

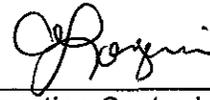
TESIS DEFENDIDA POR
José Abraham Obrador Sánchez
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dra. Rufina Hernández Martínez
Director del Comité



Dr. Jesús Arturo Martín Barajas
Miembro del Comité

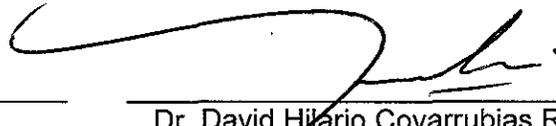


Dra. Ernestina Castro Longoria
Miembro del Comité



Dra. Rufina Hernández Martínez

*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias de la Vida con Orientación
en Microbiología*



Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

24 de Noviembre de 2011

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
DE LA VIDA**

**COMPORTAMIENTO DE *BOTRYOSPHAERIA* SPP. EN PRESENCIA DE
MADERA DE VID: INICIO DE LA COLONIZACIÓN Y CARACTERÍSTICAS
MICROSCÓPICAS**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

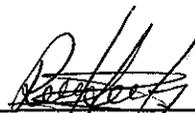
JOSÉ ABRAHAM OBRADOR SÁNCHEZ

Ensenada, Baja California, México, Noviembre de 2011.

RESUMEN de la tesis de **José Abraham Obrador Sánchez**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS DE LA VIDA con orientación en MICROBIOLOGÍA. Ensenada, Baja California. Noviembre de 2011.

**Comportamiento de *Botryosphaeria* spp. en presencia de madera de vid:
inicio de la colonización y características microscópicas**

Resumen aprobado por:



Rufina Hernández Martínez
Directora de Tesis

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos más importantes en Baja California, México; éste Estado contribuye con el 90% de la producción del vino nacional, teniendo una derrama económica de 140 millones de dólares anuales. Las enfermedades de la madera ocasionadas por hongos, son un serio problema para la industria vitivinícola; dentro de éstas destacan las enfermedades producidas por la familia *Botryosphaeriaceae*. Las especies de esta familia incluyen hongos cosmopolitas con un amplio rango de hospederos y distintos grados de virulencia. Con el objetivo de conocer y comparar el comportamiento de tres *Botryosphaeria* spp. en presencia de madera de vid *in vitro* e *in planta*, se seleccionaron tres cepas que difieren en su nivel de virulencia: *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma (alta), *Diplodia seriata* BY06-3 (intermedia) y *Diplodia corticola* SASI12-3 (baja). En ensayos *in vitro*, partiendo de esporas y utilizando medio mínimo de Vogel con y sin madera, se compararon el crecimiento, la germinación, el número de hifas y la biomasa; encontrándose que la presencia de madera en el medio aumentó todos los parámetros analizados en las tres especies; la especie que mostró los valores más altos fue la más virulenta: *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma. La microscopía confocal y de epifluorescencia usando los fluorocromos FM4-64 y calcofluor, permitieron observar algunas características celulares de las cepas y revelaron la falta de lípidos y quitina en las cubiertas de las esporas pigmentadas. La microscopía de epifluorescencia y electrónica de barrido de troncos de vid inoculados con esporas a las 12, 24 o 48 h, revelaron el uso de tráqueas como sitio preferente de entrada y algunas diferencias en el crecimiento y la ramificación de la hifas entre las especies. Por otro lado, *L. theobromae* mostró la producción de celulosas al inicio de la interacción, degradando el tejido de la planta e invadiendo tejido parenquimatoso, mientras que *D. seriata* y *D. corticola* no dañaron el tejido vegetal.

Palabras Clave: *Vitis vinifera*, microscopía, enfermedades de la madera

ABSTRACT of the thesis presented by **José Abraham Obrador Sánchez** as a partial requirement to obtain the **MASTER'S DEGREE IN LIFE SCIENCE** with orientation in **MICROBIOLOGY**. Ensenada, Baja California, México Noviembre de 2011.

Behavior of *Botryosphaeria* spp. in the presence of grapevine wood: initial colonization and morphological characteristics

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the most economically important crops in Baja California, Mexico; it contributes with 90% of the wine production, having an economic impact of 140 million dollars annually. Moreover, the industry has a high social impact, generating about 7 thousand jobs. Trunk diseases fungi are a serious problem for the wine and grape industry. Among the most important are those caused by the Botryosphaeriaceae. Species of this family include cosmopolitan fungus with a wide host range and virulence of different degrees. In order to compare the behavior of three *Botryosphaeria* spp. in the presence of grapevine wood *in vitro* and *in planta*, we selected three strains that differ in their level of virulence: *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma (high), *Diplodia seriata* BY06-3 (middle) and *Diplodia corticola* SAS12-3 (low). In *in vitro* tests, using spores grown onto Vogel's minimal medium supplemented with (CM) and without wood (SM), we compared growth, germination, number of hyphae and biomass and found that the presence of wood in the medium increased all the evaluated parameters in all the analyzed species. The species that showed the highest values was *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma. Confocal and epifluorescence microscopy using the fluorochrome FM4-64 and calcofluor, shed light on some cellular characteristics of the strains and revealed the absence of lipids and chitin on the covers of pigmented spores. Epifluorescence and scanning electron microscopy of grapevine trunks inoculated with spores at 12, 24 or 48 h, revealed the use of tracheae as preferred site of entry for the penetration of the hyphae and some differences in the growth and branching between the species. *L. theobromae* produced cellulose at the beginning of the interaction to degrade the plant tissue and to invade the parenchymal while *D. seriata* and *D. corticola* did not seem to damage the plant tissue.

Keywords: *Vitis vinifera*, microscopy, trunk diseases

Dedicatorias

A tata dios, a mi mama y a la chula

Para hacer Maestría o Doctorado en Ciencias, sólo tienes que soportar los egos dolidos.

Agradecimientos

A mí, por ser quien soy. Al utilizar cualquier método para poder obtener lo que quiero. Por defender mis ideas, aún acosta de los castigos de los demás. Porque al final existe más de un camino para llegar a lo mismo.

A mi mamá, quien sacrificó todo por verme salir adelante, por estar siempre presente de alguna forma y estar al pendiente de mí. Quien me da todo su cariño y amor, por eso tienes siempre parte de mi corazón.

A mi hermana quien me da consultas gratis cuando las necesito, me cuida, me escucha y es mi cómplice inquebrantable. Quien es y será el “manatí rechoncho” jejeje te quiero hermana.

A mi súper amiga Liliana López Zambrano quien me apoyo en todo momento durante la maestría, que a pesar de pelearnos a cada rato seguimos juntos. Mi querida amiga quien me enseñó que la escuela no lo es todo, que sólo se vive una vez y por eso hay que vivir al máximo. Si no, uno se pudre con tanto estrés, tratando de buscar un éxito ficticio y sin valor el cual se pierde en el tiempo.

A CICESE una institución la cual me ha enseñado más lecciones de vida que cualquier otra, que me preparó física y mentalmente para desempeñar cualquier trabajo y dar una buena cara a las adversidades.

Al Departamento de Microbiología por mostrarme que el conocimiento es más importante, que un papel el cual lo avale. Por la gente tan pero tan linda que sólo habla cosas buenas y que jamás se mete en la vida de los demás.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de manutención para realizar mi trabajo de maestría. Y por el apoyo económico brindado al proyecto en el cual participé.

A mis amigos: Garuru mon, Nancy, Lolis y Chio quienes fueron mis compañeros y amigos de Fitopatología. Quienes desde el principio me quisieron tal y como era a pesar de que este algo loco, paranoico y esquizofrénico. Extrañare mucho la cabecita calva de Garuru para rascarla todos los días, los abrazos de Nancy, la risa de Lolis y el café de Chio. Laura Camacho y Félix Olivares quienes sin ellos no habría podido hacer la maestría. Mi amiga Laura quien se desveló conmigo ayudándome a estudiar y a Félix, quien creo yo, el más inteligente de nuestra generación. Les doy mi más sincero cariño y creo que serán grandes investigadores. A Cynthia, Aurorita, Alex, Plata y Ofelia por las tardes de café. A Ana y Sergio que son buenas personas. A Brito, Meli y Emiliano siempre tan alegres. El roquero Sergio, Candelario, Sara y Rachel por los grandes momentos

que pasamos juntos. Gracias a todas aquellas personas que en algún momento de mi estancia en CICESE estuvieron presentes.

Al Dr. Jorge Cáceres Martínez por el uso del laboratorio de histología de peces y la técnico M. C. Yanet Guerrero R. por la elaboración de laminillas histológicas y su apoyo técnico de este trabajo.

Al técnico Luis Carlos Gradilla Martínez quien participo en la realización de este trabajo al realizar el manejo del Microscopio Electrónico de Barrido para la visualización de las muestras y por la aportación de sus conocimientos en la microscopía. Gracias por tu gran ayuda y por la gran compañía que eres.

A la Dra. Rufina Hernández Martínez quien es, creo yo, una gran persona con muchas virtudes y defectos. A quien le debo mucho, quien me enseñó que ser jefa es una tarea titánica que sólo las personas con mucho valor pueden hacer. Porque a pesar de parecer débil y frágil, es fuerte y pelea por lo que cree es correcto, lo que nos metió en disputas muy seguidas, pero creo yo que es una de las cualidades más importantes de cualquier ser humano. Por ser una persona que sabe salir adelante por sí sola, y a pesar de que muchas veces mete la pata, sabe reconocerlo y ponerse de pie ante las adversidades haciendo un gran trabajo. Simplemente GRACIAS por ser quien es.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria quien es la doctora más guapa de todas. Quien considero una gran persona, muy sofisticada y un modelo a seguir por muchos futuros investigadores, al tener el tiempo suficiente para el trabajo de investigación y su hermosa familia, siempre equilibrada. Radiante y orgullosa, siendo esto último a la vez uno de sus mayores defectos, pero con los años se aprende en la vida. A ella le agradezco el haberme enseñado mucho de TEM.

Al Dr. Jesús Arturo Martín Barajas quien es un gran investigador, gran persona y de quien sólo he recibido buenas críticas. Doy gracias que el haber tenido la oportunidad de conocerlo, creo yo es uno de los investigadores más recomendables para hacer investigación mano a mano con sus estudiantes. También he de agradecer el permitirme el uso del Microscopio Electrónico de Barrido de Ciencias de la Tierra.

A la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez quien me aportó mucho al enseñarme a defender mis ideas, que las acciones de uno tienen consecuencias y, sobre todo, a seguir adelante a pesar de las adversidades, que no importa el obstáculo siempre hay formas de salir. Quien me enseñó cómo se deben hacer las cosas.

A la M. en C. Olga Alicia Callejas Negrete quien es una gran persona, gran investigadora y una de las personas que admiro por su devoción y su forma de entender la lógica.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vi
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tablas.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
La vid.....	5
La vid y el vino en Baja California	6
Estructura de la vid	7
Ciclo vegetativo.....	10
Tejidos vasculares	12
Xilema en Vid	13
Floema en Vid	15
Colonización y degradación del xilema por hongos	17
Enfermedades de la madera.....	18
Eutipiosis.....	19
Enfermedad de Petri	20

CONTENIDO (continuación)

	Página
Yesca	21
Pie negro.....	22
Cancro de Botriosferia.....	22
Familia <i>Botryosphaeriaceae</i>	24
<i>Botryosphaeria</i> en vid.....	26
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	29
<i>Diplodia seriata</i>	30
<i>Diplodia corticola</i>	31
Estudios que han empleado la microscopía para estudiar la interacción de las especies de <i>Botryosphaeria</i> con sus hospederos.....	31
Justificación.....	33
Hipótesis	33
Objetivo general	33
Objetivos específicos.....	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
Cepas usadas en este estudio.....	35
Preparación del inóculo.....	35
Medición de tasas de crecimiento.....	37

CONTENIDO (continuación)

	Página
Medición de Biomasa.....	38
Tasas de germinación y ramificación.....	39
Preparación de cortes.....	39
Fijación.....	40
Preparación de muestras para microscopía de luz.....	40
Preparación de muestras para microscopía de epifluorescencia.....	41
Microscopía confocal.....	42
Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido.....	43
Análisis estadístico.....	44
IV. RESULTADOS.....	45
Biometrías.....	45
Tasa de crecimiento con y sin madera.....	45
Porcentaje de germinación de esporas en presencia de (CM) y en ausencia (SM) de madera.....	49
Comparación de la germinación de esporas pigmentadas de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en SM y CM.....	49
Comparación de la germinación de esporas hialinas de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en SM y CM.....	49
Comparación de la germinación de esporas pigmentadas vs hialinas de <i>L.</i> <i>theobromae</i> UCD256Ma en SM y CM.....	50
Comparación de la germinación de esporas de <i>D. seriata</i> BY06-3 en SM y CM.....	50

CONTENIDO (continuación)

	Página
Comparación de la germinación de esporas de <i>D. corticola</i> SASI12-3 en SM y CM	51
Numero de hifas	55
Biomasa.....	59
Microscopía confocal.....	61
Microscopía de Luz	65
Microscopía de Epifluorescencia.....	65
Observaciones de la colonización de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en tejido de vid	65
Observaciones de la colonización de <i>D. seriata</i> BY06-3 en tejido de vid.	67
Observaciones de la colonización de <i>D. corticola</i> SASI12-3 en tejido de vid	68
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	80
Observaciones en SEM de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma inoculada en vid.....	80
Observaciones en SEM de <i>D. seriata</i> BY06-3 inoculadas en vid	80
Observaciones en SEM de <i>D. corticola</i> SASI12-3 inoculadas en vid	81
V. DISCUSIONES	86
VI. CONCLUSIONES	96
VII. LITERATURA CITADA	98
ANEXO I.....	113

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de la planta de vid (<i>Vitis vinifera</i>).	9
Figura 2. Ciclo vegetativo de la vid.	12
Figura 3. Distribución de tejidos en <i>Vitis vinifera</i>	16
Figura 4. Hongos causantes de enfermedades de la madera en vid y su sitio de entrada.	24
Figura 5. Esquema de una cámara de Neubauer.	37
Figura 6. Transectos hechos en la caja Petri para la medición del crecimiento y su estimación estadística.....	38
Figura 7. Tipos de cortes utilizados en el estudio de la interacción planta patógeno.	40
Figura 8. Técnica de bloque invertido (Hickey <i>et al.</i> , 2005).....	42
Figura 9. Radio de crecimiento de tres <i>Botryosphaeria</i> spp.....	46
Figura 10. Comparación de crecimiento en la cepa de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en MMV con en presencia de madera y sin madera.....	46
Figura 11. Comparación de crecimiento en la cepa de <i>D. seriata</i> BY06-3 en MMV con presencia y ausencia de madera.....	47
Figura 12. Comparación de crecimiento en la cepa de <i>D. corticola</i> SASI12-3 en MMV con presencia y ausencia de madera.....	47
Figura 13. Morfología colonial de cepas de <i>Botryosphaeria</i> spp. crecidas en Medio Mínimo de Vogel con madera y sin madera.....	48
Figura 14. Comparación de la germinación de esporas pigmentadas de la cepa <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en MMV sin madera y con madera.	52
Figura 15. Comparación de la germinación en esporas hialinas de la cepa <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en MMV sin maderay con madera.....	52
Figura 16. Comparación de la germinación entre esporas hialinas y pigmentadas de la cepa <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en MMV sin madera.	53

LISTA DE FIGURAS (continuación)

	Página
Figura 17. Comparación de la germinación entre esporas hialinas y pigmentadas de la cepa <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en MMV con madera.	53
Figura 18. Comparación germinación de esporas pigmentadas para la cepa <i>D. seriata</i> BY06-3 en MMV con ausencia y presencia de madera.	54
Figura 19. Comparación germinación de esporas pigmentadas y hialinas para la cepa <i>D. corticola</i> SASI12-3 en MMV con ausencia y presencia de madera.	54
Figura 20. Promedio de número de hifas de acuerdo a la cepa, tratamiento y tipo de espora.	56
Figura 21. Comparación del número de hifas producidas a partir de esporas hialinas y pigmentadas de la cepa <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en ausencia de madera.	56
Figura 22. Comparación del número de hifas producidas a partir de esporas hialinas y pigmentadas de la cepa <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en presencia de madera.	57
Figura 23. Comparación del número de hifas producidas a partir de esporas hialinas de la cepa <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en ausencia y presencia de madera.	57
Figura 24. Comparación del número de hifas producidas a partir de esporas pigmentadas de la cepa <i>L. theobromae</i> UCD256Ma en ausencia y presencia de madera.	58
Figura 25. Comparación del de número de hifas producidas a partir de esporas de la cepa <i>D. seriata</i> BY06-3 en ausencia y presencia de madera.	58
Figura 26. Comparación del número de hifas producidas a partir de esporas pigmentadas y hialinas en la cepa <i>D. corticola</i> SASI12-3 en ausencia y presencia de madera.	59

LISTA DE FIGURAS (continuación)

	Página
Figura 27. Biomasa producida por tres cepas de <i>Botryosphaeria</i> spp. en ausencia y presencia de madera.....	60
Figura 28. Microscopía confocal de la cepa de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma teñida con FM4-64.	62
Figura 29. Microscopía confocal de la cepa de <i>D. seriata</i> BY06-3 teñida con FM4-64.....	63
Figura 30. Microscopía confocal de la cepa de <i>D. corticola</i> SASI12-3 teñida con FM4-64.	64
Figura 31. Cortes transversales y longitudinales de tallo de vid sin inocular.....	70
Figura 32. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa <i>L. theobromae</i> UCD256Ma a las 12 h y 24 h.....	71
Figura 33. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa <i>L. theobromae</i> UCD256Ma a las 48 h.....	72
Figura 34. Cortes longitudinales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa <i>L. theobromae</i> UCD256Ma a las 48 h.....	72
Figura 35. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa <i>D. seriata</i> BY06-3 a las 24 h.	74
Figura 36. Cortes transversales de tronco de vid inoculados con esporas de la cepa <i>D. seriata</i> BY06-3 a las 48 h.....	75
Figura 37. Cortes longitudinales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa <i>D. seriata</i> BY06-3 a las 48 h.....	76
Figura 38. Cortes transversales de vid inoculados con esporas de la cepa <i>D. corticola</i> SASI12-3 a las 24 h.	77
Figura 39. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa <i>D. corticola</i> SASI12-3 a las 48 h.	78
Figura 40. Cortes longitudinales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa <i>D. corticola</i> SASI12-3 a las 48 h.....	79

LISTA DE FIGURAS (continuación)

	Página
Figura 41. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma a las 24 h.....	82
Figura 42. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma a las 48 h.....	83
Figura 43. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa <i>D. seriata</i> BY06-3 a las 24 h y 48 h.	84
Figura 44. Cortes transversales de vid inoculados con esporas de la cepa de <i>D. corticola</i> SASI12-3 a las 24 h y 48 h.....	85

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Especies de la familia <i>Botryosphaeriaceae</i> aisladas de vid en diferentes regiones del mundo.....	27
Tabla II. <i>Botryosphaeria</i> spp. aisladas de la vid de la región vinícola de Ensenada, Baja California, México.	29

Introducción

La familia de las vitáceas comprende 17 géneros y alrededor de 1000 especies con representación en zonas tropicales, subtropicales y templadas. El género *Vitis* es de gran importancia económica, industrial, alimenticia y ornamental. En este género se encuentran especies americanas, asiáticas y europeas; dentro de esta última se encuentra la especie *V. vinifera* procedente del Cáucaso, es la que presenta las mejores cualidades para la producción de uva de mesa, pasas y vino e incluye 3000 variedades o cultivares como resultado de cruzamientos naturales (Salazar, 2005). Los cultivares que se plantan actualmente en las grandes zonas vitícolas están adaptados al clima de la zona y el hombre los ha aumentado a través de la selección de los cultivares que más se adaptan a sus necesidades de producción (Böhm *et al.*, 1989).

