitosanitario. Aún más, esto nos llevó a diseñar e implementar un sistema de riego automatizado, con tres niveles de riego, en colaboración con Juan Rafael Camacho (qdDg), quien fuera el coordinador del Laboratorio de Suelos de la ECA. Utilizamos este sistema de riego para homogeneizar los tratamientos en los experimentos posteriores y para facilitar el mantenimiento de las plantas.

- Efecto del endófito *Trichoderma rifaii* en la tolerancia a la deshidratación en el Híbrido Centroamericano

Habiendo desarrollado experiencia en la ejecución de experimentos de deshidratación (2018, 2019) y teniendo algunos instrumentos nuevos disponibles para hacer mediciones relacionadas al potencial hídrico y la humedad del sustrato, decidimos proceder a evaluar el efecto de un endófito promisorio en las plantas de café. Este endófito es *Trichoderma rifaii* (M17) que ya habíamos determinado en experimentos en laboratorios de la UNA y UCR que tiene la capacidad de controlar varios microorganismos patogénicos *in vitro*. Con el objetivo de determinar si el endófito *Trichoderma rifaii* confiere algún grado de aumento de la tolerancia a la deshidratación *in vivo*, diseñamos y ejecutamos un experimento con plántulas de 9 meses de edad del Híbrido Centroamericano, una nueva variedad desarrollada por el CATIE junto con CIRAD y

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

PROMECAFE, que empieza a tener mucha aceptación entre los caficultores en Costa Rica y Centroamérica. Las plantas de la variedad Híbrido Centroamericano fueron donadas por la compañía Agribiotecnología de Costa Rica en mayo 2020. Estas plantas son genéticamente idénticas debido a que se reproducen mediante embriogénesis somática en condiciones *in vitro*. Para establecer el experimento, la ECA compró las macetas de 20 L y el Laboratorio de Fisiología (FunGen) compró la turba y pagó la mano de obra para transportar tierra y arena al INISEFOR para hacer el sustrato estandarizado (Tierra, arena y turba en proporciones 3:1:1). Las sembramos en el invernadero del INISEFOR. Utilizamos un sistema de riego diseñado e instalado por José Carlos Lopez y con temporizador digital y DataLoggers del LEFET, Biología, UNA.

Para evaluar el efecto del endófito, inoculamos la mitad de las plantas con *Trichoderma rifaii*, distribuyendo las plantas inoculadas de forma aleatoria en el espacio. Aplicamos el inóculo en dos ocasiones (2×10^7 conidios por planta), aplicando el inóculo con una micropipeta con punta estéril de 1000 mL, regando un mL en el tallo de la planta desde su parte superior y otro mL aplicado a la base del tallo para favorecer la cercanía con las raíces. Posteriormente, se tomaron muestras en de las plantas y determinó la presencia de *Trichoderma*, por lo que tenemos evidencia de que la inoculación de estas plantas jóvenes en las condiciones descritas condujo a la colonización de los tejidos de las plantas de café.

Para promover la colonización de los tejidos de las plántulas por parte del endófito y para mantener a las plantas en las condiciones óptimas, nos encargamos semanalmente de verificar el riego, fertilización y control orgánico fitosanitario (no solo por convicción sino por que no queríamos afectar al endófito utilizando ningún tipo de control químico), de manera que eliminamos manual y regularmente a los insectos (áfidos, escamas, larvas de mariposas) utilizando agua a presión. También utilizamos una mezcla de azúcar con ácido bórico en agua que pusimos en tapas de refresco sobre el sustrato, para controlar a las hormigas que dispersan a los áfidos. No aplicamos ningún tipo de control contra hongos, para no afectar la colonización del endófito y además porque no fue necesario debido a que las plantas de Híbrido Centroamericano tienen resistencia genética al hongo de la roya (*Hemileia vastatrix*). Esto por cuanto uno de sus ancestros es el Híbrido de Timor y fueron seleccionadas con ese propósito específico en el programa de mejoramiento.

Realizamos mediciones morfológicas y fisiológicas de control en setiembre y octubre 2020, y durante el experimento de deshidratación utilizando el IRGA LICOR 6400XT (LICOR, Lincoln, Nebraska) para medir múltiples variables relacionadas a la actividad fotosintética de las plantas, el SPAD Minolta 502 (Konica Minolta Sensing Europe B.V) para monitorear la concentración de clorofila en las plantas, el medidor analógico del contenido relativo de la humedad en el sustrato (Kelway Modelo HB-2, Kel Instruments Co., Teaneck, New Jersey) y sensores digitales de la humedad del sustrato (Waterscout Spectrum SM100, Spectrum Technologies, Aurora, IL), conectados a un lector FieldScout (Spectrum Technologies, Aurora, IL). También mantuvimos dos DataLoggers (HOBO) en el invernadero para monitorear las condiciones ambientales de temperatura y humedad durante el experimento. Finalmente, medimos el potencial hídrico de las plantas usando una bomba de presión tipo Scholander Modelo 600D conectado a un tanque de Nitrógeno gaseoso (PMS Instrument Company, Oregon, USA) del LEFET, Biología, UNA. Cada bloque tenía plantas con los 4 tratamientos. Antes de cada medición se anotó directamente en el registro de datos del IRGA la línea, bloque y

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

tratamientos de cada planta, lo que es importante para hacer la verificación de datos comparando la identidad de cada medición con los registros de humedad y otros instrumentos.

Para el experimento de deshidratación utilizamos 56 plantas del Híbrido Centroamericano, divididas en cuatro tratamientos con igual número de repeticiones, 1. Con riego e inoculadas con *T. rifaii*, 2. Con riego pero sin *T. rifaii*, 3. Sin riego e inoculadas con *T. rifaii* y 4. Sin riego y sin *T. rifaii*. Las plantas con riego se mantuvieron con el sustrato a capacidad de campo y con una medida del contenido relativo de humedad superior al 80% durante todo el tiempo del experimento. Las plantas sin riego fueron perdiendo paulatinamente la humedad en el sustrato, lo que medimos semanalmente usando sensores analógicos y digitales. Esto es muy importante debido a que algunas veces la humedad del sustrato varía debido a la posición de la maceta en el invernadero, donde puede estar más a la sombra o ser afectada por llovizna (lo que ocurrió en Diciembre 2020), o debido a la variación en el área foliar de las plantas y su actividad de intercambio gaseoso, que son diferencias que aumentan conforme avanza el experimento. Esto nos permitió reclasificar a unas pocas plantas en los análisis si su humedad relativa del sustrato se encuentra por encima de un 65%. También medimos la variación en la concentración de clorofila, signos de marchitez de las plantas y realizamos observaciones de su estado general durante el experimento. La variación en la concentración de clorofila ocurre debido a que la falta de agua afecta la capacidad de absorber nutrientes y también debido a que uno de los primeras respuestas al estrés hídrico es la disminución de la expresión de los genes relacionados a la fotosíntesis.

De todas las plantas sembradas, solo murieron 5 que estaban muy cerca del inicio de los tubos de riego (donde la presión era mayor) y de la pared del invernadero, por lo tanto con más humedad y sombra. Estas plantas mostraron marchitez en sus hojas y luego se secaron y murieron sin mostrar lesiones en los tejidos del vástago lo que sugiere que tuvieron un problema en la raíz. De las 5 plantas que murieron 4 no habían sido inoculadas con *T. rifaii*, mientras que las plantas inoculadas que se encontraban en la misma posición sobrevivieron. Esta es solo una observación, con muy pocas plantas para poder hablar en términos estadísticos, pero tal vez podría indicar que *Trichoderma rifaii* tiene el potencial de proteger a las plantas jóvenes que se encuentran en condiciones semejantes en el campo. Para estar seguros de esto habrá que realizar experimentos con ese objetivo específico.

Las plantas inoculadas con *T. rifaii* en el tratamiento de deshidratación (*Trichoderma* + Sequía, TS) tuvieron un valor significativamente mayor de asimilación de carbono ($x = \pm$) que las plantas no inoculadas (NoT + S; Prueba $t < 0.01$). Por el contrario, no hubo diferencia significativa en la asimilación entre las plantas testigo inoculadas vs. las no inoculadas cuando estas tenían riego constante durante el experimento (Prueba $t > 0.05$). Lo que esto quiere decir es que las plantas inoculadas con *T. rifaii* continúan realizando fotosíntesis, si bien es cierto a un bajo nivel, lo que les permitiría crecer más.

Una observación interesante que realizamos, debido a que estuvimos midiendo la humedad del sustrato de todas las macetas constantemente, es que el sustrato de las plantas inoculadas con *Trichoderma rifaii* parecía estar más compacto, o mantener una mejor textura, durante el

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)

ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

tratamiento de deshidratación, mientras que las de las no inoculadas se sentía mucho másuelto, como polvo o arena fina. De hecho, encontramos una diferencia altamente significativa entre el contenido relativo de humedad en el sustrato de las macetas de plantas inoculadas con *T. rifaii* ($x = 55 \pm 8.19\%$) vs. las no inoculadas ($x = 39 \pm 10.35\%$) (Prueba t, $p < 0.001$).

La Figura 7 muestra los resultados de otro ensayo de deshidratación que se hizo en Coopetarrazú. 50 plántulas con endófito y 50 sin endófito fueron sometidas a deshidratación (falta de riego por un mes). Luego de un mes, 100% de las plántulas sin endófitos murieron, en comparación a 50% de las plántulas con endófito.

Objetivo 4. Determinar las posibles enzimas asociadas a micoparasitismo por las cuales el endófito (específicamente *Trichoderma*) protege a la planta de café.

Preparación del medio de cultivo para detección de quitinasas

Se utilizó el medio de cultivo para detección de quitinasas reportado por Agrawal & Kotasthane (2012), compuesto por $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.3 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (3.0 g/L), KH_2PO_4 (2.0 g/L), ácido cítrico (1.0 g/L), agar (15 g/L), Tween 80 (200 μ L), quitina coloidal (4.5 g/L) y morado de bromocresol (0.15 g/L). Se agregó NaOH (1M) hasta un pH = 4.7 y se autoclavó a 121°C por 15 minutos. Se utilizaron placas de 90 mm que fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

Selección de hongos con potencial quitinolítico

Se realizaron pruebas preliminares con hongos del género *Trichoderma* pertenecientes a la colección de hongos del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) y del Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA). Posteriormente, mediante la revisión de literatura, se seleccionó una lista de 30 hongos con potencial actividad quitinasa, pertenecientes a la colección de hongos endófitos aislados de Rubiáceas del CIPRONA (Cuadro 2). Todos los hongos provenían de cultivo preservado a -80°C.

Pruebas de detección de quitinasas

Cada hongo fue inoculado en una placa con el medio de detección de quitinasas. Estos se incubaron a 27°C durante una semana. Al día seis, se registró una fotografía para definir el aumento del halo de viraje de color de amarillo a morado, según la producción de las quitinasas. Los hongos se clasificaron en una escala de 0 a 5, a partir de la escala de viraje mostrada en la Figura 8.

Resultados:

El ensayo con siete especies de *Trichoderma* permitió corroborar que el método para determinación de quitinasas en medio sólido reportado es replicable y confiable. Por medio de este ensayo, se determinó que las especies *T. asperellum*, *T. rifaii*, *T. inhamatum*, *Trichoderma* G1C y *Trichoderma* G7T son productores importantes de quitinasas, ya que permiten observar el viraje del medio a color morado en toda la placa. Esto

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

implica que se liberan muchas quitinasas al medio que rompen la quitina coloidal ocasionando el viraje del indicador. Por su parte, en el ensayo con hongos endófitos de Rubiáceas se encontró que otras tres especies de *Trichoderma* también son productoras importantes de quitinasas, por lo que se les asignó un 5 (Cuadro 2).