La vid es uno de los cultivos más importantes para el Estado de Baja California. En esta zona, se tiene plantadas el 83% del total de hectáreas en México destinadas a la producción de vino, con lo cual contribuye con el 90% de la producción a nivel nacional, teniendo una derrama económica de 140 millones de dólares anuales. Además, la industria tiene un alto impacto social, ya que genera alrededor de 7 mil empleos (INEGI, 2009, FAO, 2007). En una planta de vid se pueden distinguir fácilmente dos zonas, la parte subterránea, que corresponde a las raíces primarias y secundarias; y la parte aérea correspondiente al tronco, brazos, sarmientos, yemas, hojas, inflorescencias, racimos y frutos. El transporte del agua, minerales y de las sustancias nutritivas se realiza, a través de toda la

planta, por medio del tejido vascular. Este sistema se encuentra distribuido a lo largo de toda la planta, desde las raíces hasta la última nervadura foliar, como una red de canales. Este se divide en dos sistemas de transporte: el floema y el xilema. El floema traslada azúcares alcohólicos, aminoácidos, azúcares simples, azúcares fosfatados, ácidos orgánicos, fosfatos orgánicos, factores reguladores, ácidos nucleicos, vitaminas y sustancias inorgánicas. Las fuentes de estos productos son las células fotosintéticas de la hoja. Estructuralmente, el floema está constituido por tubos cribosos y células cribosas. El xilema representa la parte dura de la planta, la cual es utilizada comercialmente como madera. Los principales elementos conductores del xilema son células alargadas, en forma de tubo, sin contenido citoplasmático y con paredes altamente lignificadas, lo cual evita que se colapsen por la presión negativa ejercida durante la evaporación. El grosor de las paredes va de 4 μm a 0.5 mm, sirviendo como defensa a la penetración de patógenos (Keller, 2010). El xilema está compuesto por elementos vasculares (tráqueas) y elementos no vasculares (traqueidas).

Las enfermedades del xilema son de los mayores problemas fitosanitarios de la vid, ya que además de disminuir el rendimiento, provocan un deterioro gradual de las plantas y eventualmente pueden conducir a su muerte (Siebert, 2001; Gubler *et al.*, 2005). Los hongos son los mayores agentes causales de estas enfermedades y, dependiendo de la forma, tamaño, composición y disposición del xilema, es la capacidad del hongo para invadir, degradar y para distribuir sus hifas en el tejido (Schwarze *et al.*, 2000). La vía de infección común es por aperturas en el tejido, ya sea por daños mecánicos, heridas de poda, herramientas contaminadas o por entradas naturales (Gubler *et al.*, 2005).

Bajo el término de “enfermedades fúngicas de la madera de la vid” se incluyen a todas aquellas enfermedades causadas por hongos que afectan a la madera provocando su deterioro y, posteriormente, en un plazo de tiempo indeterminado, la muerte de parte de la planta o de la planta entera. La aparición

de síntomas se debe a la colonización de los vasos xilemáticos por el hongo, lo que provoca la reducción del flujo de nutrientes, la liberación de toxinas y la degradación de las paredes de los vasos por la liberación de enzimas (Valtaud *et al.*, 2009).

El aumento en la incidencia de enfermedades fúngicas de la madera ha provocado pérdidas económicas significativas en la industria vinícola alrededor del mundo, ya que estas enfermedades reducen la producción de uva y aumentan el costo de los productos (Gubler *et al.*, 2005). Las enfermedades fúngicas de la madera de vid pueden estar causadas por un elevado número de especies que pueden afectar a plantas de diferentes edades. Estos hongos se agrupan en una serie de patologías que pueden ocurrir independientemente, en forma simultánea, o incluso ser precursoras unas de otras en la misma planta (Mugnali *et al.*, 1999). Entre esos se encuentran: *Eutypa lata*, asociado a Eutipiosis; *Cylindrocarpon* spp., asociados a pie negro; *Botryosphaeria* spp., asociados a brazo muerto; y *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Fomitiporia punctata*, *Stereum hirsutum*, *Phomopsis viticola* y *Botryosphaeria* spp., asociados a enfermedad de yesca y Petri (Surico *et al.*, 2008, Scheck *et al.*, 1998).

Varios estudios han identificado a especies de *Botryosphaeria* como importantes patógenos en los viñedos causando canchales, brazo muerto, decaimiento de los brotes, muerte de injertos y necrosis en yemas en todas las zonas vinícolas alrededor del mundo (Úrbez *et al.*, 2008, Dubos *et al.*, 2001, Phillips, 2002, Taylor *et al.*, 2005, Úrbez-Torres *et al.*, 2006a, Úrbez-Torres *et al.*, 2006b). En México, actualmente se tienen reportadas 5 de las 14 especies de *Botryosphaeria* encontradas en el mundo (Candolfi, 2009, Úrbez-Torres *et al.*, 2008), estas son: *Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum vitifusiforme*, *N. australe* y *D. corticola*. En pruebas de patogenicidad *L. theobromae* se comportó como un patógeno altamente virulento, siendo capaz de producir lesiones extensas en el tejido de la planta inoculada, mientras que *D.*

seriata mostró virulencia intermedia y *D. corticola* baja virulencia (Candolfi, 2009, Úrbez *et al.*, 2008).

Existen algunos reportes en donde se ha usado la microscopía de estas especies de *Botryosphaeria*, en los cuales se describen los aspectos morfológicos de hifas, esporas y estructuras reproductivas (Van Niekerk *et al.*, 2004, Úrbez-Torres and Gubler, 2009). Se ha encontrado que *D. seriata* invade el tejido xilemático de las capas superficiales del xilema, floema, tejido meristematico y parénquima de los árboles de durazno provocando la necrosis del tejido invadido (Biggs and Britton, 1988). Los estudios con microscopía para *L. theobromae* en álamo, árbol del caucho, pino, bambú y anacardo, han reportado a este como un patógeno altamente agresivo, capaz de degradar las paredes del xilema, llegando a invadir rápidamente los vasos, los espacios intercelulares y el parénquima, además de poseer un conjunto de enzimas (pectinasas, lactasas y β -1, 3 glucanasas) para llevar acabo la colonización, la rápida degradación de la pared celular y la asimilación de los nutrientes del medio (Muniz *et al.*, 2011, Cedeño *et al.*, 1996, Encinas and Daniel, 1997, Florence *et al.*, 2002, Ruel and Joseleau, 1987). En la especie de *D. corticola* se ha observado que en su interacción con hojas de roble esta especie utiliza los estomas como sitio de entrada en la planta (Paoletti *et al.*, 2007).

En este trabajo se realizó un estudio detallado de la interacción inicial de tres especies de la familia *Botryosphaeriaceae* reportados como agentes causales del deterioro progresivo en plantas de vid (*Vitis vinifera*), y se observaron las diferencias entre éstas, de acuerdo a sus niveles de virulencia en presencia o ausencia de madera. La finalidad del trabajo es aportar conocimiento acerca de estos patógenos y dilucidar su naturaleza y su relación con los síntomas y lesiones observados en el campo.

II

Antecedentes

La vid

La familia de las vitáceas comprende 17 géneros y alrededor de 1000 especies con representación en zonas tropicales, subtropicales y templadas. El género *Vitis* es de gran importancia económica, industrial, alimenticia y ornamental. Cuenta con alrededor de 60-70 especies, al que corresponden las vides cultivadas, localizadas en zonas de clima tropical y subtropical de ambos hemisferios. Este género según la clasificación clásica se divide en dos secciones o subgéneros: *Muscadinia* y *Euvitis* (Keller, 2010).

El subgénero *Muscadinia* contiene tres especies, de las cuales solamente una se cultiva para la obtención de uva, *V. rotundifolia* (Salazar, 2005). Esta especie, originaria del sureste de Estados Unidos, muestra resistencia a cenicilla, pie negro, enfermedad de Pierce, nemátodos y al insecto responsable de la filoxera, *Daktulosphaira vitifoliae*, por lo que tiene gran interés en el mejoramiento del cultivo de la vid (Keller, 2010).

El otro subgénero, *Euvitis*, comprende aproximadamente 60 especies que se distribuyen mundialmente de la siguiente manera:

Americanas: agrupan entre 8 a 34 especies que presentan pocas aptitudes viníferas, con la excepción de *V. labrusca*. Varios miembros de estas especies son utilizadas como portainjertos, por su resistencia a distintas enfermedades o para la

producción de plantas madres e híbridos. Entre los más importantes se citan: *V. aestivalis*, *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* y *V. candicans* (Keller, 2010).

Asiáticas: existen unas cuarenta especies que no presentan interés para la producción de uva. Entre ellas se encuentra *V. amurensis*, *V. coignetiae* y *V. sylvestris* (Keller, 2010, Salazar, 2005).

Europeas: sólo hay una especie, *V. vinifera* procedente del Cáucaso. Ésta es la que presenta las mejores cualidades para la producción de uva de mesa, pasas y vino. Incluye 3000 variedades o cultivares, como resultado de cruzamientos naturales (Salazar, 2005). Los cultivares que se plantan actualmente en las grandes zonas vitícolas están adaptados al clima de la zona y el hombre los ha aumentado a través de la selección de los cultivares que más se adaptan a sus necesidades de producción (Böhm *et al.*, 1989). *V. vinifera* presenta el gran inconveniente de ser altamente sensible a varias enfermedades (Keller, 2010).

La vid y el vino en Baja California

La vid es uno de los cultivos más importantes para el Estado de Baja California. Con una superficie de 3,561.44 h y un volumen de 30,760 ton, es el quinto producto agrícola a nivel estatal (INEGI, 2009, FAO, 2007, SPV, 2010). Del total de la superficie cultivada en el Estado, el 80.5% está dirigida a la producción de uva para vino, el 17.7% para la producción de uva de mesa y el 0.3 % para la producción de uva pasa. Actualmente, en la zona hay 49 variedades plantadas, de las cuales 41 son usadas para la producción de vino, y 8 para uva de mesa y pasa (SPV, 2010). Baja California tiene el 83% del total de hectáreas en México destinadas a producción de vid para vino, con lo cual contribuye con el 90% de la producción a nivel nacional, teniendo una derrama económica de 140 millones de dólares anuales. Además, la industria vinícola tiene un alto impacto social, ya que genera alrededor de 7 mil empleos (INEGI, 2009, FAO, 2007).

En el Estado se tiene una producción de 9,900,000 L de vino, de los cuales aproximadamente el 90% se venden en el mercado nacional, lo que cubre el 34.2 de la demanda nacional, el 10 % restante se obtiene del mercado internacional (CMV, 2011). Las principales zonas de producción en el estado son: el Valle de Calafia, Santo Tomás, el Valle de Mexicali, Tecate, Ensenada, San Vicente, San Antonio de las Minas y el Valle de Guadalupe, siendo este último, la zona vitivinícola más importante de México (INEGI, 2009, SPV, 2010).

Estructura de la vid

La vid es un arbusto trepador mediante zarcillos rameales opositifolios de crecimiento continuo, presenta flores hermafroditas y pentámeras. El tallo es leñoso, constituido básicamente por un tronco grueso, acintado y de color castaño claro. Su fruto es tipo baya de grandes dimensiones agrupados en conjuntos llamados racimos (Izco *et al.*, 2004). Su edad de producción es hasta los 80 años de edad, sin embargo, en la naturaleza son capaces de vivir cientos de años (Keller, 2010).

En una planta de vid se pueden distinguir fácilmente dos zonas, la parte subterránea que corresponde a las raíces primarias y secundarias; y la parte aérea correspondiente al tronco, brazos, sarmientos, yemas, hojas, inflorescencias, racimos y frutos (Figura 1).

La zona subterránea de la vid está compuesta por un sistema denso de raíces de crecimiento rápido con gran capacidad de colonización del suelo que tienen como finalidad la extracción de agua, nutrientes y minerales necesarios para el desarrollo de la planta. Las raíces son capaces de penetrar hasta 6 metros de profundidad (Hidalgo, 2002). Las raíces primarias se caracterizan por ser gruesas y por cumplir con la función de transporte de nutrientes y sostén de la

planta. Las raíces secundarias son generadas cada año a partir de las primarias, su función es la obtención de nutrientes y agua, siendo muy sensibles a condiciones naturales extremas (Salazar, 2005).

El tronco cumple con las funciones de sostén, reserva de nutrientes y conducción de la savia en dirección de las raíces y al follaje. Tiene una altura promedio de 1.50 m y un grosor de 10 a 30 cm de diámetro (Hidalgo, 2002); es de aspecto retorcido, sinuoso y agrietado, recubierto exteriormente por una corteza que se desprende en tiras longitudinales, llamados ritidomas, los cuales son generados anualmente (Keller, 2010).

Los brazos son los encargados de conducir los nutrientes y de repartir la vegetación y los frutos en el espacio. Al igual que el tronco también están recubiertos de una corteza. Los brazos portan los tallos del año, denominados pámpanos cuando son herbáceos y sarmientos cuando están lignificados. Los sarmientos dan origen a las yemas formadoras de los pámpanos, éstos últimos portan las estructuras vegetativas, es decir, hojas, yemas, inflorescencias, frutos y zarcillos (Salazar, 2005).

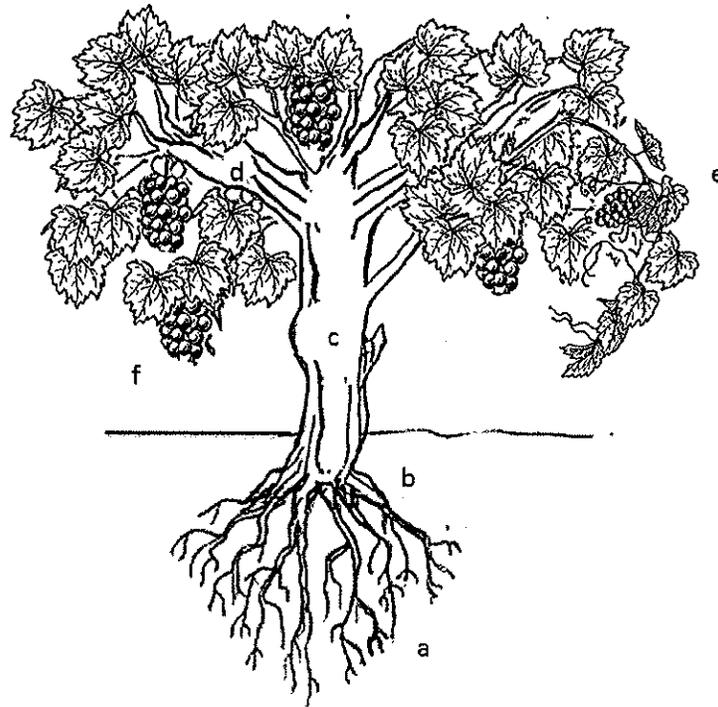


Figura 1. Estructura de la planta de vid (*Vitis vinifera*). (a) Raíces secundarias, (b) raíces primarias, (c) tronco, (d) brazo, (e) sarmientos y (f) racimo.

La hoja es una de las estructuras más importantes en la vid, ya que en ella se realiza el proceso de la fotosíntesis, que es el proceso por el cual la energía lumínica es transformada en azúcares que serán utilizados para el metabolismo de la planta. También cumplen un papel fundamental en el intercambio gaseoso y en la evaporación de agua con la atmósfera. La morfología de la hoja es dependiente del cultivar (Salazar, 2005).

Las yemas son las estructuras que permiten el crecimiento aéreo de la planta. Dan origen a diferentes estructuras vegetativas, tales como, hojas, sarmientos, zarcillos e inflorescencias. La vid posee un número elevado de yemas con capacidad vegetativa mixta (Keller, 2010).

Ciclo vegetativo

Al ser la vid una planta leñosa perenne, su desarrollo se produce a través de los años siguiendo un ciclo vegetativo anual (Hidalgo, 2002). Dentro de éste se distinguen varias etapas de desarrollo, tales como: latencia, brotación, floración, formación de frutos, maduración de bayas, cosecha y caída de hojas (Figura 2) (Salazar, 2005).

El ciclo vegetativo comienza con el lloro, esto se refiere a la exudación de la savia del xilema a la superficie de poda y es una transición de la inactividad al crecimiento activo. El lloro es causado por la presión de la raíz, que es generado por la nueva movilización de las reservas de nutrientes (especialmente los hidratos de carbono) y el bombeo de azúcar en el xilema (Sperry *et al.*, 1987). La presión de la raíz sirve para disolver y eliminar las burbujas de aire que se han formado en los vasos del xilema durante el invierno.

En climas mediterráneos, la brotación y crecimiento de yemas son inducidos por las temperaturas medias diarias superiores a 10 °C (Keller, 2010). La brotación se ve afectada también por el cultivar de vid, el tiempo de la poda, el vigor de la vid, el estrés hídrico y la resistencia al frío (Mills *et al.*, 2006). La brotación es un período de crecimiento exponencial donde los pámpanos crecen tanto en longitud como en grosor, desarrollándose hojas, zarcillos y racimos, así como nuevas yemas en las axilas de las hojas. Esta fase se caracteriza por la fuerte dominancia apical, por la liberación de auxinas hacia las yemas, que inhiben parcialmente el crecimiento de brotes laterales (Candolfi-Vasconcelos and Koblet, 1990).

La floración es el periodo en el cual se caen las caliptras de las flores, al caer éstas, se libera una nube de polen de las anteras de los estambres, los cuales están alejadas del pistilo. Los granos de polen caen sobre el estigma y

germinan, si las condiciones son favorables, la polinización del óvulo dará paso a la formación del fruto, también llamado cuajado (Weaver, 1988).

El cuajado es un término que corresponde al número de flores fecundadas que evolucionaran a frutos, ya que el número de frutos siempre es inferior al número de flores inicial (Reynier, 2005). En esta etapa, el fruto aumenta de tamaño con rapidez, la cantidad de azúcares es baja y constante y la acidez elevada. El cuajado y desarrollo de frutos es controlado por la interacción de hormonas, incluyendo auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno e inhibidores (Weaver, 1988).

La maduración comienza cuando el fruto empieza a tomar color y a suavizarse. A medida que avanza la maduración, el color se vuelve más intenso, aumenta la cantidad de azúcares y disminuye la acidez. Debido a la evaporación del agua en las bayas, la concentración de azúcares aumenta, mientras que la cantidad de ácido disminuye (Reynier, 2005).

El agostamiento o formación de reservas es la acumulación de almidón y otras sustancias de reserva en el parénquima medular. Esto, acompañado de la lignificación celular general y la formación de felógeno en el pedicelo, provocando el desprendimiento del mismo y, por consecuencia, la caída de la hoja. Durante esta etapa la vid es capaz de soportar bajas temperaturas y heladas invernales (Hidalgo, 2002)

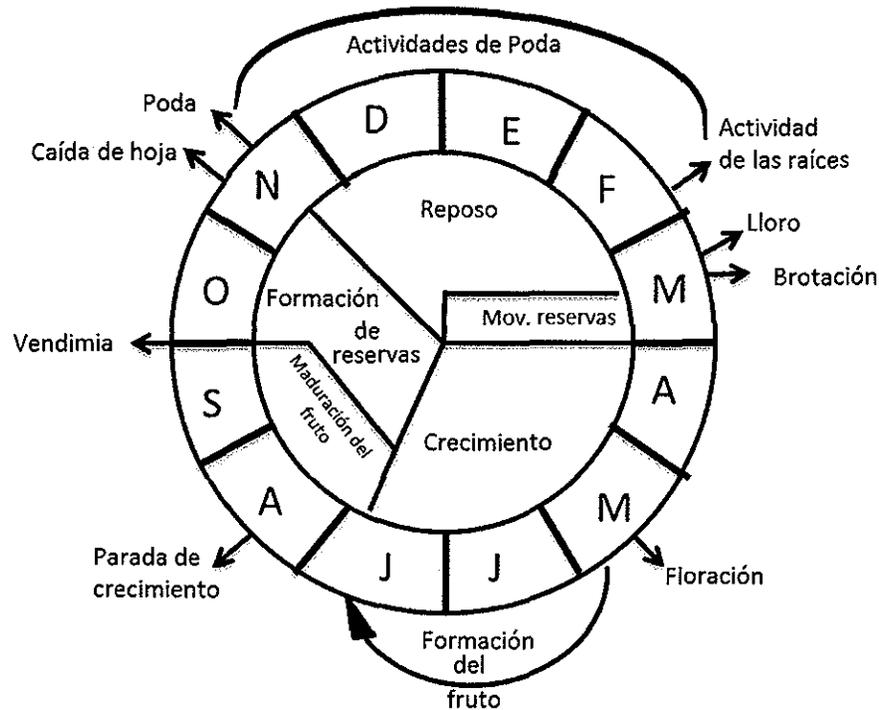


Figura 2. Ciclo vegetativo de la vid.