La efectividad de los hongos del género *Trichoderma* en la producción de quitinasas está relacionado con el ambiente altamente competitivo en el que se desarrollan: el suelo; donde destacan por la variedad de mecanismos que poseen para dominar este nicho. La liberación de enzimas quitinolíticas al ambiente externo es una de sus estrategias, las cuales les permiten micoparasitar y dañar otros hongos para acceder a nutrientes, así como activar cascadas de señales relacionadas con protección. Además, su alto potencial quitinolítico puede relacionarse con la liberación de distintos tipos de quitinasas; en *T. harzianum*, por ejemplo, se han identificado al menos siete quitinasas individuales. Lo anterior, conlleva a que muchas especies de este género estén reportadas como productores de estas enzimas.

Por otro lado, se encontraron algunas especies de otros géneros que son productoras de quitinasas, a menor nivel, incluyendo: *Aspergillus sydowii*, *Fusarium concentricum*, *Fusarium solani*, *Tolypocladium sp.*, *Penicillium steckii* y *Lasiodiplodia citricola* (Cuadro 1). Cabe destacar que la habilidad de producir estas enzimas podría ser cepa dependiente según la planta hospedera, como se observa con las cepas de *Cladosporium delicatulum*. La cepa aislada de la planta *Simira maxonii* (10B) produce quitinasas de forma leve, mientras que la cepa aislada de *Coutarea hexandra* (17C) no produce las enzimas. Esto podría derivarse de las condiciones ecológicas en las que se desarrolla cada hongo en su planta hospedera, ya que muchas veces deben competir contra entomopatógenos, patógenos latentes y otros mutualistas estrictos de la planta; y en otras ocasiones participan en la defensa de la planta ante fitopatógenos.

En conclusión, la actividad quitinasa de los hongos se puede detectar cualitativamente mediante un método sencillo en estado sólido que implica el viraje del indicador de pH morado de bromocresol. Este método permitió determinar que algunos hongos de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Lasiodiplodia* producen estas enzimas, por lo que podrían ser utilizados en la obtención de quitinasas para diversas aplicaciones. De los hongos evaluados, el género *Trichoderma* posee la mayor cantidad de especies productoras de quitinasas.

PRODUCTOS hasta el momento:

Estudiantes:

UCR:

Doctorado: Efraín Escudero Leyva.

Pregrado: Gabriel Jiménez, Juan Campos, José Fonseca, Paula López, Alice Vega, Randoll Rojas.

UNA:

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

Posgrado: Luis Diego Arias Chavarría

Licenciatura: Luis Diego Fernández Araya, José Carlos López, Daniela Abrego, Marcelo Salazar Hernández.

Pregrado: Mónica Camareno, Milton Quesada

Publicaciones:

- Escudero-Leyva, E., M.M. Granados, E. Alvarado, Chaverri, P. Fungicide tolerance of Rubiaceae fungal endophytes with antagonistic activity against two coffee pathogens (en preparación)
- Montero-Vargas, M., Umaña-Jiménez, J., Escudero-Leiva, E., & Chaverri, P. 2020. Phylogenetic analysis of ITS data from endophytic fungi using massive parallel Bayesian tree inference with Exabayes. *Revista Tecnología En Marcha*, 33(5): 74-79.
- Montero-Vargas, M., Escudero-Leyva, E., Díaz-Valerio, S., Chaverri, P. 2020. Step-by-step pipeline for the ecological analysis of endophytic fungi. *Current Protocols in Microbiology* 56(1):e96.

Presentaciones en congresos nacionales, internacionales y otras actividades:

Charla magistral:

- 2020. "De organismos a fitobiomas y 'omics', en el descubrimiento de agentes de control biológico." Quinto Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad. Guayaquil, Ecuador. 5-8 Oct.
- 2018. Chaverri, P. "Evolution of protective mutualism in plant-fungal endosymbiosis." 11th International Mycological Congress. San Juan, Puerto Rico.

Charlas invitadas:

- 2020. "Mycobiomes of natural forests and applications in biological control of plant diseases." Charla invitada para el programa de maestría en Manejo de Recursos Naturales y Producción Tecnológica (ITCR). Nov. 21.
- 2020. "Save Tropical Forests and Drink Your Coffee, Too." Charla invitada en Audubon Naturalist Hour. Washington D.C., USA. Set. 23.
- 2020. "The mycobiome of wild Rubiaceae to improve the health of coffee plants." Charla invitada para la serie de seminarios BioFrontiers seminar de la University of North Texas, Department of Biological Sciences. Set. 2020.
- 2019. Chaverri, P. "Protective mutualism in the endosymbiosis plant-fungus, and applications in plant protection." IV Simpósio de Fitopatologia da UnB, Fitopatologia do Plantio a Pos-Colheita, Universidade de Brasília, Brasil.
- 2019. Chaverri, P. "Protective mutualism in the endosymbiosis plant-fungus, and applications in plant protection." Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Embrapa CENARGEN. Brasília, Brasil.
- 2019. Chaverri, P. "Protective mutualism in the endosymbiosis plant-fungus, and applications in plant protection." Invited talk for seminar series. Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasil.

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

Charlas:

- 2019. H. Castillo-Gonzalez, A. Alonso, P. Staniczenko, J. Slot, P. Chaverri. Unraveling the endophytic diversity associated with Rubiaceae tropical plants and the ecological factors driving community assemblage. Mycological Society of America annual meeting. Minneapolis, MN, USA.
- 2019. E. Escudero, M.M. Granados, E. Alvarado, J.C. Slot, A.P. Alonso, P. Chaverri. Endophytic *Trichoderma* with fungicide tolerance. Mycological Society of America annual meeting. Minneapolis, MN, USA.

Posters:

- 2020. Escudero-Leyva, E., Tamayo-Castillo, G., Chaverri, P. Differential in volatile organic compound profiles in a fungus-fungus interaction. X Latin American Mycological Congress. Santiago, Chile. Dec.
- 2019. E. Escudero, P. Juarez, M.M. Montero, P. Chaverri. NrDNA ITS phylogeny of culture-dependent endophytic fungi of wild Rubiaceae in Costa Rica. Foro de la Facultad de Ciencias, UCR. Noviembre.
- 2018. H. Castillo-González, M. Steward, P. Juárez, E. Escudero, J. Slot, A. P. Alonso, P. Chaverri. Effect of the leaf developmental stage on the chemical and fungal endophytic composition in wild Rubiaceae. International Mycological Congress. San Juan, Puerto Rico.
- 2018. E. Escudero, H. Castillo González, P. Juárez, M. D. M. Granados, E. Alvarado, P. Chaverri. A first look at culture-dependent endophytic fungal diversity of wild Rubiaceae in Costa Rica. International Mycological Congress. San Juan, Puerto Rico.