Tejidos vasculares

El transporte del agua, minerales y de las sustancias nutritivas se realiza, a través de toda la planta, por medio del tejido vascular. Este sistema se encuentra desde las raíces hasta la última nervadura foliar, como una red de canales. Este se divide en dos sistemas de transporte: el xilema que moviliza agua y minerales en la dirección de la corriente transpiratoria (movimiento acrópeto) y el floema que transporta azúcares y solutos producidos por la fotosíntesis en dirección basípeta (Gola *et al.*, 1965).

El tejido vascular está constituido por células alargadas en forma de tubo y sin contenido plasmático. Las paredes están engrosadas y con relieves que proporcionan cierta solidez y resistencia a la presión ejercida, por los líquidos y sustancias que contienen, e impiden que los tubos puedan obstruirse como consecuencia de los movimientos de flexión (Flores-Vindas, 1999).

Las fuerzas que determinan el movimiento en el floema y en el xilema son totalmente diferentes. En el xilema, los solutos se mueven de forma pasiva como flujo de masa, en respuesta a un gradiente de potencial de agua, hacia las superficies de evaporación, mientras que en el floema se transportan por difusión y fuerzas de flujo de presión (Paniagua *et al.*, 2002).

Xilema en Vid

La palabra xilema deriva del griego *xilos* = madera. El xilema representa la parte dura de la planta, la cual es utilizada comercialmente como madera. Los principales elementos conductores del xilema son células alargadas, en forma de tubo, sin contenido citoplasmático y con paredes altamente lignificadas, lo cual evita que se colapsen por la presión negativa ejercida durante la evaporación. El grosor de las paredes va de 4 μm a 0.5 mm, lo cual sirve como defensa a la penetración de patógenos (Keller, 2010).

La formación del tejido xilemático, inicia siguiendo la diferenciación de células meristemáticas, localizadas en el cambium. Se observa que éstas, en un principio, se alargan al mismo tiempo que el citoplasma se vacuoliza, luego ocurre la reabsorción del contenido celular. Tal diferenciación ocurre simultáneamente en una serie de células superpuestas, de manera que su confluencia genera la formación de un canal conductor. Las membranas divisorias entre dos células inmediatas tienden a disolverse.

El xilema está compuesto por los siguientes componentes:

-Elementos vasculares

- Tráqueas (vasos). Resultan de la superposición de numerosas células de forma cilíndrica, unidas entre sí a través de paredes basales y apicales que
-

presentan perforaciones, con objeto de que las células queden intercomunicadas, formando canales aptos para el transporte de líquidos.

- Traqueidas. En gimnospermas son similares a las tráqueas, pero se superponen sin perforaciones de las paredes basales, por lo que cada célula mantiene su individualidad. En angiospermas se denomina traqueida al conjunto de parénquima paratraqueal axial y fibras del xilema (Figura 3).

-Elementos no vasculares

- Parénquima paratraqueal axial, parénquima axial y parénquima radiomedular. Son un conjunto de células que sirven como medio de almacenamiento y comunicación entre el xilema y otros tejidos. Proporcionan aminoácidos, hormonas, sales minerales, etc., que son transmitidos al resto de la planta. La vid posee cristales de oxalato de calcio en este tejido, proporcionándole una protección contra herbívoros (Keller, 2010).
 - Fibras esclerenquimáticas (fibras del xilema). Son elementos de sostén de los tejidos vasculares. Se asemejan a las traqueidas pero son más largas y poseen paredes más gruesas.
 - Tilosas. Cuando las tráqueas y las traqueidas dejan de ser activas o presentan la invasión de patógenos, las células parenquimatosas vecinas, que continúan creciendo, ejercen fuertes presiones sobre ellas y llegan a introducirse parcialmente en los vasos, obstruyéndolos. Las tilosas bloquean la luz de los vasos impidiendo que estos sirvan como túnel para el desplazamiento de hongos, bacterias y otros microorganismos (Sun *et al.*, 2006), sin embargo también pueden ser desarrolladas por la formación de émbolos en los vasos, edad o lesión.
-

Los elementos vasculares están interconectados por punteaduras generadas en la pared a partir de la degradación del contenido citoplasmático de las células. Estas permiten el intercambio de nutrientes entre las células de los distintos tejidos vía simplásto (Paniagua *et al.*, 2002). En *Vitis* spp, las traqueas presentan punteaduras con arreglos anillados, punteados, reticulares y escaleniformes, siendo este último el de mayor presencia en *Vitis vinifera* (Sun *et al.*, 2006).

Floema en Vid

El término floema deriva del griego *phleoes* que significa corteza, nombre dado por su posición en la planta. También se utiliza el término *leptoma*, que significa débil. El floema puede trasladar entre 50 y 300 mg de materia (en peso seco) por ml de la que, un 90% es azúcar. También hay aminoácidos en una concentración de 20 a 80 mg/ml. Otros componentes son azúcares alcohólicos, azúcares fosfatados, ácidos orgánicos, fosfatos orgánicos, factores reguladores, ácidos nucleicos, vitaminas y sustancias inorgánicas. Las fuentes de estos productos son las células fotosintéticas de la hoja y los sumideros son el resto de la planta, que debe nutrirse del fluido transportado por el floema. De alguna manera, el floema interviene en el control del desarrollo de la planta, por ejemplo, en determinados momentos del año, los nutrientes orgánicos son transportados sobre todo a los meristemas y primordios florales o a las estructuras reproductoras (Paniagua *et al.*, 2002).

Durante el crecimiento primario se forma el floema primario posteriormente, a partir del cambium vascular, se forma el floema secundario durante el crecimiento secundario.

Estructuralmente el floema tiene los siguientes componentes:

- Tubos cribosos: resultan de la superposición de las células de forma cilíndrica, unidas unas a otras de sus bases que, a diferencia de las tráqueas, no quedan perforadas, en sentido estricto, sino atravesadas por cribas, formando placas cribosas. Estas células se denominan elementos de los tubos cribosos.
- Células Cribosas: son similares a los elementos de los tubos cribosos, pero se superponen sin que las paredes celulares basales formen verdaderas placas cribosas, sino tan sólo áreas cribosas.

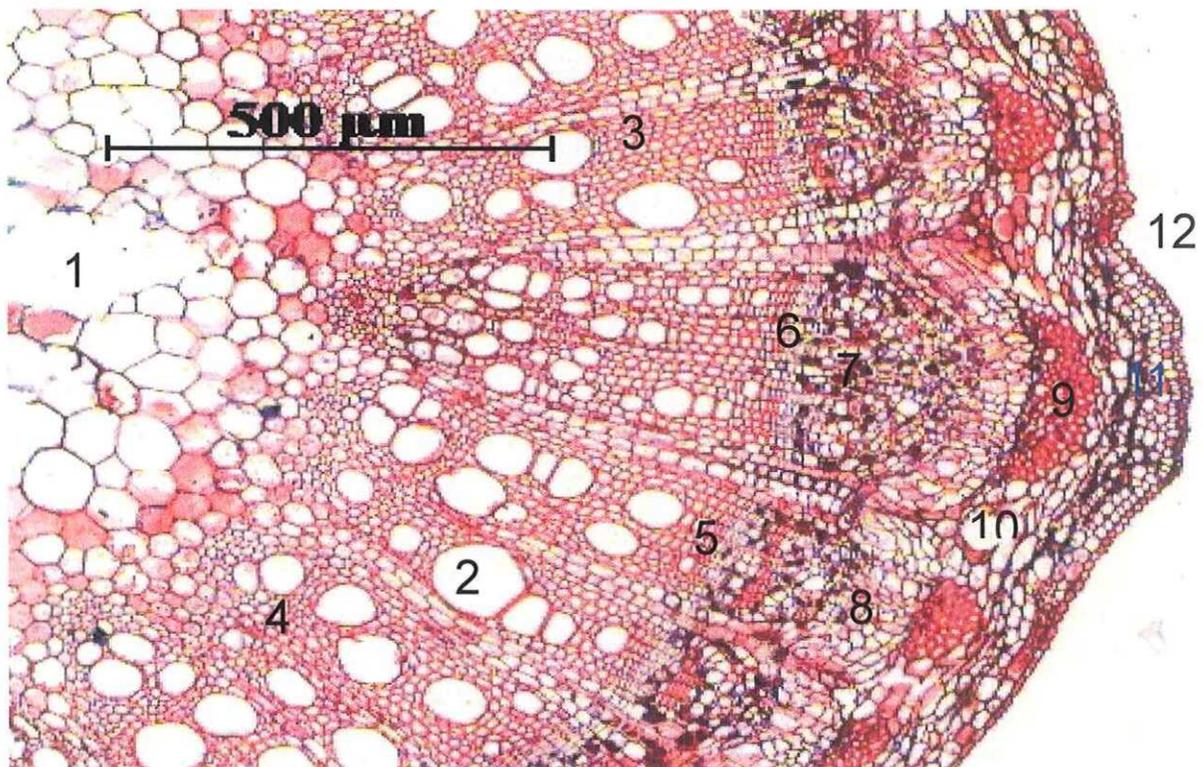


Figura 3. Distribución de tejidos en *Vitis vinifera*. (1) Parénquima medular, (2) traqueas, (3) traqueidas, (4) xilema secundario, (5) xilema primario, (6) cambium, (7) floema primario, (8) floema secundario, (9) esclerénquima, (10) colénquima, (11) epidermis, (12) corteza.

Colonización y degradación del xilema por hongos

La capacidad del hongo para invadir y degradar, así como la distribución de las hifas dentro de la planta, depende de la forma, el tamaño, la composición y la disposición del xilema (Schwarze *et al.*, 2000). La vía de infección más común es por aperturas en el tejido ya sea por daños mecánicos, heridas de poda, herramientas contaminadas o entradas naturales (Gubler *et al.*, 2005). Una vez colonizado el xilema la invasión hacia las células adyacentes puede ser realizada por las punteaduras encontradas en los arreglos xilemáticos, ya que entre menor sea el número de punteaduras existe una obstaculización pasiva del proceso de colonización. Estas punteaduras sirven como sitio de acceso a nuevos canales xilemáticos o células parenquimatosas para la obtención de nutrientes (Kleist and Seehann, 1997). Sin embargo, algunos hongos son capaces de degradar la pared celular y la lamela creando así sitios para la penetración y obtención de nutrientes, tal es el caso de *L. theobromae* y *E. lata*, los cuales utilizan un complejo enzimático, compuesto por proteinasas, amilasas, pectinas y azúcares libres, que degradan los componentes de la pared (Encinas, 1996).

El proceso de colonización y degradación también puede ser realizado por un complejo de hongos que tienen capacidades diferentes. Esto se ha observado en la asociación de hongos que producen la enfermedad de yesca, en donde *Phaeomoniella chlamydospora* inicia la colonización de la planta, invadiendo el tejido xilemático y produciendo una matriz de proteoglucanos alrededor de las hifas que protegen al hongo del sistema defensivo de la planta; este hongo no es capaz de degradar las paredes del xilema (Valtaud *et al.*, 2009). Una vez establecido, inicia la producción de fitotoxinas que debilitan el sistema defensivo de la planta permitiendo la entrada de otros patógenos (Bruno and Sparapano, 2007), en particular de *Phaeoacremonium aleophilum*, el cual produce las enzimas necesarias para la degradación de las paredes del xilema y del tejido parenquimático para la obtención de nutrientes (Valtaud *et al.*, 2009).

Un efecto secundario de la colonización del sistema vascular por hongos es un déficit en la presión osmótica en el transporte de agua y minerales, ya que estos provocan una disminución en el área de los canales de transporte impidiendo el flujo, aunado a la formación de tilosas por parte de la planta como una forma de defensa (Goodman *et al.*, 1986).

Enfermedades de la madera.

Bajo el término “enfermedades fúngicas de la madera de la vid”, se incluyen a todas aquellas enfermedades causadas por hongos que afectan a la madera, provocando su deterioro y, posteriormente, en un plazo de tiempo indeterminado, la muerte de parte de la planta o de la planta entera. La aparición de síntomas se debe a la colonización de los vasos xilemáticos por el o los hongo(s), lo que provoca la reducción del flujo de nutrientes, la liberación de toxinas y la degradación de las paredes de los vasos por la liberación de enzimas (Valtaud *et al.*, 2009).

El aumento en la incidencia de enfermedades fúngicas de la madera ha provocado pérdidas económicas significativas en la industria vinícola alrededor del mundo, ya que estas enfermedades reducen la producción de uva y aumentan el costo de los productos (Gubler *et al.*, 2005). Este aumento en incidencia es debido a diversos factores, tales como la reducción en el cuidado sanitario del material de propagación, con lo cual se ha visto disminuida la calidad de las plantas (Giménez-Jaime *et al.*, 2006); los cambios ocurridos en las prácticas culturales y en el manejo del viñedo; siendo quizás uno de las más relevantes la escasa protección de las heridas de poda que favorecen la entrada de diferentes patógenos (Úrbez *et al.*, 2008); el cambio climático, tales como lluvia fuerte o baja en distintas zonas, condiciones de sequía y cambios repentinos de frío y calor

(Úrbez-Torres *et al.*, 2006a), y la prohibición del uso del arsenito de sodio que ha sido reemplazado por otros fungicidas menos eficaces (Mugnál *et al.*, 1999).

Las enfermedades fúngicas de la madera de vid pueden ser causadas por un elevado número de especies que pueden afectar a plantas de diferentes edades. Estos hongos se agrupan en una serie de patologías que pueden ocurrir independientemente, en forma simultánea, o incluso ser precursoras unas de otras en la misma planta (Mugnál *et al.*, 1999). Entre esos se encuentran: *Eutypa lata*, asociado a Eutipiosis; *Cylindrocarpon* spp., asociados a pie negro; *Botryosphaeria* spp., asociados a brazo muerto y; *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia punctata*, *Stereum hirsutum*, *Phomopsis viticola* y *Botryosphaeria* spp. asociados a enfermedad de yesca y Petri (Figura 4) (Surico *et al.*, 2008, Scheck *et al.*, 1998).

Eutipiosis

La eutipiosis es producida por el hongo *Eutypa lata*, el cual penetra a la planta por los cortes de poda. Se ha encontrado en la mayoría de regiones vitícolas del mundo, en donde las precipitaciones superan los 600 mm al año, siendo menos probable cuando éstas son inferiores a los 250 mm (Pearson and Goheen, 1988). Raramente afecta a plantas de menos de ocho años de edad. Los síntomas en la parte aérea son fácilmente reconocibles: durante los primeros meses, al inicio del ciclo del cultivo, en la primavera, se observan deformaciones y decoloraciones en las brotaciones nuevas en un brazo, pero en años sucesivos los síntomas se observan en el resto de la planta, a medida que el hongo desciende por el tronco, agravándose los síntomas hasta provocar su muerte (Péros and Berger, 1994). El hongo crece en el xilema, bloqueando la conducción de agua. Las infecciones se mueven a una velocidad de 10-12 cm /año. Los síntomas foliares ocurren normalmente hasta al menos 4 años después de que la infección inicial ocurrió (Rolshausen *et al.*, 2010).

Se caracterizan por la presencia de brotes raquíuticos y débiles, con entrenudos cortos, hojas pequeñas, aserradas y cloróticas, a veces con necrosis marginales. La madera afectada toma un color marrón oscuro, diferenciado del blanco característico de plantas sanas. La consistencia de la madera se vuelve dura y quebradiza. Los racimos sufren corrimiento e incluso pueden desaparecer (Pérez-Marín, 2001).

La diseminación de la enfermedad se lleva a cabo por la lluvia, la cual libera las ascosporas, que se formaron a partir de peritecios en los canchales de las vides afectadas. Las ascosporas desarrollan un rol preponderante en el ciclo de la enfermedad, al invadir las heridas de poda en los brazos y/o tronco. Las heridas son más susceptibles cuando son recientes, ya que con el tiempo tienden a cicatrizar, lo que evita que puedan ser infectadas (Petzoldt C. *et al.*, 1981). Transcurrido de uno a dos años a partir de la infección se empiezan a observar los primeros síntomas, siendo más evidentes a los tres o cuatro años. Sin embargo, pueden transcurrir varios años para que se produzca la muerte del brazo o la planta entera (Mundy and Manning, 2010).

Enfermedad de Petri

La enfermedad de Petri, también conocida como yesca joven, decaimiento de la vid joven o "black goo", es otra de las preocupaciones en la industria vinícola, debido a los daños que la enfermedad puede causar en plantaciones jóvenes (Mundy and Manning, 2010). Los síntomas que provoca son muy similares a los del déficit hídrico (García *et al.*, 2005); se observa un retraso en el crecimiento del tronco, los nudos se acortan y hay una reducción del tamaño de las hojas y del follaje (Scheck *et al.*, 1998). Normalmente, las vides crecen el primer año, sin embargo conforme avanzan las temporadas subsiguientes, se observa una clorosis en patrones "atigrados" y una defoliación temprana de las hojas. La

madera presenta puntos de color marrón y puntos negros de donde se pueden aislar normalmente *P. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. respectivamente. Los síntomas pueden causar la muerte o el establecimiento de vides pobres en las plantaciones nuevas (Valtaud *et al.*, 2009, Whiteman *et al.*, 2007).

Yesca

Esta enfermedad ha sido altamente destructiva en viñedos de California y Europa (Gubler *et al.*, 2005, Surico *et al.*, 2008), es producida por un complejo de hongos: *Fomitiporia mediterránea*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium inflatipes*, *Fomitiporia punctata* y *Stereum hirsutum*. El hongo penetra en la planta a través de heridas de poda o por suelos infectados a través de las raíces (Whiteman *et al.*, 2007). Puede manifestarse de dos formas: lenta o crónica, que es la más común, y rápida o apoplejía (Valtaud *et al.*, 2009).

La forma crónica se caracteriza por la aparición de decoloraciones y necrosis internerviales en la hoja, amarillentas en los cultivares de uva blanca y rojizas en los de uva tinta, que forman el típico patrón atigrado de esta enfermedad. También se presenta un secado del racimo (Valtaud *et al.*, 2009, Surico *et al.*, 2006).

En su forma rápida, la enfermedad se caracteriza por una marchitez súbita, parcial o total de la planta. Existe una pudrición rápida de la madera y una destrucción masiva del tejido conductor de la planta. Esta es más frecuente en climas cálidos y entre periodos de sequía y lluvia (Surico *et al.*, 2008).

En ambas situaciones, en cortes longitudinales o transversales de la madera de la planta afectada, se observan zonas con podredumbre seca y

esponjosa. Normalmente esta enfermedad se aprecia en viñas viejas (Valtaud *et al.*, 2009).

Pie negro

Esta enfermedad es causada por distintas especies del genero *Cylindrocarpon* (Halleen *et al.*, 2006). Estos hongos son aislados frecuentemente del material vegetal de viveros y plantas jóvenes con síntomas de decaimiento en diferentes regiones productoras de vid en el mundo. Las especies de *Cylindrocarpon* atacan el sistema radicular de las plantas provocando lesiones necróticas y el ennegrecimiento del tejido, a lo que se debe la denominación de pie negro (Scheck *et al.*, 1998). El ciclo de esta enfermedad no se conoce en su totalidad, no obstante se sabe que el ataque se produce en plantas jóvenes, de 5 a 10 años, con alto estrés fisiológico por causas de sequía o humedad excesivas (Halleen *et al.*, 2006). En la parte aérea se observa una ausencia de desborre, una vegetación débil, algo clorótica que en verano puede llegar a secarse bruscamente. En la parte subterránea de la planta suelen observarse dos niveles radiculares. Las raíces parecen normales repartidas uniformemente y en general son poco profundas. Las del segundo nivel suelen estar necrosadas de color gris oscuro. Al quitar la corteza del porta injerto se puede observar una franja marrón que sube desde la raíz hacia la unión del injerto. Los cortes transversales de esta zona muestran una necrosis que se desarrolla desde la periferia a la médula del porta injerto (Rego *et al.*, 2006).