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

Cuadro 1. Lista de hongos endófitos colectados para el proyecto FEES. Los hospederos sin nombre es porque no son Rubiaceae.

Código	Orden	Familia	Género y Especie	Hospedero (Rubiaceae)
10A	Xylariales	Xylariaceae	Xylariaceae_sp	<i>Simira maxonii</i>
10B	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium_delicatulum	<i>Simira maxonii</i>
10C	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium_halotolerans	<i>Simira maxonii</i>
11A	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium_tenuissimum	<i>Genipa americana</i>
13A	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium_concentricum	<i>Palicourea tetreagona</i>
13B	unidentified	unidentified	Fungi_sp	<i>Palicourea tetreagona</i>
13C	Hypocreales	Cordycipitaceae	Engyodontium_album	<i>Palicourea tetreagona</i>
13D	Hypocreales	Cordycipitaceae	Engyodontium_album	<i>Palicourea tetreagona</i>
13E	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus_sydowii	<i>Palicourea tetreagona</i>
15A	unidentified	unidentified		<i>Calycophyllum candidissimum</i>
15B	Pleosporales	Didymellaceae	Stagonosporopsis_dennisii	<i>Calycophyllum candidissimum</i>
16A	Polyporales	Polyporaceae	Lentinus_crinitus	<i>Coutarea hexandra</i>
16B	unidentified	unidentified	Agaricomycetes_sp	<i>Coutarea hexandra</i>
16C	Capnodiales	Mycosphaerellaceae	Mycosphaerella_ellipsoidea	<i>Coutarea hexandra</i>
17A	Xylariales	Beltraniaceae	Beltrania_pseudorhombica	<i>Coutarea hexandra</i>
17B	unidentified	unidentified	Fungi_sp	<i>Coutarea hexandra</i>

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

17C	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium_delicatulum	<i>Coutarea hexandra</i>
19A	unidentified	unidentified	Agaricomycetes_sp	<i>Genipa americana</i>
1A	unidentified	unidentified		<i>Rhandia genipoides</i>
1B	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium_halotolerans	<i>Rhandia genipoides</i>
21A	unidentified	unidentified	Agaricomycetes_sp	<i>Randia thurberi</i>
23A	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma_inhamatum	<i>Calycophyllum candidissimum</i>
26A	Polyporales	unidentified	Polyporales_sp	<i>Chomelia spinosa</i>
26B	Polyporales	unidentified	Polyporales_sp	<i>Chomelia spinosa</i>
27A	Polyporales	Meruliaceae	Ceriporia_lacerata	<i>Alibertia edulis</i>
27B	Polyporales	Meruliaceae	Phanerochaete_sp	<i>Alibertia edulis</i>
27C	Polyporales	Meruliaceae	Phlebiopsis_sp	<i>Alibertia edulis</i>
27D	unidentified	unidentified	Agaricomycetes_sp	<i>Alibertia edulis</i>
27E	unidentified	unidentified	Agaricomycetes_sp	<i>Alibertia edulis</i>
28A	Xylariales	Xylariaceae	Xylariaceae_sp	<i>Alibertia edulis</i>
29A	Polyporales	unidentified	Polyporales_sp	<i>Chomelia spinosa</i>
2A	Xylariales	Sporocadaceae	Neopestalotiopsis_saprophytica	<i>Psychotria panamensis</i>
31A	Pleosporales	Thyridariaceae	Thyridaria_acaciae	<i>Randia thurberi</i>
34A	Polyporales	unidentified	Polyporales_sp	<i>Genipa americana</i>
35A	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium_delicatulum	<i>Randia thurberi</i>

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

36A	unidentified	unidentified		<i>Genipa americana</i>
37A	unidentified	unidentified		<i>Randia thurberi</i>
37B	unidentified	unidentified	Agaricomycetes_sp	<i>Randia thurberi</i>
37C	Conioscyphales	unidentified	Conioscyphales_sp	<i>Randia thurberi</i>
38A	Polyporales	Meruliaceae	Phanerochaete_bambusicola	<i>Randia thurberi</i>
38B	Russulales	Peniophoraceae	Peniophora_laxitexta	<i>Randia thurberi</i>
3A	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus_sydowii	<i>Pentagonia monocaulis</i>
3B	Hypocreales	Cordycipitaceae	Simplicillium_lamellicola	<i>Pentagonia monocaulis</i>
40A	unidentified	unidentified	Fungi_sp	<i>Ixora floribunda</i>
40B	unidentified	unidentified	Fungi_sp	<i>Ixora floribunda</i>
41A	unidentified	unidentified		<i>Ixora floribunda</i>
41B	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium_halotolerans	<i>Ixora floribunda</i>
42A	Xylariales	Xylariaceae	Biscogniauxia_sp	<i>Faramea occidentalis</i>
42B	unidentified	unidentified		<i>Faramea occidentalis</i>
44A	unidentified	unidentified		<i>Faramea occidentalis</i>
44B	Xylariales	Xylariaceae	Biscogniauxia_atropunctata	<i>Faramea occidentalis</i>
44C	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium_delicatulum	<i>Faramea occidentalis</i>
47A	unidentified	unidentified	Ascomycota_sp	<i>Palicourea calidicola</i>
47B	unidentified	unidentified		<i>Palicourea calidicola</i>