Cancro de Botriosferia

Antes conocida como enfermedad de brazo muerto, fue descrita por primera vez por Lehoczky (1974) en Hungría; esta enfermedad parece estar presentes en las zonas de clima mediterráneo y climas templados (Úrbez-Torres *et al.*, 2006a). En la actualidad se le relaciona con muchas especies de la familia

Botryosphaeriaceae, manifestando síntomas parecidos tanto a yesca como a eutipiosis (Úrbez-Torres *et al.*, 2008, Dubos *et al.*, 2001). Además de la vid, las especies de esta familia afectan a muchas otras plantas leñosas causando daños muy severos hasta llegar incluso a la muerte de la planta (Dubos *et al.*, 2001). No obstante, durante mucho tiempo, tanto en la vid como en otros hospedantes, estos hongos fueron relegados porque se consideraban patógenos débiles o simples saprofitos (Dubos, 2002). Los síntomas se confunden fácilmente con los de la yesca y aparecen a finales de mayo en las hojas basales de la planta. La enfermedad puede evolucionar de forma rápida o severa o de forma lenta. En la forma lenta, aparecen manchas en los bordes de las hojas o entre los nervios, como sucede con la yesca. En las variedades tintas los síntomas se diferencian de los de la yesca por la ausencia de ribete amarillo que delimita la zona necrosada de las zonas aún verdes que siguen los nervios de la hoja. En el caso del brazo muerto, ese borde es más marrón violáceo oscuro. En las variedades blancas, la diferenciación con la yesca es más difícil. Las manchas amarillas de los bordes y del limbo al crecer su unen, se tornan marrón, dejando sólo verde los nervios de la hoja. En su forma severa, se caracteriza por una pérdida precoz de las hojas de algunas ramas o de la totalidad de la planta que se seca total o parcialmente (Castillo-Pando *et al.*, 2001, Van Niekerk *et al.*, 2004).

Al quitar la corteza se puede ver una franja marrón que sale de la rama hacia el tronco. En cortes transversales se observa que la franja marrón penetra poco, es de color ocre, y los vasos están obturados. En cortes longitudinales se observa una necrosis en forma de cuña característica de esta enfermedad (Úrbez-Torres *et al.*, 2006a).

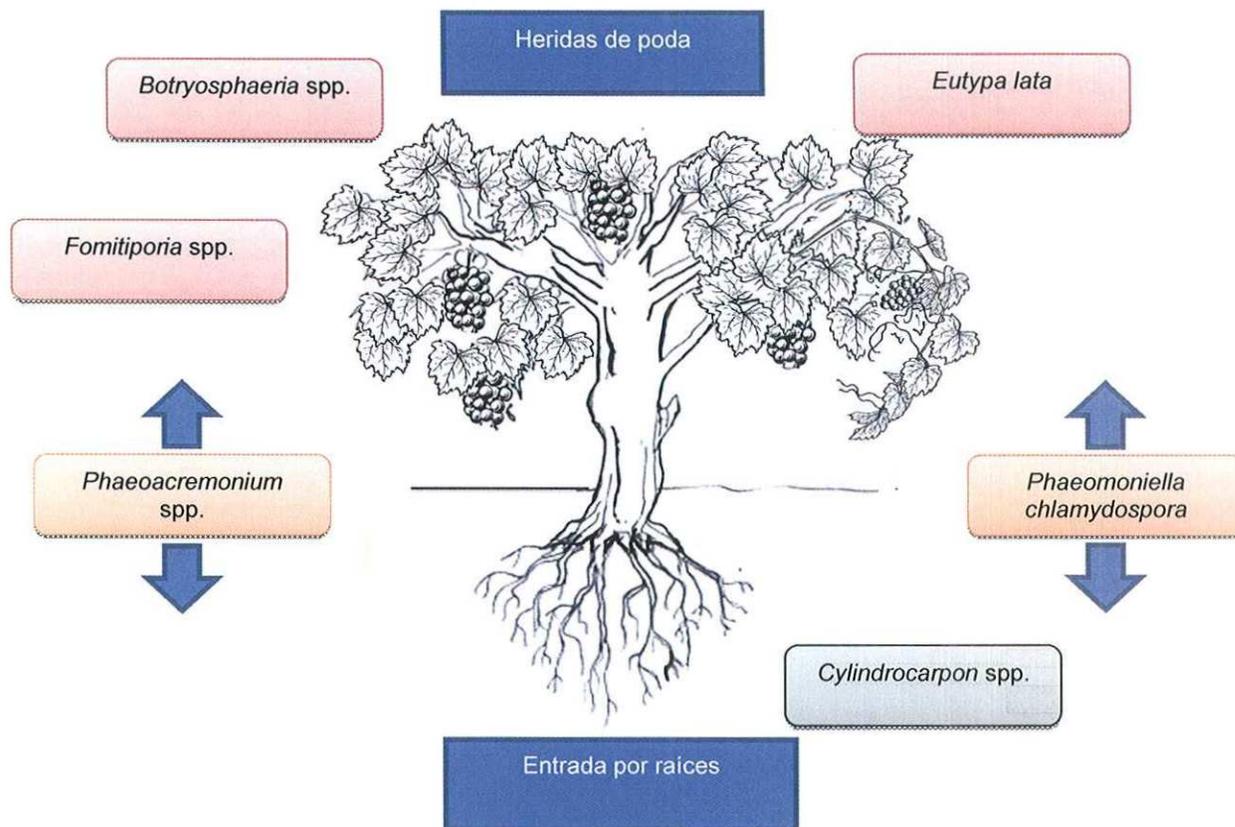


Figura 4. Hongos causantes de enfermedades de la madera en vid y su sitio de entrada. Especies en recuadros rojos, se reporta como sitio de entrada sólo las heridas de poda. En recuadros naranja su sitio de entrada es por heridas de poda y raíces. Recuadro azul su sitio de entrada es sólo por raíces.

Familia *Botryosphaeriaceae*

La familia *Botryosphaeriaceae* pertenece a la clase Ascomycetes, orden Dothideales. Está representada por patógenos oportunistas, patógenos primarios, saprofitos y endofitos (Denman *et al.*, 2000, Slippers and Wingfield, 2007). Estos hongos presentan un ciclo biológico dividido en una fase sexual (teleomorfo), la cual es escasa en la naturaleza, y una fase asexual (anamorfo), la cual se encuentra mayoritariamente en la naturaleza (Denman *et al.*, 2000). Su forma de reproducción asexual es a través de la formación de ascómatas multiloculares con paredes de múltiples capas, que en su conjunto forman un picnidio. La humedad y la lluvia propician la liberación de las picnidiosporas contenidas en el interior,

siendo dispersadas por el viento para su distribución (Epstein *et al.*, 2008). Estos hongos presentan una distribución cosmopolita, sin embargo, se encuentran en mayor número en zonas de clima templados y tropicales, encontrándose en un amplio rango de hospederos de las clases Liliopsida (monocotiledóneas), Magnoliopsida (dicotiledóneas) y Gimnospermae (gimnospermas) (Barr, 1987). Son colonizadores de plantas débiles y estresadas, por ejemplo después de la sequía, granizo, viento, heladas, o heridas por daños causados por animales o el hombre (Smith *et al.*, 1994, Denman *et al.*, 2000). En la actualidad se piensa que estos poseen una fase endófitica seguida de una fase saprofitica o patogénica (Slippers and Wingfield, 2007).

Su ciclo de infección comienza con la formación de picnidios a principios del otoño, con la llegada de las primeras lluvias, a mediados de otoño hasta finales de invierno, se estimula la exudación de los picnidios y se lleva a cabo la liberación de las esporas (Úrbez-Torres *et al.*, 2010a). Éstas tienden a dispersarse, ayudadas por el viento y las escorrentías, abarcando grandes áreas hasta encontrar un hospedero (Mundy and Manning, 2010). Su sitio de entrada por predilección son las heridas de poda, sin embargo, también pueden por heridas causadas por animales, herramientas contaminadas o entradas naturales de la planta (Epstein *et al.*, 2008). En primavera cuando se alcanzan temperaturas de 10°C o más, empiezan su crecimiento invadiendo al hospedero como endófitos, es decir, sin afectar la salud de este. Sin embargo, ante un fenómeno que afecte la salud de la planta estos tienden a volverse saprofitos degradando las paredes del tejido vascular e invadiendo tejido parenquimatoso (Pearson and Goheen, 1988, Muniz *et al.*, 2011). Una vez que obtienen suficientes nutrientes forman picnidios para así continuar su ciclo.

***Botryosphaeria* en vid.**

Varios estudios han identificado a especies de *Botryosphaeria* como importantes patógenos en los viñedos causando canchales, brazo muerto, decaimiento de los brotes, muerte de injertos y necrosis en yemas en todas las zonas vinícolas alrededor del mundo (Úrbez *et al.*, 2008, Dubos *et al.*, 2001, Phillips, 2002, Taylor *et al.*, 2005, Úrbez-Torres *et al.*, 2006a, Úrbez-Torres *et al.*, 2006b). Aunque la patogenicidad y virulencia de algunas especies de *Botryosphaeria* que afectan a vid han sido determinadas, se acepta que estas varían dependiendo la cepa (Phillips, 1998, Úrbez-Torres and Gubler, 2009). Actualmente son 14 las especies de *Botryosphaeria* reportadas en vid (Tabla I) (Van Niekerk *et al.*, 2006, Candolfi, 2009, Úrbez-Torres *et al.*, 2010b). Sin embargo, los géneros de mayor distribución e incidencia a nivel mundial son *Neofusicoccum* y *Diplodia* spp. (Taylor *et al.*, 2005).

Tabla I. Especies de la familia *Botryosphaeriaceae* aisladas de vid en diferentes regiones del mundo.

Teleomorfo	Anamorfo	Sitios de aislamiento
<i>Botryosphaeria australis</i>	<i>Neofusicoccum australe</i>	Estados Unidos, Australia, Portugal, Sudáfrica, México.
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Neofusicoccum aesculi</i>	Portugal, Argentina, Sudáfrica, Suiza, Grecia, Nueva Zelanda, Japón, España, México.
<i>Botryosphaeria ibérica</i>	<i>Dothiorella ibérica</i>	Estados Unidos, España, Italia.
<i>Botryosphaeria lutea</i>	<i>Neofusicoccum luteum</i>	Portugal, Estados Unidos, Sudáfrica, Nueva Zelanda, México.
<i>Botryosphaeria parva</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Portugal, Francia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Sudáfrica.
<i>Botryosphaeria porosum</i>	<i>Diplodia porosum</i>	Sudáfrica.
<i>Botryosphaeria obtusa</i>	<i>Diplodia seriata</i>	Portugal, Francia, Estados Unidos, México, Italia, Ucrania, Hungría, Libano, Sudáfrica, España, Egipto, Chile, Australia.
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Argentina, Estados Unidos, México, Sudáfrica, Papua Nueva Guinea, Uganda, Venezuela, Australia, Sri Lanka, España, Egipto, Chile.
<i>Botryosphaeria stevensii</i>	<i>Diplodia mutila</i>	Portugal, Estados Unidos, Holanda, España.
<i>Botryosphaeria viticola</i>	<i>Dothiorella viticola</i>	España, Sudáfrica.
<i>Botryosphaeria viticlavatum</i>	<i>Neofusicoccum viticlavatum</i>	Sudáfrica.
<i>Botryosphaeria vitifusiforme</i>	<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	España, Sudáfrica, México.
<i>Botryosphaeria corticola</i>	<i>Diplodia corticola</i>	México, Estados Unidos.
<i>Botryosphaeria ribis</i>	<i>Neofusicoccum ribis</i>	Sudáfrica, Portugal.

En México, actualmente se han reportado 5 especies de *Botryosphaeria* (Candolfi, 2009, Úrbez-Torres *et al.*, 2008). En el 2008 Úrbez-Torres y colaboradores aislaron a *L. theobromae* y *D. seriata* de viñedos en México de los municipios de Hermosillo y Ensenada, encontrando que estas especies tienen similitud filogenética con las aisladas de California. Candolfi en 2009 realizó un estudio en viñedos del municipio de Ensenada, Baja California, identificando a *D. seriata*, *N. vitifusiforme*, *N. australe* y *D. corticola* (Tabla II), y reportó que la especie *D. seriata* y el género *Neofusicoccum* como patógenos que se encuentran constantemente en la zona. En pruebas de patogenicidad, *L. theobromae* se comportó como un patógeno altamente virulento, siendo capaz de producir lesiones extensas en el tejido de la planta inoculada, mientras que *D. seriata* mostro virulencia intermedia y *D. corticola* baja virulencia (Candolfi, 2009, Úrbez *et al.*, 2008).

Tabla II. *Botryosphaeria* spp. aisladas de la vid de la región vinícola de Ensenada, Baja California, México (Candolfi, 2009, Úrbez *et al.*, 2008).

Aislado	Identidad	Tipo de lesión
BY06-3, CCBM09, MXCB01, MXCB13, SACH15, SACH19-3, SACH29-2, SASI08, R02-3, MXSB01, SASI01, SASI16, CCBM08, UCD1010BC, UCD1015BC, UCD1035BC, UCD1038BC, UCD1052B _b , UCD1061BC.	<i>D. seriata</i>	Manchas necróticas concéntricas y puntos negros.
SASI12-3.	<i>D. corticola</i>	Manchas necróticas concéntricas y puntos negros
UCD1012BC, UCD1014BC, UCD1028BC, UCD1030BC, UCD1060BC.	<i>L. theobromae</i>	Sector necrótico en forma de cuña, manchas concéntricas y puntos negros
SACH24, SACH23.	<i>N. vitifusiforme</i>	Manchas necróticas concéntricas
ME04-3.	<i>N. australe</i>	Puntos negros y lesiones concéntricas

Lasiodiplodia theobromae

L. theobromae es un patógeno importante en plantas tropicales y subtropicales (Mohali *et al.*, 2005), presenta un alto nivel de colonización y virulencia, y ha sido reportado en más de 500 hospederos (Úrbez-Torres *et al.*, 2008). Ha sido asociado a gomosidad, necrosis, canchales, manchas foliares, decaimiento y muerte de sus hospederos (Encinas, 1996). Su importancia comercial radica en su capacidad de atacar a especies de importancia económica

para el hombre tales como pera, mango, durazno, aguacate, manzana, mora azul, palma cocotera, melocotón, uva, pinos, eucaliptos, etc (Khanzada *et al.*, 2004, Lakshmanan and Jagadeesan, 2004, Roux *et al.*, 2001, Hong-Ye *et al.*, Wright and Harmon, 2009, Gubler *et al.*, 2005). En vid, *L. theobromae* es reconocido como uno de los patógenos más agresivo dentro de la Familia *Botryosphaeriaceae* (Úrbez-Torres and Gubler, 2011). En California, la presencia de sus esporas en época de lluvia es del 9.6%, en comparación con otras especies de *Botryosphaeria* (Úrbez-Torres *et al.*, 2010a), siendo la época de poda donde más infecciones se dan. Una vez realizada una herida de poda, *L. theobromae* puede infectar a la planta en un plazo de 12 a 36 días (periodo de riesgo) antes de que cicatrice (Úrbez-Torres and Gubler, 2011). Este patógeno es capaz de degradar tanto tejido leñoso como verde, debido al conjunto de enzimas que posee siendo la especie de *Botryosphaeria* con mayor capacidad para llevar a cabo la degradación de la pared celular del tejido conductor de las plantas (Florence *et al.*, 2002). Sin embargo, esta especie es capaz de permanecer como endófito durante años o toda la vida de la planta en donde se encuentre como hospedero (Mohali *et al.*, 2005). Recientemente se ha descubierto su capacidad de provocar enfermedades en el hombre tales como queratomicosis, feohifomiosis y neumonía (Woo *et al.*, 2008, Summerbell *et al.*, 2004).

Diplodia seriata

Este hongo se conoció durante muchos años por su nombre teleomorfo *Botryosphaeria obtusa*, es un importante patógeno de manzanos en donde causa los síntomas denominados raíz negra, canchales, decaimiento y ojos de sapo en fruto (Phillips, 2002). Actualmente se tienen reportados 37 especies hospederas de plantas (Phillips, 2002, Phillips *et al.*, 2007). Es la especie más ampliamente distribuida en las zonas vinícolas alrededor del mundo (Taylor *et al.*, 2005). En California, es la especie con mayor presencia en viñedos y en la época de lluvias presenta la mayor abundancia de esporas en aire (59%), en comparación con

otras especies de *Botryosphaeria* (Úrbez-Torres *et al.*, 2010a). *D. seriata*, posee una alta capacidad de colonizar heridas de poda gracias a las enzimas contenidas en sus esporas (Rolshausen *et al.*, 2010, Cobos *et al.*, 2010). A pesar de ello, la patogenicidad de *D. seriata* todavía es confusa, ya que ha sido reportado como patógeno débil (Van Niekerk *et al.*, 2004), a intermedio (Candolfi, 2009, Úrbez-Torres and Gubler, 2009).

Diplodia corticola

D. corticola fue recientemente reportado en vid como un patógeno débil y se sabe poco de su comportamiento e interacción con vid (Úrbez-Torres *et al.*, 2010b). Candolfi en 2009 reporta que en pruebas filogenéticas la cepa de *D. corticola* SAS12-3 aislada de vid no presentó una diferencia filogenética con las aisladas de *Quercus* spp. Sin embargo, Úrbez-Torres (2010) reporta que en pruebas de patogenicidad las cepas de *D. corticola* causan un tamaño de lesión mayor en vástagos de vid que en vástagos de *Quercus* independientemente de que las cepas fueran aisladas de *Quercus* o vid.

Estudios que han empleado la microscopía para estudiar la interacción de las especies de *Botryosphaeria* con sus hospederos.

Existen varios reportes de microscopía de distintas especies de *Botryosphaeria*, en los cuales se describen los aspectos morfológicos de hifas, esporas y estructuras reproductivas (Van Niekerk *et al.*, 2004, Úrbez-Torres and Gubler, 2009), sin embargo, son pocos los estudios que han utilizado técnicas de microscopía para estudiar la interacción patógeno-hospedero en estas especies. En 1988, Biggs y Britton utilizaron microscopía de luz y cortes histológicos para el análisis de la invasión *D. seriata* en árbol de durazno. En este estudio se encontró que *D. seriata* invadió el tejido xilemático de las capas superficiales del xilema,

floema, tejido meristemático y parénquima de los árboles de durazno provocando la necrosis del tejido invadido (Biggs and Britton, 1988). En el estudio de la interacción *Botryosphaeria dothidea* y manzana utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM), se observó que la forma de invasión de las esporas se realizaba a través de heridas en el epicarpio del fruto, y en caso de no encontrarse un sitio de entrada, el patógeno forma un apresorio para la penetración del fruto (Kim *et al.*, 1999). Los estudios con microscopía para *L. theobromae* en álamo, árbol del caucho, pino, bambú y anacardo, han reportado a éste como un patógeno altamente agresivo, capaz de degradar las paredes del xilema, llegando a invadir rápidamente los vasos, los espacios intercelulares y el parénquima; además de poseer un conjunto de enzimas (pectinasas, lactasas y β -1, 3 glucanasas) para llevar a cabo la colonización, la rápida degradación de la pared celular y la asimilación de los nutrientes del medio (Muniz *et al.*, 2011, Cedeño *et al.*, 1996, Encinas and Daniel, 1997, Florence *et al.*, 2002, Ruel and Joseleau, 1987).

En observaciones de TEM y SEM, realizadas por Cedeño en 1996, se halló que *L. theobromae* posee una capacidad de direccionalidad de acuerdo a los nutrientes que necesita para su crecimiento, invadiendo nuevos tejidos en base a sus requerimientos. En la especie de *D. corticola* se ha observado que en su interacción con hojas de roble esta especie utiliza los estomas como sitio de entrada en la planta (Paoletti *et al.*, 2007).

Justificación

La información que se tiene acerca de los mecanismos y los sitios de invasión que los hongos de la familia Botryosphaeraceae utilizan para la colonización de las plantas de vid es muy poca. Por lo cual, en este trabajo se utilizaron técnicas de microscopía para analizar y comparar los sitios de penetración en vid de tres especies de *Botryosphaeria*: *Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodia seriata* y *Diplodia corticola* que presentan alta, intermedia y baja virulencia respectivamente. El entendimiento de los mecanismos de infección de estos hongos, nos ayudaran, a largo plazo a desarrollar estrategias para su control.

Hipótesis

Las esporas de los hongos *Diplodia corticola* cepa SASI12-3, *Diplodia seriata* cepa BY06-3 y *Lasiodiplodia theobromae* cepa UCD256Ma usan mecanismos similares para invadir la madera de vid pero difieren en su tiempo de germinación y en su capacidad infectiva.

Objetivo general

Comparar el comportamiento de tres *Botryosphaeria* sp.: *Diplodia corticola* cepa SASI12-3, *Diplodia seriata* cepa BY06-3 y *Lasiodiplodia theobromae* cepa UCD256Ma en madera de vid

Objetivos específicos.

Comparar las biometrías (tasa de crecimiento, número de hifas, porcentaje de germinación y biomasa) de *Diplodia corticola* cepa SASI12-3, *Diplodia seriata* cepa BY06-3 y *Lasiodiplodia theobromae* cepa UCD256Ma en medio de cultivo con madera y sin madera de vid.

Observar algunas estructuras celulares de *Diplodia corticola* cepa SASI12-3, *Diplodia seriata* cepa BY06-3 y *Lasiodiplodia theobromae* cepa UCD256Ma.

Identificar los sitios y la dirección de penetración de *Diplodia corticola* cepa SASI12-3, *Diplodia seriata* cepa BY06-3 y *Lasiodiplodia theobromae* cepa UCD256Ma sobre madera de vid usando técnicas de microscopía

III

Materiales y métodos

Cepas usadas en este estudio

Las cepas de *Diplodia corticola* SASI12-3 y *Diplodia seriata* BY06-3 fueron aisladas por Candolfi en el 2009, de la zona vitícola del municipio de Ensenada y forman parte de la colección del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). La cepa de *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma fue proporcionada amablemente por el Dr. Douglas W. Gubler de la Universidad de California campus Davis.

Preparación del inoculo

Las cepas fueron incubadas en agar con agua (20 g/L) suplementado con tetraciclina a 25 µg/ml o cloranfenicol a 15 µg/ml, para inhibir la contaminación bacteriana, y se colocaron 4-5 palillos de madera para *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma y *Diplodia seriata* BY06-3 a lo largo del medio de cultivo. Para la cepa de *Diplodia corticola* SASI12-3 se utilizaron troncos de vid, previamente esterilizados, colocados equidistantes sobre el agar. Para la cepa BY06-3 y UCD256Ma, los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 28°C por 3 semanas con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad para inducir la formación de picnidios, mientras que para la cepa SASI12-3 se esperaron 4 semanas. Los picnidios de los hongos fueron colectados extrayéndolos del medio de cultivo con la ayuda de una aguja de disección y realizando una maceración con un pistilo y

un mortero previamente esterilizados. Usando agua destilada estéril se diluyó el macerado y se pasó por filtros (Miracloth, Cal Biochem o Whatman) para la obtener una suspensión de esporas sin micelio. Las esporas se colectaron en tubos Eppendorf de 2 ml. El conteo de la concentración de esporas se hizo por duplicado usando una cámara de Neubauer en 5 cuadrantes (Figura 5). En cada cuadrante se contaron las esporas, los números obtenidos se sumaron y promediaron para cada repetición y con los valores de las dos repeticiones se obtuvo el promedio de esporas (PE), Finalmente, se calculó la concentración de esporas por microlitro con base en la siguiente formula:

$$\text{Esporas } (\mu\text{L}) = (\text{PE})(\text{NC})(\text{FD})(\text{PC})$$

Dónde: PE = Promedio de esporas contadas, NC = Número de cuadrantes (5), FD = Factor de dilución (1) y PC = Profundidad de la cámara (10000).

Dependiendo de la concentración obtenida, se hicieron diluciones agregando agua destilada estéril o se concentraba utilizando la microcentrifuga (VWR®) a 14,000 rpm, hasta obtener una concentración de 40 esporas por microlitro.

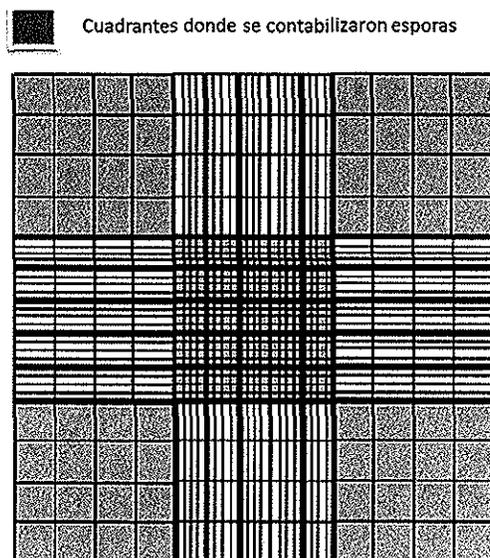


Figura 5. Esquema de una cámara de Neubauer, con azul cielo se representa los cuadrantes en donde se contaron esporas.

Medición de tasas de crecimiento

En cajas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo Medio mínimo de Vogel (MMV) y MMV adicionado con madera (MMVM), se marcó un sitio al extremo de la caja en donde se inocularon 10 μ l de la solución de esporas, se dejaron secar por 30 min bajo una campana de flujo laminar y se sellaron. Las cajas inoculadas se colocaron en una incubadora (VWR®) a 28°C. Cada 12 horas, se marcó el diámetro de crecimiento de la colonia, para la toma de datos y su análisis con pruebas estadísticas; para la medición se marcaron 5 puntos entre cada una de las línea de crecimiento (Figura 6).

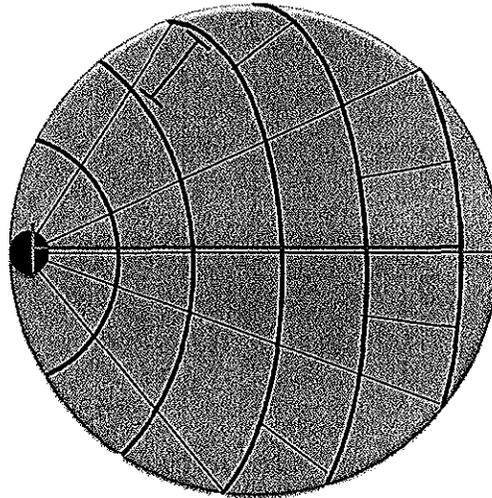


Figura 6. Transectos hechos en la caja Petri para la medición del crecimiento y su estimación estadística.

Medición de Biomasa

Para la determinación de biomasa de los hongos, primeramente se cortaron círculos de 80 mm de una membrana de diálisis (Spectrapor membrane tubing, Spectrum Medical Industries, Inc.), los cuales fueron hervidos por 1 hora para la eliminación de sales. Posteriormente se pesaron usando una balanza analítica (Sartorius, Modelo 1712) y se anotaron los pesos obtenidos. Conforme se pesaban las membranas eran colocadas en cajas Petri con agua estéril y para su identificación se marcó la parte inferior de la caja con un número. Las membranas se esterilizaron a 121°C y 20 atm de presión por 15 min en cajas Petri de vidrio. Una vez estériles, se colocaron sobre medio MMV y MMVM. Sobre las membranas, se inocularon 10 μ l de la suspensión de esporas de cada cepa en el centro de la caja. El experimento se realizó por triplicado.

Las cajas fueron colocadas en una incubadora a 28°C por un periodo de 60 h. Al final, se retiraron las membranas de las cajas y se determinó el peso fresco con una balanza analítica.

Tasas de germinación y ramificación

De cada cepa se inocularon 10 µl de la suspensión de esporas en cajas de 9 cm de diámetro con MMV y MMVM y se esparcieron con el uso de una varilla de cristal, se incubaron a 28°C y se observaron a las 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h para determinar la tasa de germinación y a las 2, 4, 6, y 8 h para estimar el número de hifas producidas. En cada tiempo, se observaron usando un microscopio invertido y la técnica de bloque invertido, con los aumentos *L. thebromae* UCD256Ma y *D. corticola* SASI12-3 se observaron 30 esporas pigmentadas y 30 esporas hialinas, ya que estas especies presentan ambos tipos de esporas. Para la cepa de *D. seriata* BY06-3 se observaron 30 esporas. Las esporas se consideraron como germinadas cuando presentaban una hifa de la mitad del tamaño de la espora y para ramificación se tomaron en cuenta el número de hifas presentadas. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente.

Preparación de cortes

Se usaron plantas de *Vitis vinifera* cultivar Cabernet Sauvignon, procedentes de esquejes de 1 año de edad. Para la inoculación, se realizaron cortes transversales en los tallos para dejar expuesto el tejido fresco, se esperaron 30 min para evitar el lloro de las plantas y las heridas fueron inoculadas con 30 µl de la solución de esporas preparada como se describió anteriormente (Michailides, 1991). Los periodos de incubación fueron 12, 24 y 48 h. Posteriormente, se realizaron cortes transversales, longitudinal-radiales y longitudinal-transversales

de 1 mm de profundidad en el tallo (Figura 7). Todos los trozos de madera fueron fijados con FAA por un periodo de 24 h (Kim *et al.*, 2005).

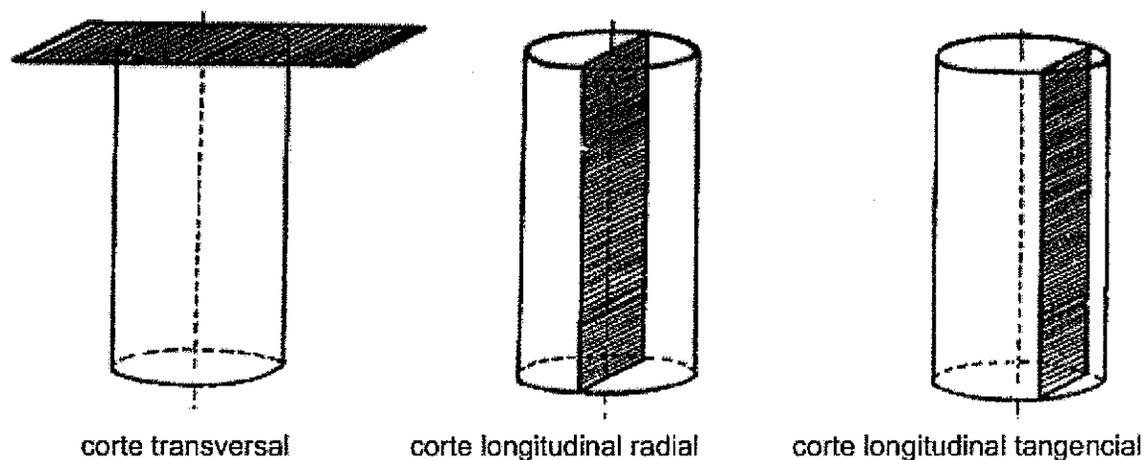


Figura 7. Tipos de cortes utilizados en el estudio de la interacción planta patógeno. El cilindro representa el tallo de vid.

Fijación

El efecto del fijador consiste en detener el metabolismo celular y conservar los tejidos con un mínimo de alteraciones. Para ello se utilizó formalina - ácido acético - alcohol (FAA) que se preparó usando 90ml de alcohol al 50%, 5ml de formalina (formaldehído al 40%) y 5 ml de ácido acético glacial. Las muestras permanecieron por un periodo mínimo de 24 h en este fijador, con excepción de las muestras para tratamiento para SEM donde se utilizó el reactivo de Karnovsky's.

Preparación de muestras para microscopía de luz

Las muestras fijadas en FAA, se colocaron en series de alcohol al 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 96% durante 30 min, continuando con dos lavados de

alcohol etílico absoluto, uno de alcohol etílico absoluto más xilol en proporciones de 3:1, uno de alcohol etílico absoluto más xilol en proporciones 1:1, uno de alcohol etílico absoluto más xilol en proporciones 1:3 y por último las muestras se pasaron a xilol puro. En cada solución, las muestras permanecieron por espacio de 30 min. La inclusión fue con parafina en estufa de 30°C hasta 55°C, y los cortes se realizaron usando un micrótopo a 8 micras de espesor.

La tinción que se usó fue Safranina-Fast Green, ya que está ha demostrado teñir diferencialmente el tejido fúngico y vegetal. El tejido fúngico interacciona con Fast Green obteniendo una coloración verde, mientras que el tejido de la planta interacciona con la Safranina obteniendo una coloración roja, lo que permite una mejor observación del proceso de infección (Flemmer *et al.*, 2010). Para ello se removió la parafina de las muestras y los cortes se colocaron en xileno I, xileno absoluto II, xileno más alcohol absoluto en proporción 1:1 y alcohol absoluto I por un periodo de 5 min en cada solución. Para hidratar los cortes, éstos se pasaron por series de alcohol en concentraciones decrecientes: Absoluto, 95%, 70% y 50% a intervalos de 5 min en cada solución. Posteriormente se colocaron en una solución stock de safranina diluida en agua destilada en proporción 1:1 por toda una noche. Al siguiente día, las muestras se lavaron con agua destilada, se pasaron rápidamente por alcohol acidificado al 70%, alcohol al 95% y alcohol absoluto para quitar el exceso de colorante. Se tiñeron con una solución de Fast Green por 30 segundos, lavándolos en dos cambios de xileno por 15 min cada vez. Finalmente, se montaron en un portaobjetos con Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific) y se observaron en microscopio de luz.

Preparación de muestras para microscopía de epifluorescencia

Para observar la interacción planta-hongo, se preparó una solución de Calcofluor White M2R (Exc/Ems 355/433 nm, Cyanamid) al 1‰ (v/v) en 15% de KOH (p/v) y Calcofluor White stain (Fluka) a 1:1 con 10% de KOH (p/v) (Anexo I).

Las muestras se colocaron en un portaobjetos y se recubrieron con 10 μ l de la solución de Calcofluor White stain y se dejaron reposar por un periodo 2 minutos, posteriormente, se retiró el excedente de colorante y se agregaron 10 μ l de Calcofluor White M2R y se esperó 30 segundos. Las muestras así tratadas, fueron observadas en un microscopio invertido (Axiovert) con microscopía epifluorescente usando un filtro DAPI y una lámpara de mercurio con longitud de onda de 340 nm (Díez-Navajas *et al.*, 2007).

Microscopía confocal

De cada cepa se inocularon 10 μ l de la suspensión de esporas en cajas de 9 cm de diámetro conteniendo medio de Agar-Agua y se esparcieron con el uso de una varilla de cristal en todo el medio. Las cajas se incubaron a 28°C por un periodo de 24 h, con el fin de observar en los conidios su germinación y la formación de hifas vegetativas maduras.

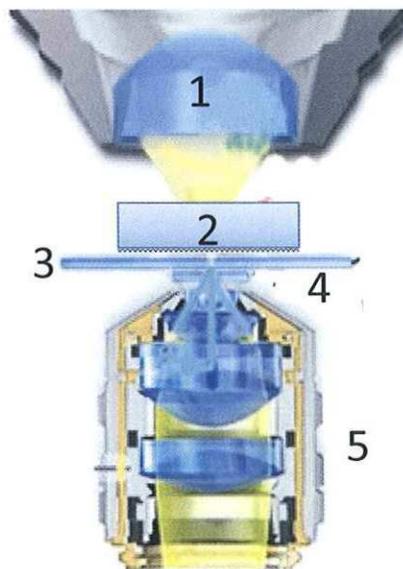


Figura 8. Esquema de la técnica de bloque invertido (Hickey *et al.*, 2005). 1) condensador. 2) bloque de agar. 3) portaobjetos. 4) gota de aceite. 5) objetivo.

Para su observación en microscopía confocal de barrido con láser (CLSM por sus siglas en Inglés), se emplearon 10 μ l del colorante vital lipofílico FM4-64 (Exc/Ems 488/760-640 nm) a una concentración 25 μ M. De las cajas en donde previamente habían crecido las esporas, se cortaron rectángulos de agar de aproximadamente 1 x 2 cm que se colocaron, en un portaobjetos, para su observación utilizando la técnica de bloque de agar invertido (Figura 8) (Hickey *et al.*, 2005). Antes de la observación se esperaron 10 minutos para que el colorante fluorescente penetrara las células. Transcurrido el periodo de espera, las muestras se observaron usando un microscopio invertido (N.A. 13, Plan Neofluar, Carl Zeiss®) con un objetivo de 100X (1.3 A. N. plan-apocromático de inmersión en aceite). Se obtuvieron imágenes en los canales de fluorescencia y contraste de fases. Para fluorescencia se utilizó un láser de Argón para la excitación del fluoróforo, utilizando longitudes de onda de entre 488 a 670 nm. Las imágenes se tomaron con el software LSM 510 versión 3.2 y se analizaron con el software LSM Image Examiner versión 3.2.

Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido

Los cortes de madera inoculados se fijaron en reactivo de Karnovsky's (EMS) durante 4 h a 4°C y se lavaron tres veces con buffer de fosfatos 0.2 M (pH 7.2) por 15 min cada vez. Posteriormente, las muestras fueron postfijadas bajo campana de extracción de gases con tetraóxido de osmio al 4% y se incubaron por 2 h a 4°C. Transcurrido ese tiempo, se realizaron tres lavados con el mismo buffer de fosfatos por 15 minutos cada vez y finalmente se pusieron a deshidratar en un desecador que contenía perlas de sílice durante 1 semana. Para montar las muestras, primeramente, se colocó cinta adhesiva de carbono de doble cara sobre los botones para microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) y sobre ella se colocaron las muestras deshidratadas para ser cubiertas con baños de oro (Ted pella, 99.99%) utilizando un metalizador. Las muestras se

mantuvieron en un desecador hasta su observación, para protegerlas de la humedad y el polvo (Wingfield *et al.*, 1996, J., 1991, Schnee *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 1999). Finalmente, se analizaron usando el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-35c) del Departamento de Geología de CICESE.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos entre las tres especies se realizó el procesamiento de los datos de crecimiento, germinación y número de hifas a través de las pruebas de análisis de varianza múltiple (ANOVA) como prueba paramétrica y por Kruskal-Wallis como análisis no paramétrico, para los análisis de Biomasa se realizó la prueba T. El procesamiento de los datos fue utilizando el programa STATISTICA (StatSoft Inc. Versión 7).

IV

Resultados

Biometrías

Tasa de crecimiento con y sin madera

Los resultados obtenidos muestran un mayor crecimiento en todas las cepas cuando se adicionó madera en el medio de cultivo, aunque los datos obtenidos mostraron cierta variación. En periodos de 12 h, la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma fue la que presentó el mayor crecimiento, de 0.93 ± 0.55 cm en ausencia de madera (SM) y de 1.08 ± 0.64 cm en presencia de madera (CM) (Figura 9) pero no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) cuando se compararon los tratamientos (Figura 10); la cepa de *D. seriata* BY06-3 presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento promedio de 0.61 ± 0.53 cm en SM y de 0.93 ± 0.58 cm en CM (Figuras 9 y 11) y la cepa de *D. corticola* SASI12-3 presentó el menor crecimiento y la menor variación de datos, con un crecimiento promedio de 0.20 ± 0.16 cm en SM y 0.55 ± 0.39 cm en CM (Figura 9) encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) (Figura 12).

Al comparar el crecimiento obtenido al final del experimento, es decir a las 72 h, se observó que la cepa *L. theobromae* UCD256Ma alcanzó un promedio de crecimiento total de 6.51 ± 0.15 cm en CM y 5.59 ± 0.13 cm en SM (Figura 10 y Figura 13 E y F); la cepa de *D. seriata* BY06-3 mostró un promedio de crecimiento de 5.58 ± 0.39 cm en CM y 3.67 ± 0.3 cm en SM (Figura 11 y Figura 13 C y D), y la cepa *D. corticola* SASI12-3 mostró un crecimiento promedio de 3.33 ± 0.3 cm en CM y 1.22 ± 0.09 cm SM (Figura 12 y Figura 13 A y B).