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

47C	Hypocreales	unidentified	Hypocreales_sp	<i>Palicourea calidicola</i>
47D	Eurotiales	Aspergillaceae	Penicillium_miczynskii	<i>Palicourea calidicola</i>
48A	unidentified	unidentified		<i>Warszewiczia coccinea</i>
4A	Diaporthales	Schizoparmaceae	Coniella_wangiensis	<i>Randia genipoides</i>
4B	Hypocreales	Ophiocordycipitaceae	Tolyocladium_sp	<i>Randia genipoides</i>
51A	Xylariales	Xylariaceae	Annulohypoxyton_stygius	<i>Psychotria panamensis</i>
53A	unidentified	unidentified		<i>Faramea multiflora</i>
54A	unidentified	unidentified		<i>Warszewiczia coccinea</i>
54B	Xylariales	Xylariaceae	Xylariaceae_sp	<i>Warszewiczia coccinea</i>
54C	Xylariales	Xylariaceae	Hypoxyton_petrinae	<i>Warszewiczia coccinea</i>
56A	Xylariales	Xylariaceae	Xylariaceae_sp	<i>Coussarea hondensis</i>
57A	Xylariales	Xylariaceae	Xylaria_moelleroclavus	<i>Genipa americana</i>
57B	unidentified	unidentified		<i>Genipa americana</i>
58A	unidentified	unidentified	Ascomycota_sp	<i>Coffea canephora</i>
59A	unidentified	unidentified		<i>Coffea canephora</i>
5A	unidentified	unidentified		<i>Simira maxonii</i>
5B	Xylariales	Xylariaceae	Annulohypoxyton_stygius	<i>Simira maxonii</i>
5C	unidentified	unidentified		<i>Simira maxonii</i>
60A	Sordariales	Lasiochaeraceae	Lasiochaeraceae_sp	<i>Coffea canephora</i>

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

60B	unidentified	unidentified	Fungi_sp	<i>Coffea canephora</i>
61A	unidentified	unidentified	Ascomycota_sp	<i>Hamelia patens</i>
61B	unidentified	unidentified	Ascomycota_sp	<i>Hamelia patens</i>
61C	Xylariales	Xylariaceae	Nemania_plumbea	<i>Hamelia patens</i>
63A	Polyporales	Meripilaceae	Rigidoporus_vinctus	<i>Genipa americana</i>
63B	Polyporales	Polyporaceae	Lentinus_crinitus	<i>Genipa americana</i>
63C	unidentified	unidentified		<i>Genipa americana</i>
63D	unidentified	unidentified		<i>Coussarea hondensis</i>
65A	unidentified	unidentified		
67A	unidentified	unidentified		<i>Psychotria microbotrys</i>
68A	unidentified	unidentified		<i>Psychotria microbotrys</i>
68B	unidentified	unidentified		
69A	Polyporales	Coriolaceae	Trametes_cubensis	<i>Chimarris parviflora</i>
69B	Eurotiales	Aspergillaceae	Penicillium_citrinum	
6A	Eurotiales	Aspergillaceae	Penicillium_steckii	<i>Palicourea tetreagona</i>
70A	Xylariales	Xylariaceae	Annulohypoxylon_stygium	<i>Duroia costaricensis</i>
70B	Trichosphaeriales	Trichosphaeriaceae	Nigrospora_oryzae	<i>Duroia costaricensis</i>
74A	unidentified	unidentified	Ascomycota_sp	
75A	unidentified	unidentified		

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

75B	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus_hongkongensis	
75C	Xylariales	Xylariaceae	Xylariaceae_sp	
76A	unidentified	unidentified		
7A	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium_cladosporioides	<i>Palicourea tetreagona</i>
80A	unidentified	unidentified		
82A	unidentified	unidentified		
83A	Xylariales	Xylariaceae	Hypoxylon_monticulosum	
85A	Xylariales	Xylariaceae	Hypoxylon_monticulosum	
85B	unidentified	unidentified		
85C	Diaporthales	unidentified	Diaporthales_sp	
85D	Xylariales	Xylariaceae	Hypoxylon_monticulosum	
85E	unidentified	unidentified		
85F	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus_hongkongensis	
86A	unidentified	unidentified	Agaricomycetes_sp	
86B	unidentified	unidentified		
86C	Polyporales	Coriolaceae	Trametes_cubensis	
87A	Trichosphaeriales	Trichosphaeriaceae	Nigrospora_oryzae	
87B	unidentified	unidentified		
87C	unidentified	unidentified		

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

88A	Xylariales	Xylariaceae	Hypoxylon_monticulosum	
88B	unidentified	unidentified		
88C	Xylariales	Xylariaceae	Hypoxylon_monticulosum	
88D	unidentified	unidentified		
88E	unidentified	unidentified		
88F	unidentified	unidentified	Ascomycota_sp	
88G	unidentified	unidentified		
89A	unidentified	unidentified	Ascomycota_sp	
89B	unidentified	unidentified		
89C	unidentified	unidentified		
89D	unidentified	unidentified		
89E	Xylariales	Xylariaceae	Xylariaceae_sp	
89F	unidentified	unidentified		
89G	Venturiales	Symptoventuriaceae	Ochroconis_macrozambiae	
8A	Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium_delicatulum	<i>Hamelia patens</i>
90A	Xylariales	Xylariaceae	Xylariaceae_sp	
92A	unidentified	unidentified		
9A	unidentified	unidentified		<i>Randia genipoides</i>
9B	unidentified	unidentified		<i>Randia genipoides</i>

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

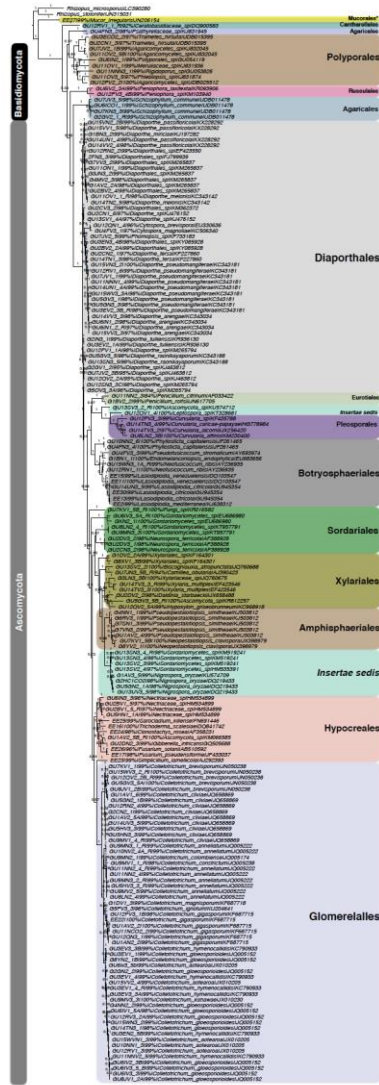
V.02

9C	unidentified	unidentified		<i>Randia genipoides</i>
----	--------------	--------------	--	--------------------------