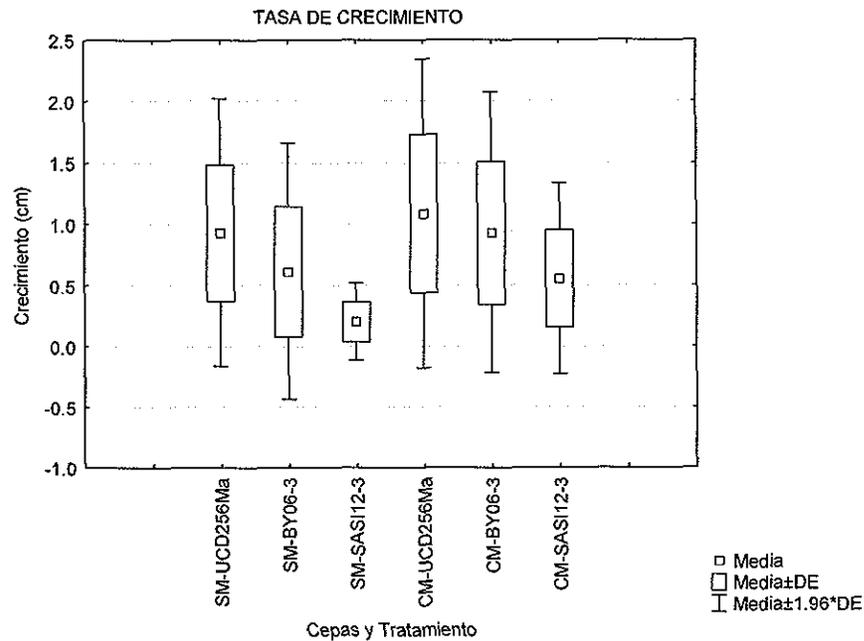


Figura 9. Radio de crecimiento de tres *Botryosphaeria* spp. Se observa que la tasa de crecimiento más alta fue en MMV con presencia de madera (CM), aunque en esta condición se registraron datos muy variables. *L. theobromae* UCD256Ma presentó la mayor tasa de crecimiento y *D. corticola* SAS112-3 la menor.

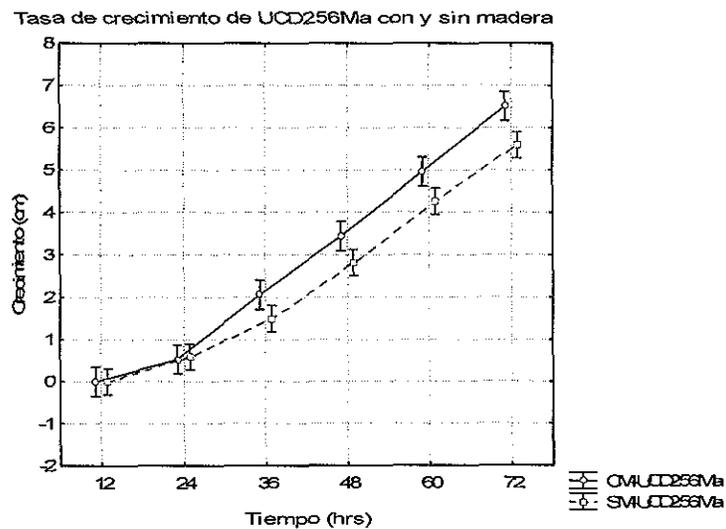


Figura 10. Comparación de crecimiento en la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma en MMV con y sin presencia de madera (CM) y sin madera (SM). El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$).

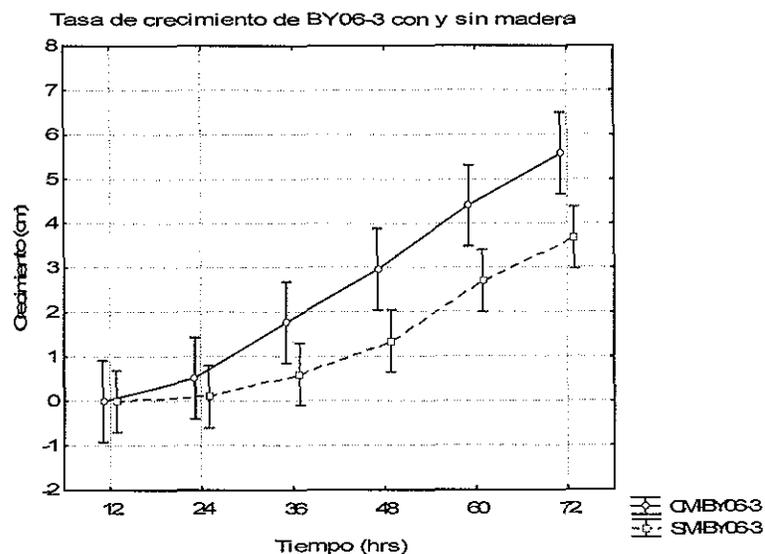


Figura 11. Comparación de crecimiento en la cepa de *D. seriata* BY06-3 en MMV con presencia (CM) y ausencia de madera (SM). El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis mostró diferencias significativas ($p < 0.05$).

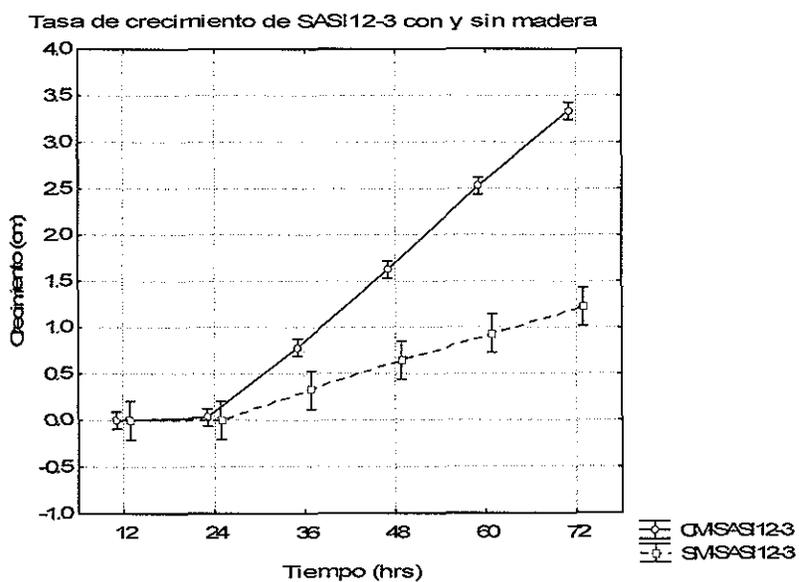


Figura 12. Comparación de crecimiento en la cepa de *D. corticola* SASI12-3 en MMV con presencia (CM) y ausencia de madera (SM). El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis mostró diferencias significativas ($p < 0.05$).

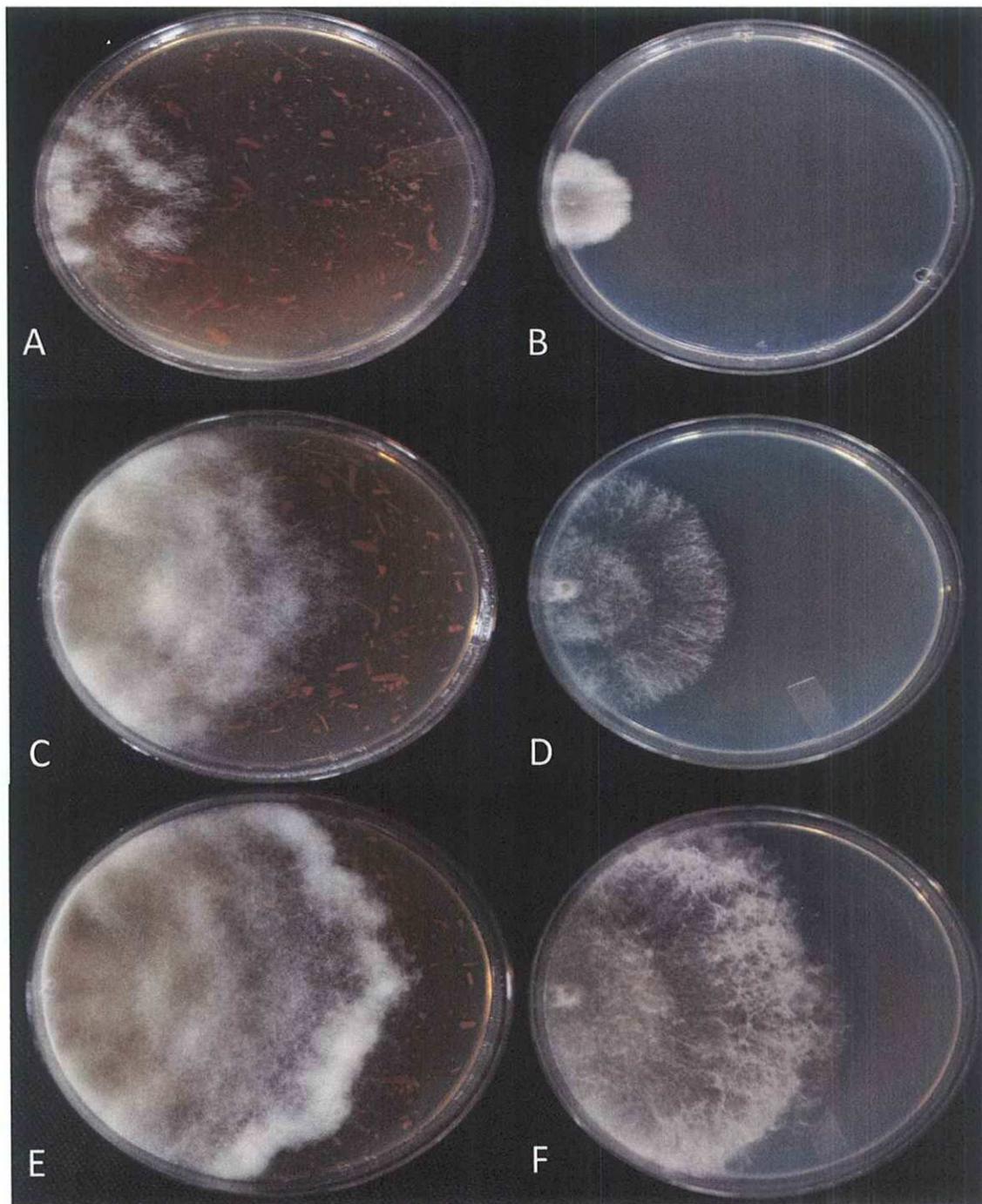


Figura 1. Morfología colonial de cepas de *Botryosphaeria* spp. crecidas en Medio Mínimo de Vogel con madera (A, C y E) y sin madera (B, D y F) después de 72 h en incubación a 28°C. A y B, *D. corticola* SASI12-3; C y D, *D. seriata* BY06-3; E y F, *L. theobromae* UCD256Ma.

Porcentaje de germinación de esporas en presencia (CM) y en ausencia (SM) de madera

Comparación de la germinación de esporas pigmentadas de *L. theobromae* UCD256Ma en SM y CM

L. theobromae UCD256Ma presenta esporas hialinas y pigmentadas, por lo cual, ambos tipos de esporas se analizaron en SM y CM primero por separado y, posteriormente se compararon las esporas hialinas y pigmentadas.

En el análisis general de las esporas pigmentadas, se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la germinación en SM y CM (Figura 14). Se observó un porcentaje de germinación mayor en menor tiempo en CM, sin embargo, conforme pasó el tiempo de inoculación, esta diferencia fue menor, como se detalla a continuación. A las 2 h después de la inoculación, las esporas mostraron un 70% de germinación en CM y un 43% en SM. A las 4 h, presentaron un 90% de germinación en CM y un 73% en SM. A las 6 h, presentaron un 96% de germinación en CM y un 93% en SM. Hasta las 6 h, las diferencias en el porcentaje de germinación fueron significativas ($p < 0.05$), posteriormente (8, 12 y 24 h) ya no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) entre CM y SM.

Comparación de la germinación de esporas hialinas de *L. theobromae* UCD256Ma en SM y CM

En el análisis general de las esporas hialinas, se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre los datos obtenidos en CM y SM (Figura 15). Un porcentaje mayor germinó en menor tiempo en CM, sin embargo, conforme aumentó el tiempo de

espera la diferencia entre los tratamientos fue menor. A las 2 h después de la inoculación las esporas no germinaron en SM y en CM germinó un 10%. A las 4 h la germinación fue de 66% en CM y 53% en SM. A las 6 h la germinación fue de 90% en CM y 66% en SM y a las 8 h fue de 96% en CM y 86% en SM. Hasta las 8 h, las diferencias en el porcentaje de germinación fueron significativas ($p < 0.05$), posteriormente, a las 12 y 24 h, ya no se encontraron diferencias ($p > 0.05$).

Comparación de la germinación de esporas pigmentadas vs hialinas de *L. theobromae* UCD256Ma en SM y CM

En SM existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las esporas hialinas y pigmentadas hasta las 8 h, pero a las 12 y 24 h, no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) (Figura 16). Por otra parte en CM existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las esporas hialinas y pigmentadas hasta las 6 h, posteriormente, a las 8, 12 y 24 h, ya no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) (Figura 17).

Comparación de la germinación de esporas de *D. seriata* BY06-3 en SM y CM

Para la cepa de *D. seriata* BY06-3 los análisis de germinación de esporas mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos (Figura 18). Existiendo diferencias significativas de germinación en presencia de madera (CM) y en ausencia de madera (SM) a las 4, 6, 8, 12 y 24 h. A las 2 horas después de la inoculación, no ocurrió germinación de esporas y por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). A las 4 h se observó un porcentaje de germinación de 6 % en SM y de 53 % en CM; a las 6 h el porcentaje fue de 40% en SM y 64 % en CM; a las 8 h fue 60% en SM y 73% en CM; a las 12 h fue 67% en SM y 80% en CM; y a las 24 h de 87% en SM y 97% en CM.

Comparación de la germinación de esporas de *D. corticola* SASI12-3 en SM y CM

Los análisis estadísticos de germinación en la cepa de *D. corticola* SASI12-3 no mostraron una diferencia significativa ($p>0.05$) en la germinación entre esporas hialinas y pigmentadas, sin embargo si hubo una diferencia significativa entre tratamientos, es decir en CM y SM (Figura 19). A las 2 h después de la inoculación las esporas pigmentadas presentaron 60% de germinación y las hialinas un 43% en presencia de madera (CM), este fue el único periodo de tiempo donde hubo diferencias significativas ($p<0.05$); en el mismo periodo, en el tratamiento sin madera (SM) no hubo germinación, sin importar el tipo de espora. Después de 4 h de la inoculación en CM las esporas pigmentadas presentaron 80% de germinación y las esporas hialinas 76% de germinación, mientras que en el tratamiento SM las esporas pigmentadas presentaron 3% y las hialinas no germinaron. A las 6 h después de la inoculación en CM, las esporas pigmentadas presentaron 86% de germinación y las esporas hialinas 83%, en el tratamiento SM las esporas pigmentadas presentaron 20% y las hialinas 16%. A las 8 h en CM las esporas pigmentadas presentaron 90% de germinación y las hialinas 93%, en el tratamiento SM las esporas pigmentadas presentaron 46% y las hialinas 43%. No hubo diferencias significativas ($p>0.05$) en el porcentaje de germinación de esporas en los periodos de tiempo de 12 y 24 h no importando el tipo de espora o tratamiento aplicado.

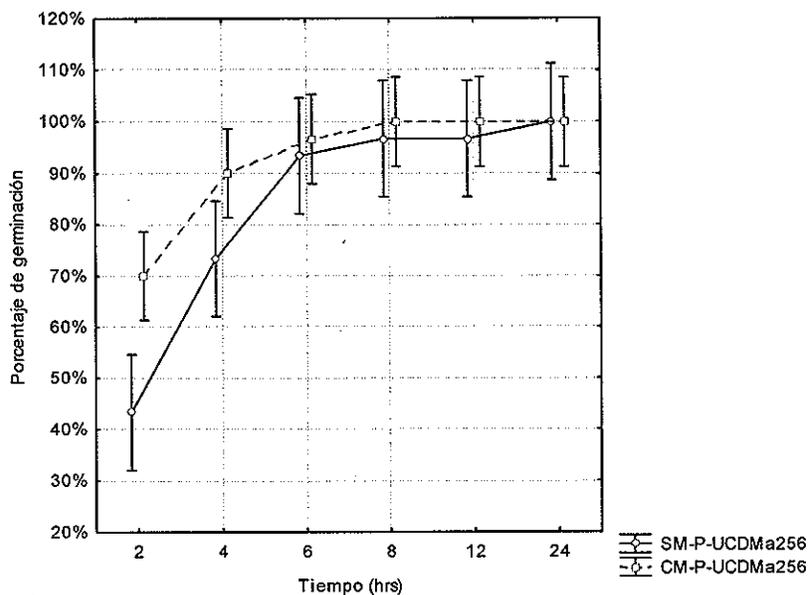


Figura 14. Comparación de la germinación de esporas pigmentadas de la cepa *L. theobromae* UCD256Ma en MMV sin madera (SM) y con madera (CM). El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) hasta las 8 h después de su inoculación.

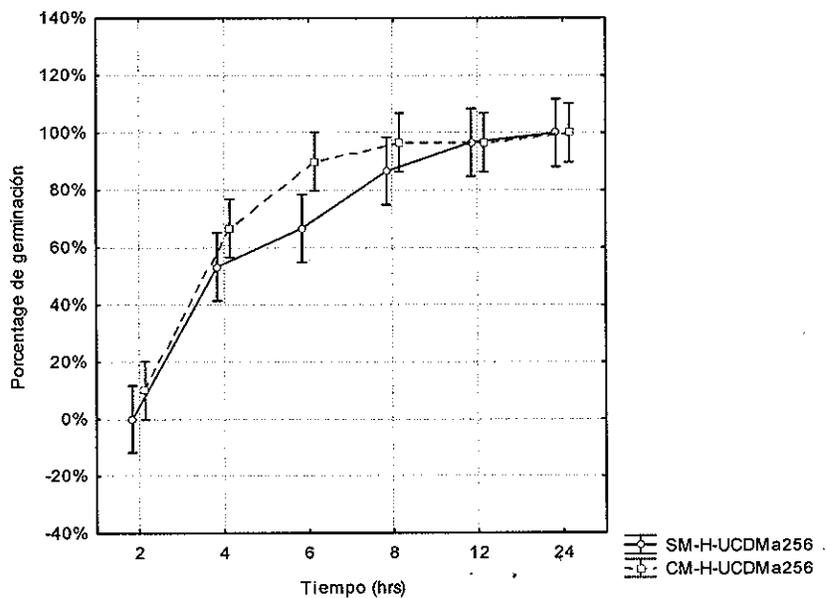


Figura 15. Comparación de la germinación en esporas hialinas de la cepa *L. theobromae* UCD256Ma en MMV sin madera (SM) y con madera (CM). El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) hasta las 8 h, a las 12 y 24 h ya no se encontraron diferencias.

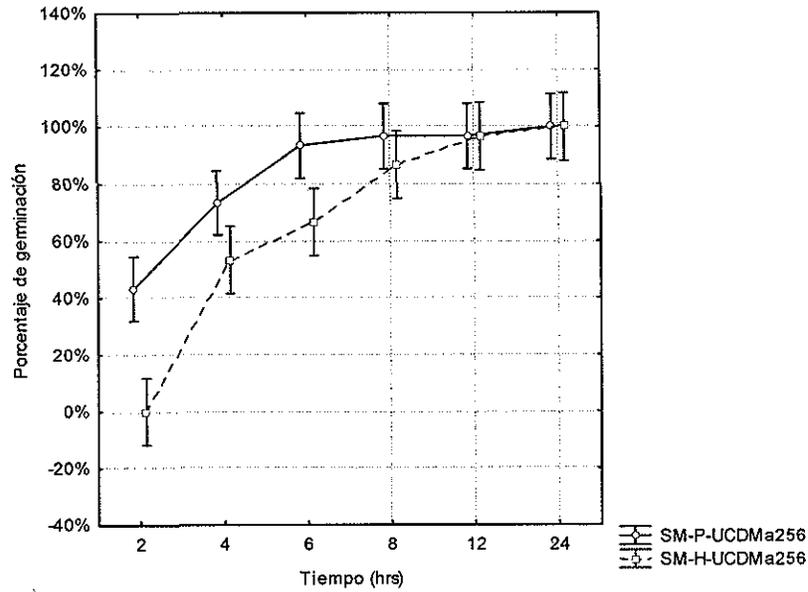


Figura 16. Comparación de la germinación entre esporas hialinas (H) y pigmentadas (P) de la cepa *L. theobromae* UCD256Ma en MMV sin madera (SM). El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) hasta las 8 h.

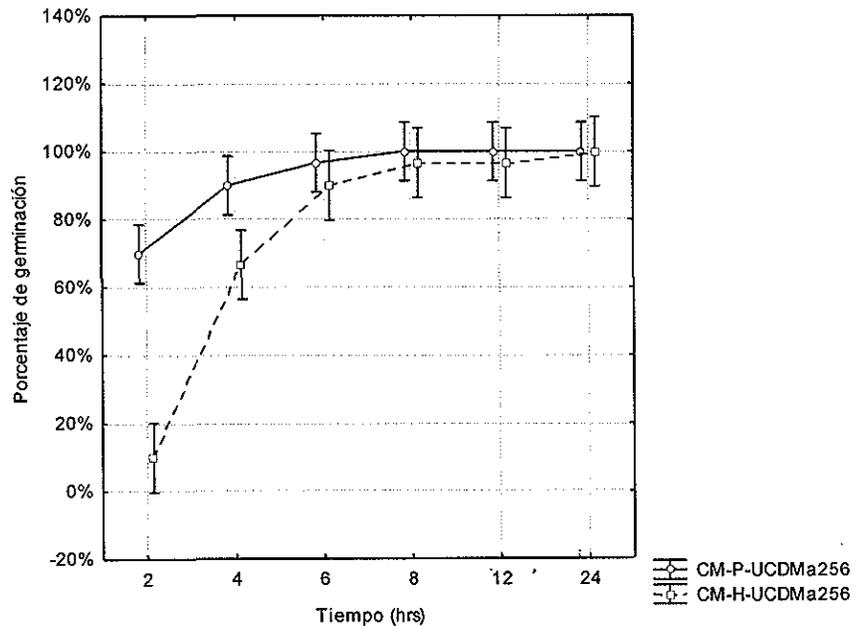


Figura 17. Comparación de la germinación entre esporas hialinas (H) y pigmentadas (P) de la cepa *L. theobromae* UCD256Ma en MMV con madera (CM). El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) hasta las 6 h.

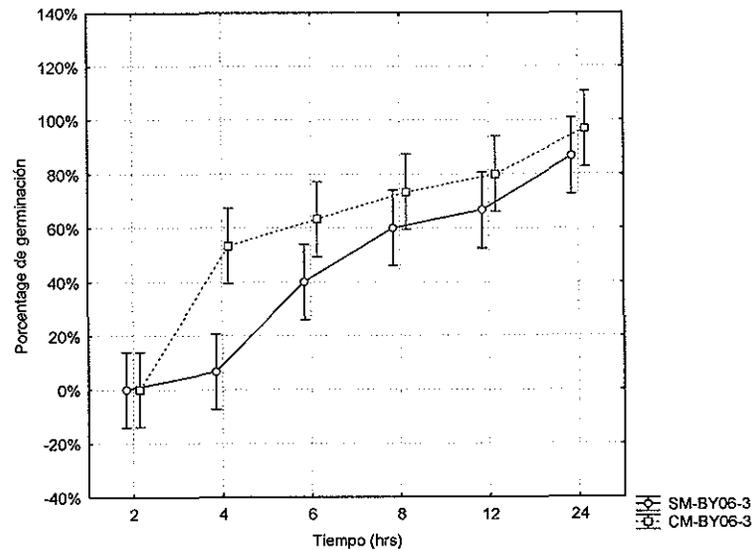


Figura 18. Comparación germinación de esporas pigmentadas para la cepa *D. seriata* BY06-3 en MMV con ausencia (SM) y presencia (CM) de madera. El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$).

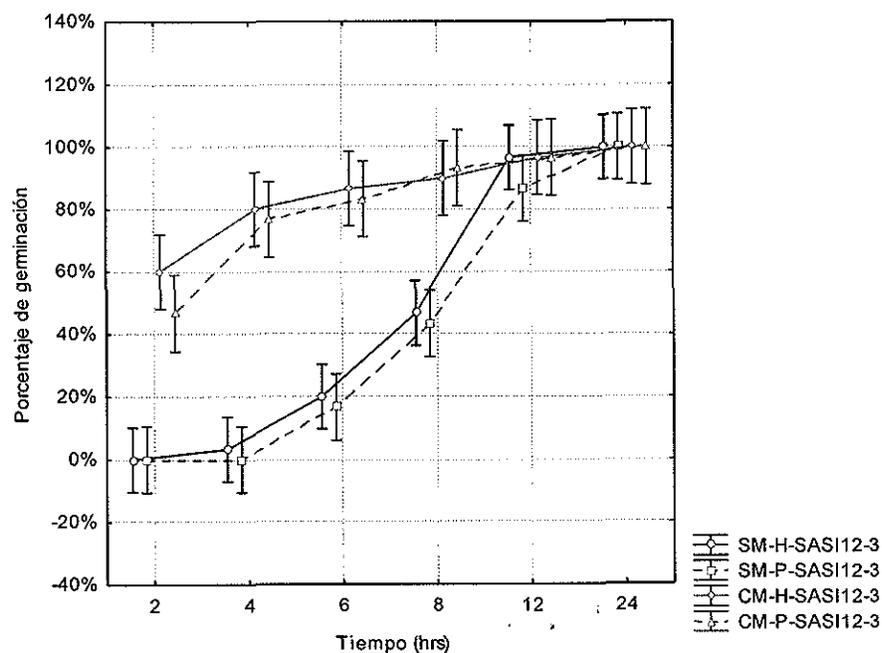


Figura 19. Comparación germinación de esporas pigmentadas (P) y hialinas (H) para la cepa *D. corticola* SAS112-3 en MMV con ausencia (SM) y presencia (CM) de madera. El análisis de los datos indica diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) pero no así entre esporas hialinas y pigmentadas ($p > 0.05$) en prueba de ANOVA y de kruskal-Wallis.

Numero de hifas

Para la cepa *L. theobromae* UCD256Ma los análisis estadísticos mostraron una diferencia significativa en el número de hifas producido por esporas hialinas y pigmentadas, siendo mayor el número de hifas producidas por esporas pigmentadas, no importando la presencia o ausencia de madera (Figuras 20, 21 y 22). Por otro lado, cuando se compararon los tratamientos en esporas del mismo tipo, las esporas hialinas mostraron diferencias, a las 8 h, en el número de hifas con respecto a la presencia o ausencia de madera en el medio, no encontrándose diferencias a las 2,4 y 6 h (Figura 23), y las pigmentadas no tuvieron diferencias significativas en ningún periodo de tiempo (Figura 24).

La cepa de *D. seriata* BY06-3 presentó diferencias en el número de hifas, siendo mayor el número de hifas generado en el medio con madera (Figura 25). La cepa de *D. corticola* SASI12-3 presentó diferencias significativas en el número de hifas con respecto al tratamiento, sin embargo no presentó diferencias significativas en el número de hifas con respecto al tipo de espora (Figura 26).

Cuando se compararon las distintas cepas, *L. theobromae* UCD256Ma obtuvo el mayor número de hifas en comparación con las otras dos cepas en ambos tratamientos (figura 20). Mientras que la cepa *D. seriata* BY06-3 presentó el menor número de hifas en presencia de madera y *D. corticola* SASI12-3 presentó el menor número de hifas en ausencia de madera.

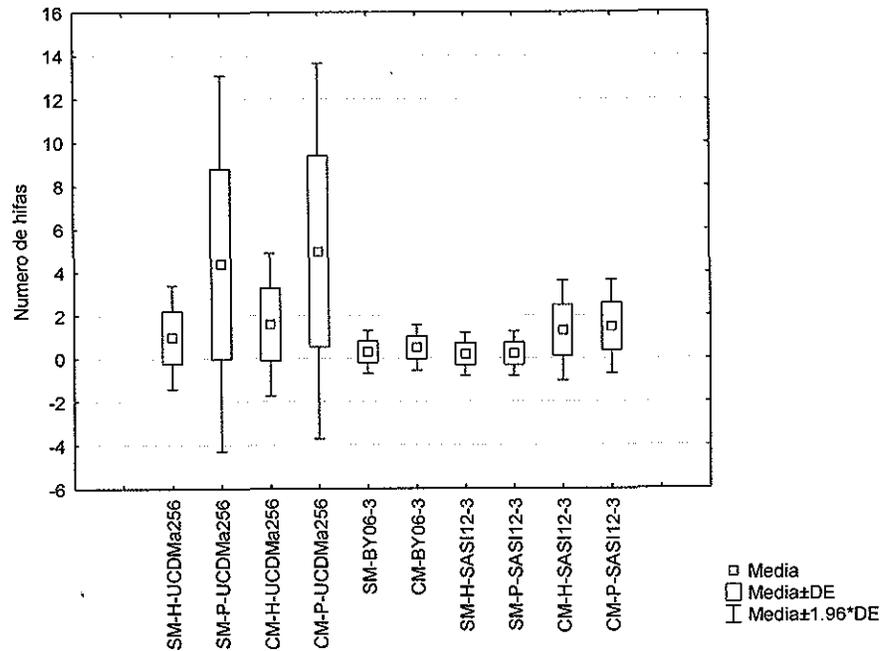


Figura 20. Promedio de número de hifas de acuerdo a la cepa, tratamiento y tipo de espora.

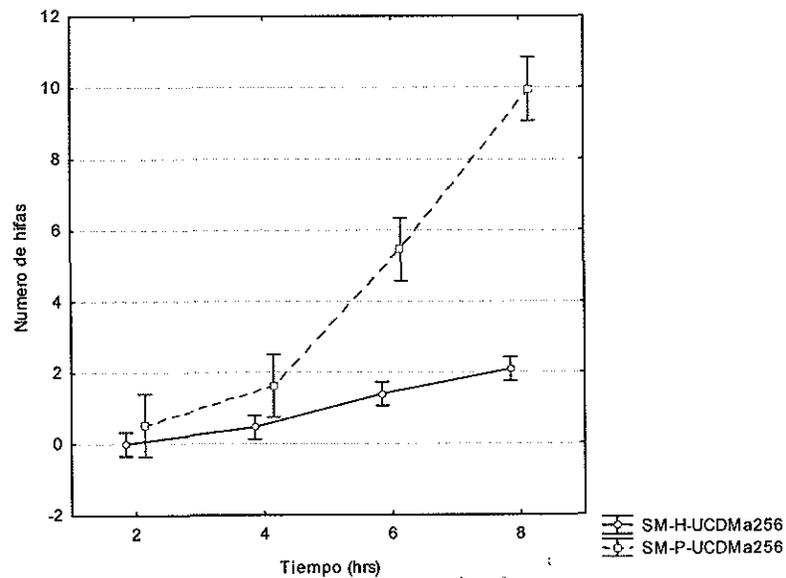


Figura 21. Comparación del número de hifas producidas a partir de esporas hialinas (H) y pigmentadas (P) de la cepa *L. theobromae* UCD256Ma en ausencia de madera (SM). El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis mostró diferencias significativas ($p < 0.05$).

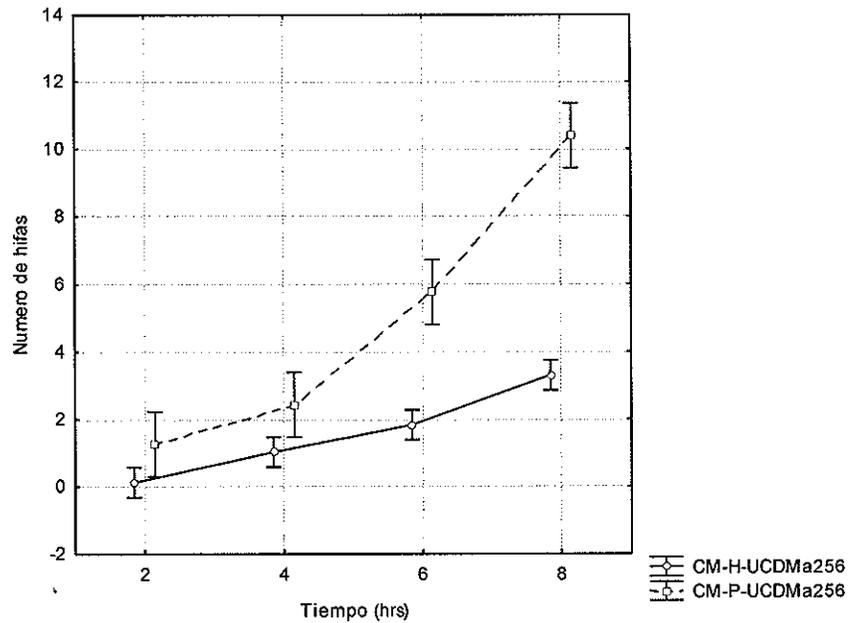


Figura 22. Comparación del número de hifas producidas a partir de esporas hialinas (H) y pigmentadas (P) de la cepa *L. theobromae* UCD256Ma en presencia de madera (CM). El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis mostró diferencias significativas ($p < 0.05$).

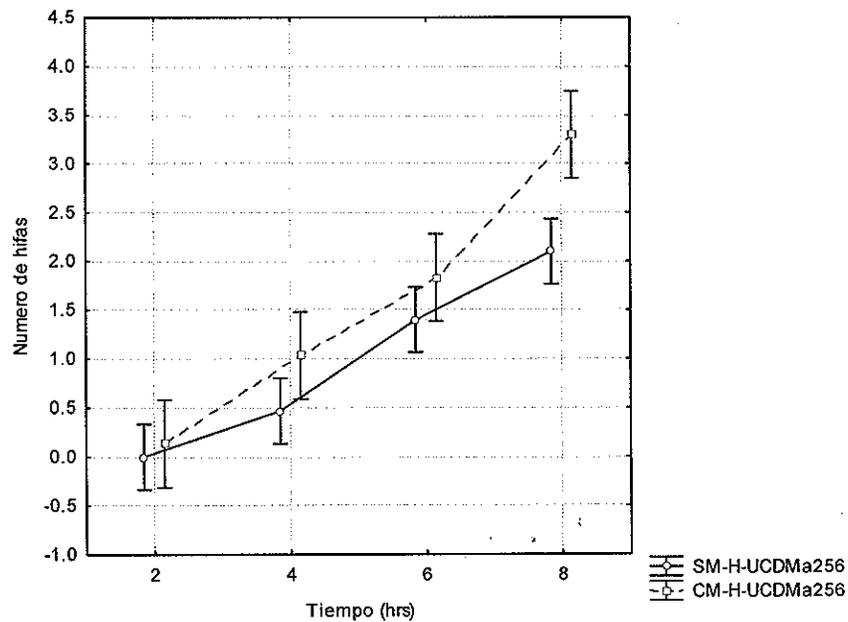


Figura 23. Comparación del número de hifas producidas a partir de esporas hialinas (H) de la cepa *L. theobromae* UCD256Ma en ausencia (SM) y presencia (CM) de madera. El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis mostró diferencias significativas ($p < 0.05$).

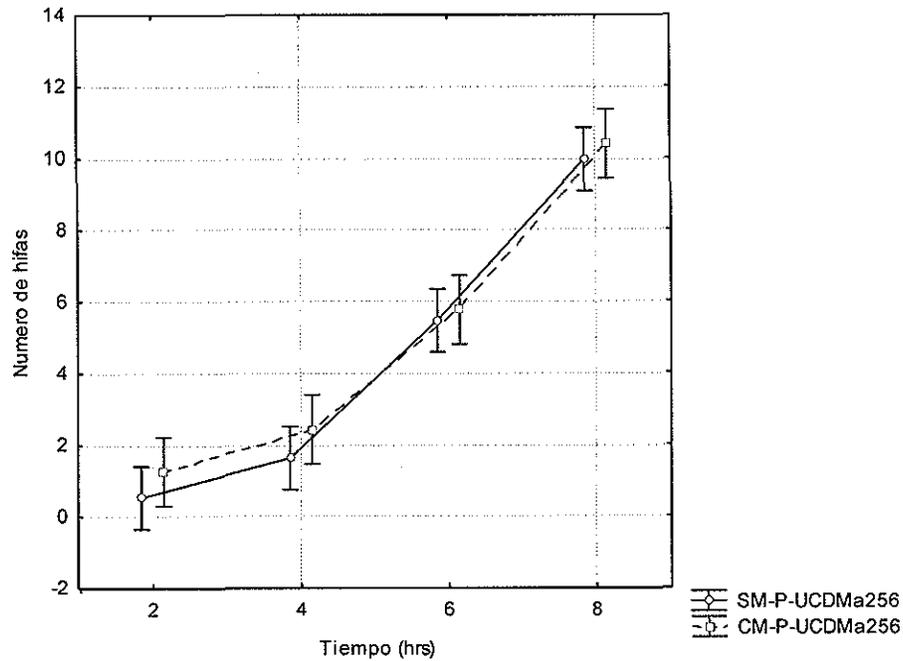


Figura 24. Comparación del número de hifas producidas a partir de esporas pigmentadas (P) de la cepa *L. theobromae* UCD256Ma en ausencia (SM) y presencia (CM) de madera. El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$).

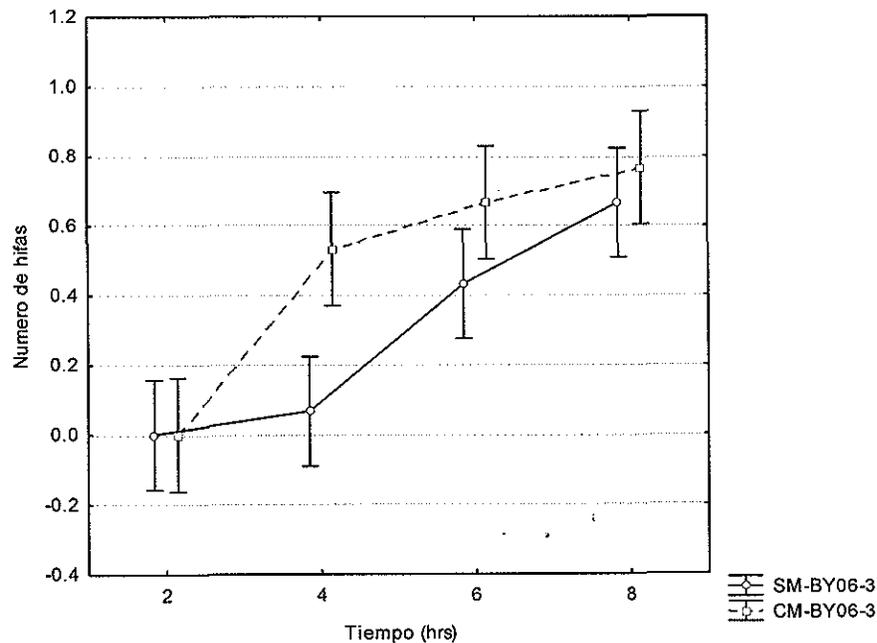


Figura 25. Comparación del número de hifas producidas a partir de esporas de la cepa *D. seriata* BY06-3 en ausencia (SM) y presencia (CM) de madera. El análisis de ANOVA y de kruskal-Wallis mostró diferencias significativas ($p < 0.05$).

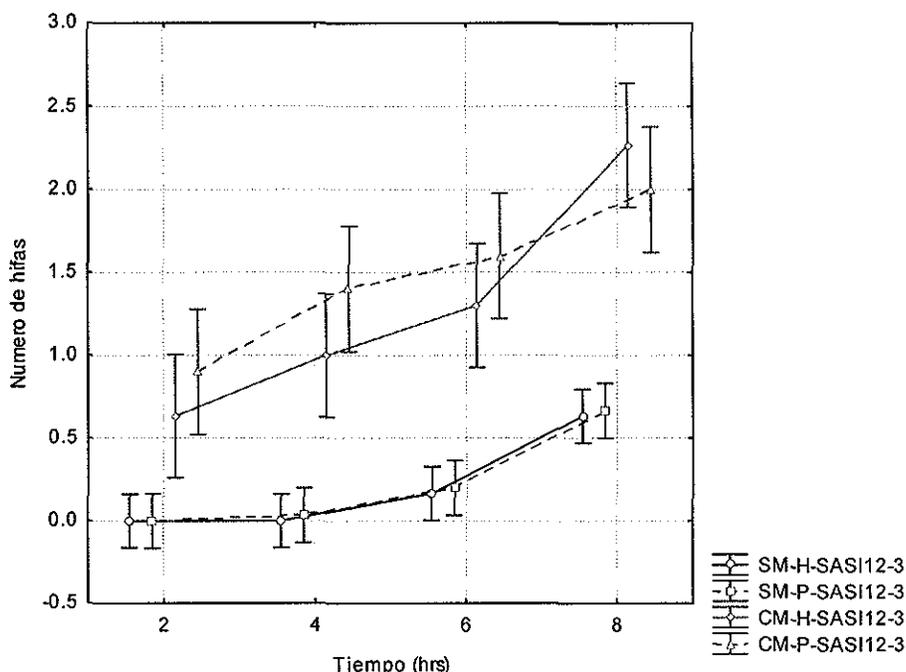


Figura 26. Comparación del número de hifas producidas a partir de esporas pigmentadas (P) y hialinas (H) en la cepa *D. corticola* SASI12-3 en ausencia (SM) y presencia (CM) de madera. El análisis de los datos indicó diferencias significativas entre estos tratamientos ($p < 0.05$) pero no así entre esporas hialinas y pigmentadas ($p > 0.05$) en prueba de ANOVA y de kruskal-Wallis.