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

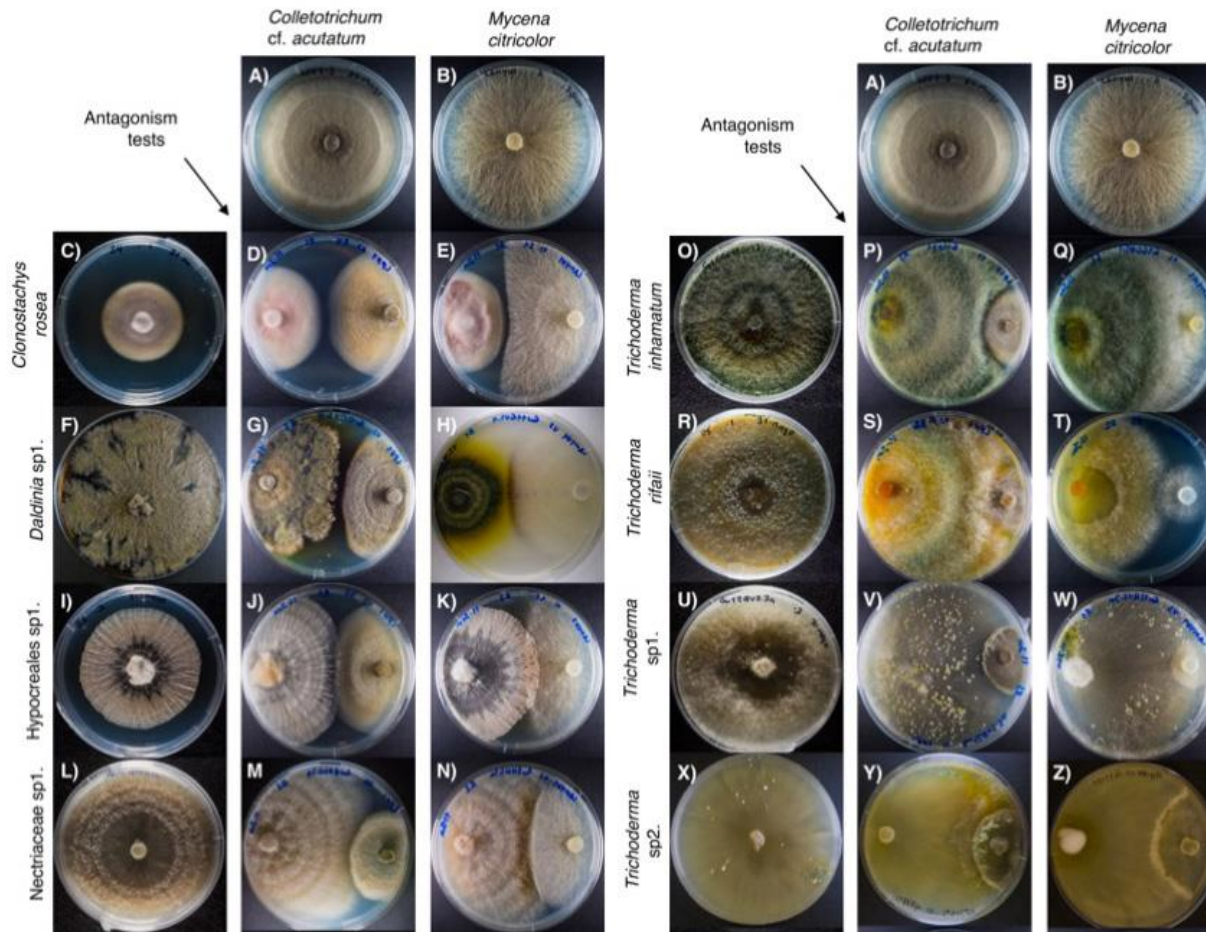
Figura 1. Filogenia basada en Inferencia Bayesiana de ITS nrDNA.



**CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN**

V.02

Figura 2. Ensayos de antagonismo in vitro, donde se enfrentaron los endófitos contra los patógenos. En las placas con las confrontaciones (D, E, G, H, J, K, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y, Z), la colonia de la izquierda es el endófito, y la de la derecha es el patógeno. Los controles son: los endófitos solos (C, F, I, L, O, R, U, X) y los patógenos solos (A, B). Todas las imágenes fueron tomadas a los 5 días de crecimiento.



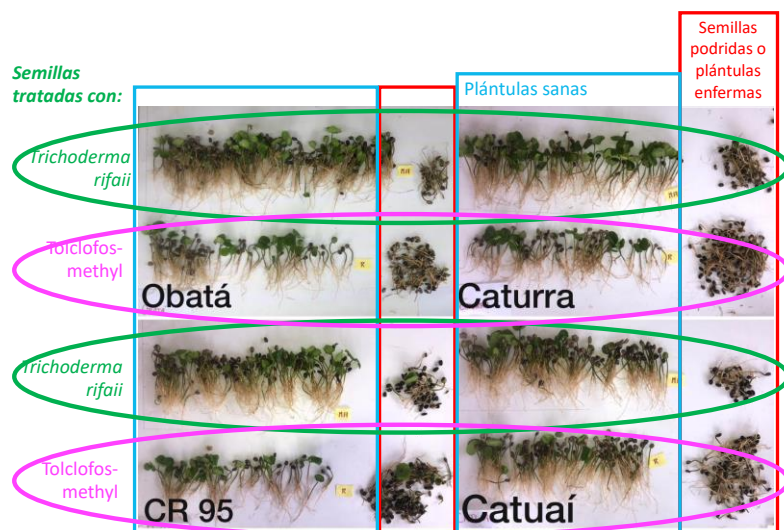
**CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN**

V.02

Figura 3. A. Prueba de enfrentamiento entre el patógeno (sección clara) y el endófito (sección oscura); se muestra la sección del enfrentamiento, de la cual se tomaron muestras para analizar por la técnica SPME-GC-MS. B. Estructuras sexuales de *M. citricolor* sanas (control). C. Estructuras sexuales expuestas al endófito.



Figura 4. Mortalidad de semillas y plántulas (mal de talluelo pre- y post-emergente) con endófito (*Trichoderma rifaii*) y con el fungicida Rizolex.



CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE) ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

Figura 5. **A)** Gema de *M. citricolor* en tratamiento control. **B)** Radio de infección en tratamiento control, T3 (70 mm) después de una semana. **C)** Inicio del proceso de infección en tratamiento control (T3) después de tres días. **D)** Radio de infección en tratamiento con *T. rifaii* (35 mm) después de una semana.

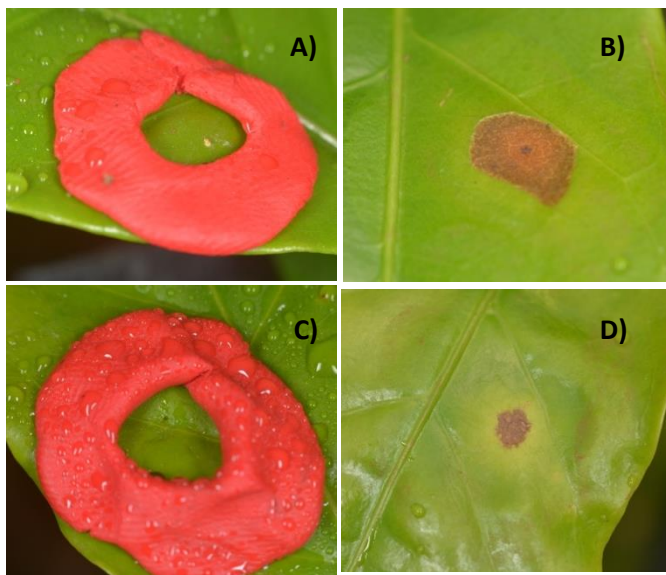
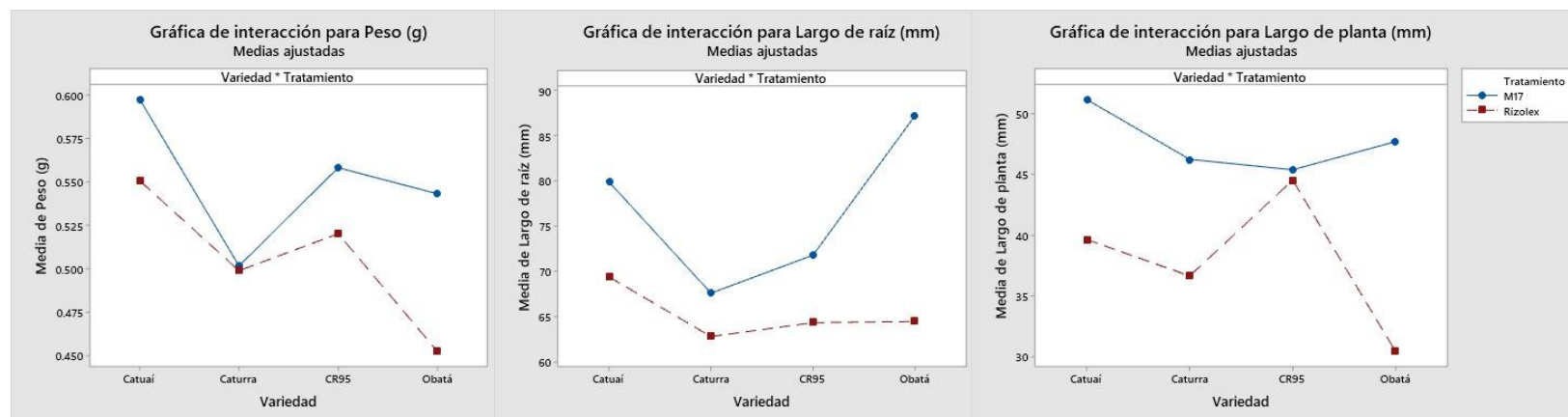


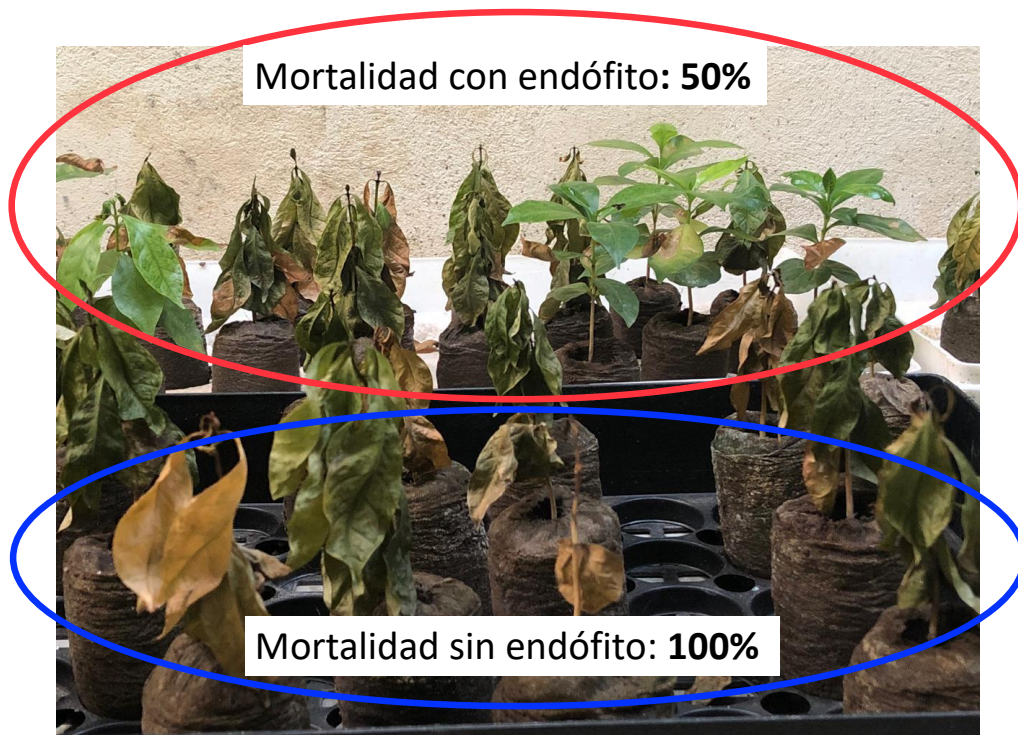
Figura 6. Efectos del endófito *Trichoderma rifaii* (M17) en el crecimiento de plántulas de café. Plántulas con endófito y otras tratadas con fungicida (Rizolex), fueron comparadas.



**CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN**

V.02

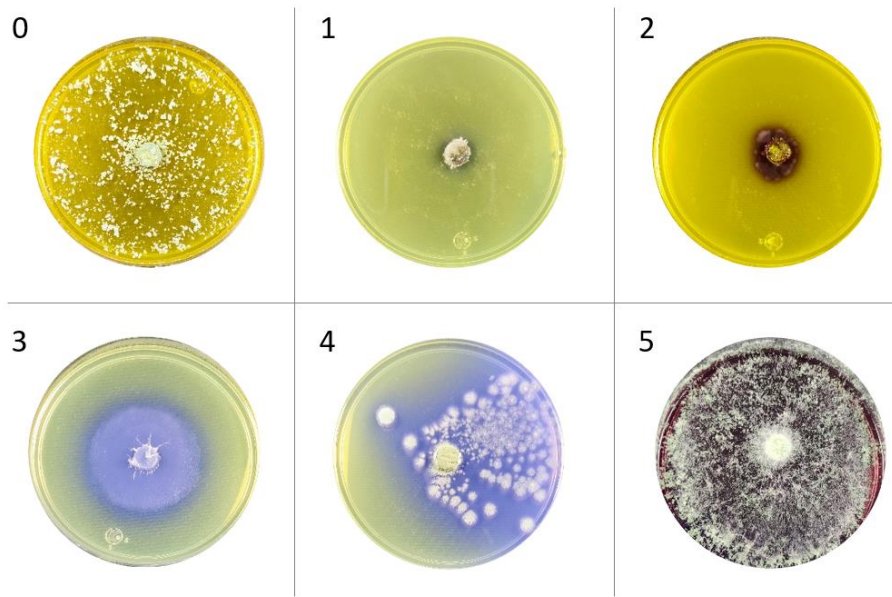
Figura 7. Mortalidad después de 30 días, de plántulas deshidratadas, con y sin endófito *T. rifaii*.



**CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN**

V.02

Figura 8. Escala de viraje de actividad quitinolítica. 5 representa una alta actividad quitinolítica.



Cuadro 2. Clasificación de los hongos del género *Trichoderma* y hongos endófitos de Rubiáceas según su actividad quitinasa evaluada cualitativamente (0-5). 5 representa una alta actividad quitinolítica.

Aislamiento	Hongo	Clasificación
-	<i>Trichoderma asperellum</i>	5
-	<i>Trichoderma reseei</i>	3
-	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0
-	<i>Trichoderma rifaii</i>	5
-	<i>Trichoderma inatum</i>	5

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

Aislamiento	Hongo	Clasificación
G1C	<i>Trichoderma sp.</i>	5
G7T	<i>Trichoderma sp.</i>	5
85F	<i>Aspergillus hongkongensis</i>	1
3A	<i>Aspergillus sydowii</i>	2
13E	<i>Aspergillus sydowii</i>	4
CT27	<i>Mucor irregularis</i>	0
CT17	<i>Fusarium pseudensiforme</i>	0
13A	<i>Fusarium concentricum</i>	4
CT26	<i>Fusarium solani</i>	0
CT19	<i>Fusarium solani</i>	3
4B	<i>Tolyposcladium sp.</i>	3
CT24	<i>Clonostachys rosea</i>	0
7A	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2
10B	<i>Cladosporium delicatulum</i>	2
17C	<i>Cladosporium delicatulum</i>	0
10C	<i>Cladosporium halotolerans</i>	2
41B	<i>Cladosporium halotolerans</i>	0
11A	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	2
69B	<i>Penicillium citrinum</i>	0
6A	<i>Penicillium steckii</i>	4
CT05	<i>Trichoderma scalesiae</i>	2
GU12QV2_3A	<i>Trichoderma sp.</i>	5
G7TCO1	<i>Trichoderma strigosellum</i>	5
G1CCO1	<i>Trichoderma harzianum</i>	5
23A	<i>Trichoderma inhamatum</i>	0
GU2CN3_2	<i>Neurospora terricola</i>	0
GU2DV3_1	<i>Neurospora terricola</i>	0
CT9	<i>Lasiodiplodia citricola</i>	4
CT13	<i>Lasiodiplodia citricola</i>	2

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

Aislamiento	Hongo	Clasificación
CT10	<i>Lasiodiplodia citricola</i>	2
CT2	<i>Lasiodiplodia mediterranea</i>	0
17A	<i>Beltrania pseudorhombica</i>	0

CONSEJO NACIONAL DE RECTORES (CONARE)
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

V.02

5. Actividades de integración de los equipos interuniversitarios realizadas:

Se realizaron giras en conjunto con investigadores y estudiantes de ITCR, UNED, UCR y UNA. La UNED y la UCR han trabajado en conjunto con los aislamientos de los hongos. Se han realizado reuniones de coordinación.

6. Observaciones o consideraciones adicionales:

7. Informe financiero (adjuntar para efectos de la evaluación los informes financieros respectivos aportados por cada universidad participante).

Fecha

Firma del/la coordinador(a)