Biomasa

La cepa *L. theobromae* UCD256Ma produjo la mayor biomasa con un peso promedio de 0.3724 ± 0.0037 g en presencia de madera y 0.2708 ± 0.0294 g en ausencia de madera. La cepa de *D. seriata* BY06-3 registro un peso promedio de 0.2686 ± 0.0176 g en presencia de madera y 0.2294 ± 0.0163 g en ausencia de madera. La cepa de *D. corticola* SASI12-3 registró la menor biomasa para ambos tratamientos en comparación con las otras cepas teniendo un peso promedio de 0.2619 ± 0.0024 g en presencia de madera y 0.2230 ± 0.0133 g en ausencia de madera. No existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las cepas SASI12-3 y BY06-3 en ambos tratamientos, pero se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la cepa UCD256Ma (Figura 27).

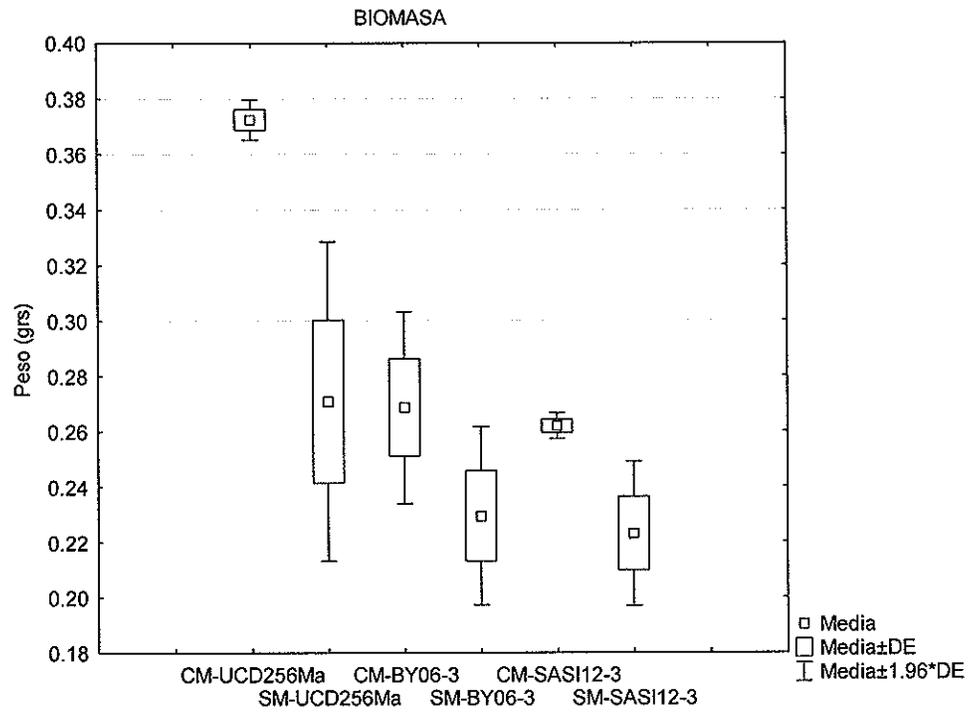


Figura 27. Biomasa producida por tres cepas de *Botryosphaeria* spp. en ausencia (SM) y presencia (CM) de madera. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para todas las cepas cuando se compararon CM y SM.

Microscopía confocal

En el análisis por microscopía confocal se observó la distribución del colorante vital de endomembranas, FM4-64 en hifas vegetativas maduras, septos y esporas. Para la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma al observar las hifas se encontró fluorescencia en las puntas. Esta señal se presentaba de manera intensa alrededor de la zona de Spitzenkörper (centro administrador de vesículas), la membrana celular, las endomembranas y con una ligera concentración en el citoplasma. La intensidad de la fluorescencia disminuyó hacia la zona sub-apical hasta ser casi nula en zonas distales, los mismos resultados se obtuvieron para las cepas de *D. corticola* SASI12-3 y *D. seriata* BY06-3 (Figuras 28, 29 y 30 paneles A).

Posterior al análisis de las regiones apicales se analizó la distribución del FM4-64 en regiones distales, encontrándose que el colorante marcó el sitio de formación de los septos, la fluorescencia se mantuvo en toda el área ocupada por el septo, obteniendo resultados similares para las tres cepas (Figuras 28 y 30 paneles B, Figura 29 panel C).

Para la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma, al observar esporas hialinas se encontró fluorescencia del FM4-64 en la membrana celular y ligeramente en el contenido citoplasmático. Sin embargo, al analizar la esporas pigmentadas estas no mostraron fluorescencia (Figura 28, paneles C y D). Las esporas de la cepa de *D. seriata* BY06-3 no mostraron fluorescencia (Figura 29 panel D). Por último las esporas hialinas de la cepa de *D. corticola* SASI12-3 mostraron una alta intensidad de señal en membrana y contenido citoplasmático (Figura 30 panel C), conforme la espora se iba pigmentando era menor la fluorescencia presentada, hasta desaparecer en esporas totalmente pigmentadas (Figura 30 paneles D y E)

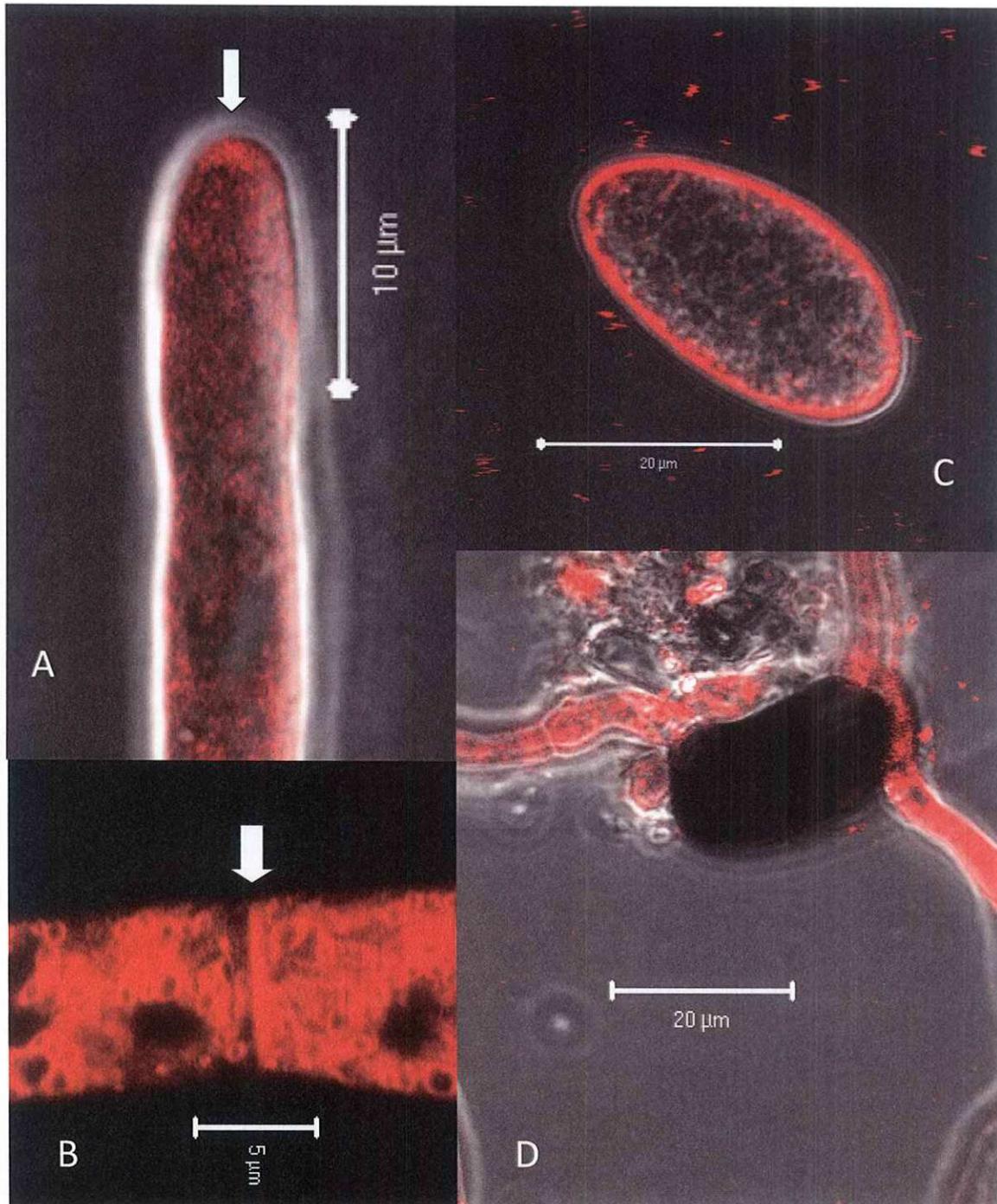


Figura 28. Microscopía confocal de la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma teñida con FM4-64. Panel A; la zona apical de una hifa madura, se observa una acumulación de FM4-64 en la zona del Spk; panel B; acumulación de FM4-64 en septo y endomembranas de orgánulos; panel C; espora hialina; panel D; espora pigmentada.

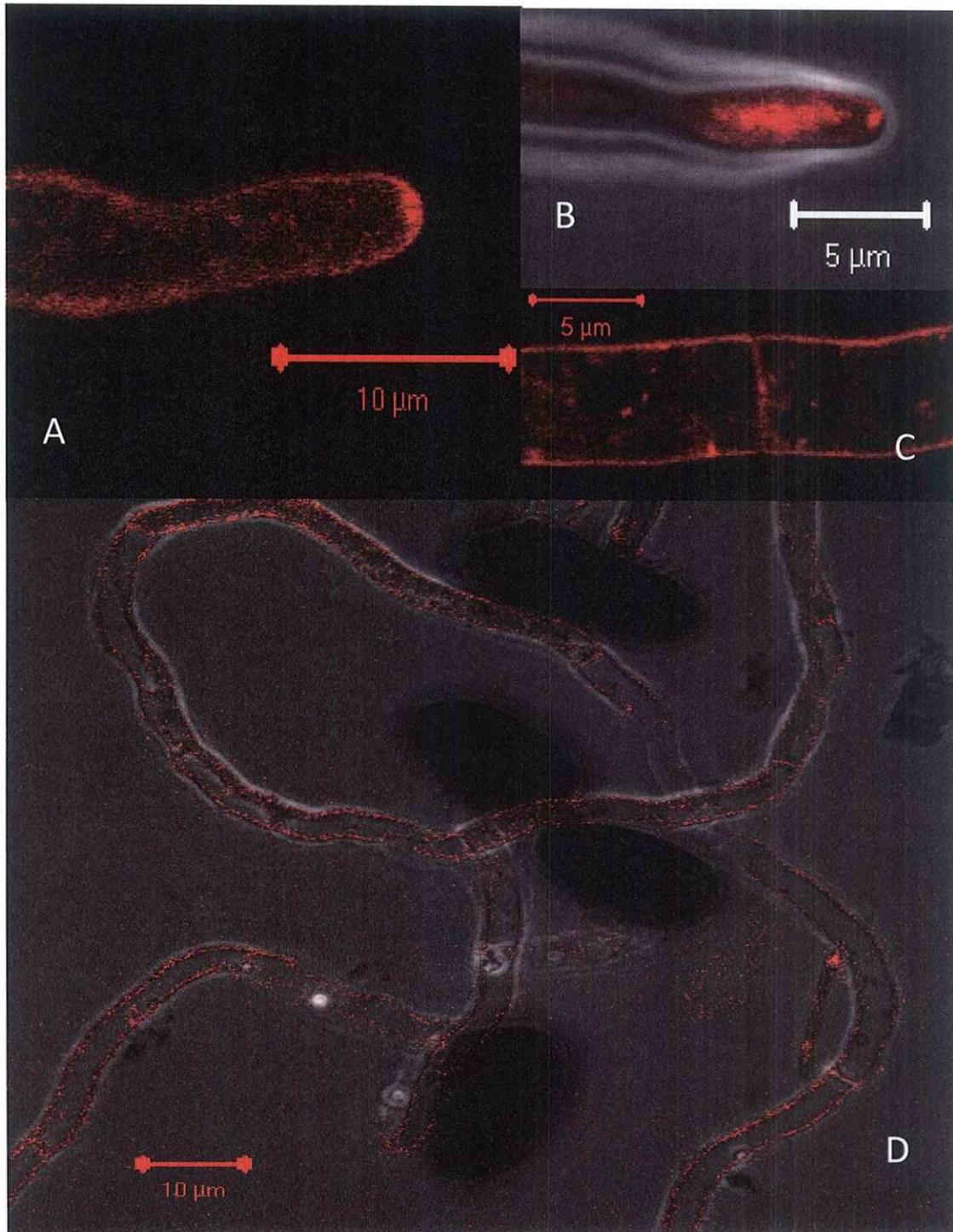


Figura 29. Microscopía confocal de la cepa de *D. seriata* BY06-3 teñida con FM4-64. Panel A y B; zona apical de una hifa madura, se observa una acumulación de FM4-64 en la zona del Spk; panel C; acumulación de FM4-64 en septo y endomembranas de orgánulos; panel D; esporas.

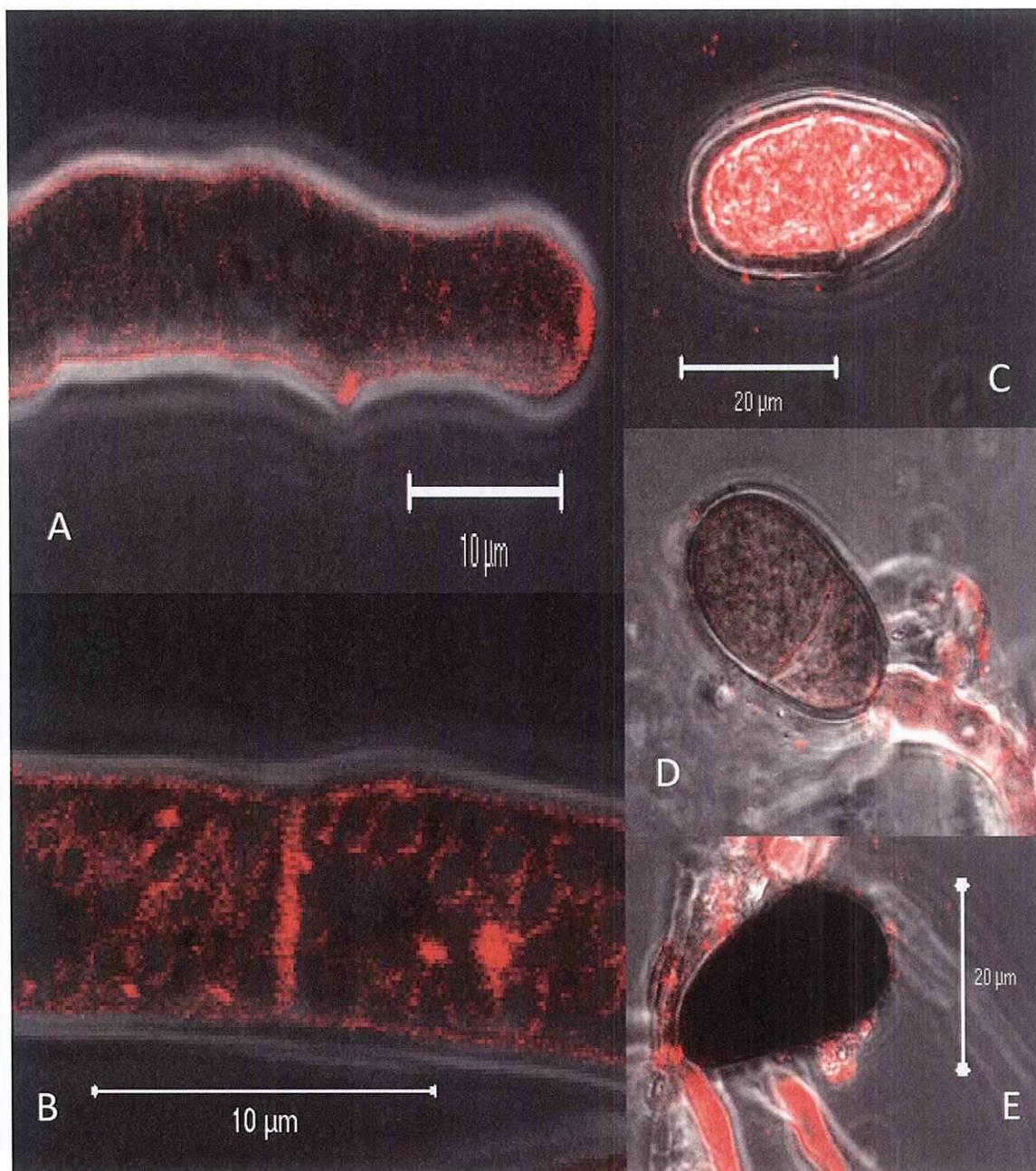


Figura 30. Microscopía confocal de la cepa de *D. corticola* SASI12-3 teñida con FM4-64. Panel A; zona apical de una hifa madura se observa una acumulación de FM4-64 en la zona del Spk; panel B; acumulación de FM4-64 en septo y endomembranas de orgánulos; panel C; espora hialinas; panel D; espora parcialmente pigmentada; panel E; espora pigmentada.

Microscopía de Luz

El análisis por microscopía de luz no fue eficiente para la observación del proceso de penetración de estas cepas ya que las esporas y sus hifas se perdían durante los tratamientos aplicados para su visualización.

Microscopía de Epifluorescencia

En las observaciones de cortes transversales del tallo de vid, sin inocular, se observó una diferencia en fluorescencia en los diferentes tejidos que componen el tallo de vid. El parénquima medular, parénquima radial, xilema primario, xilema secundario y floema secundario mostraron la mayor fluorescencia en comparación con los otros tejidos (Figura 31, panel A). Mientras que el tejido del cambium y floema primario no mostraron fluorescencia (Figura 31, panel B). Los tejidos esclerenquimáticos y las tilosas se observaron con una fluorescencia rojiza (Figura 31, paneles B y D).

Por otro lado, en las observaciones de cortes longitudinales de tallo de vid, se observó una mayor fluorescencia en tráqueas que en el resto de los tejidos, las traqueidas mostraron un arreglo libriforme (Figura 31, panel F). Manteniéndose las condiciones de lo anteriormente señalado para los tejidos restantes.

Observaciones de la colonización de *L. theobromae* UCD256Ma en tejido de vid

En el análisis por microscopía de epifluorescencia de cortes transversales de madera de vid inoculada con *L. theobromae* UCD256Ma, a las 12 h se observó que las esporas no habían germinado sobre el tejido expuesto. Las esporas hialinas presentaron fluorescencia mientras que las esporas pigmentadas

no, también se captaron pequeñas partículas de polvo del medio en que se encontraban las plantas (Figura 32, panel A).

A las 24 h se observó germinación en la parte central de la espora con crecimiento de hifas, que se dirigieron a las tráqueas, traqueidas y floema, siendo las tráqueas los más recurrentes sitios de entrada (Figura 32, paneles B, C, D y E). A pesar de tener un sitio de entrada cercano, las hifas no presentaron direccionalidad aparente hacia algún tejido. No se observó la formación de estructuras especiales para la colonización del tejido, ni degradación o colapso de la espora, tampoco se observó degradación del tejido sobre el que se encontraban creciendo las hifas. La totalidad de las esporas habían germinado en este lapso de tiempo. El hongo se encontró distribuido mayormente en el xilema secundario (Figura 32; paneles D y E), se observó la presencia de septos en las hifas y ramificaciones que se extendieron a lo largo de todo el tronco; sin embargo no se observaron diferencias en el diámetro de las hifas (Figura 32, panel B). A las 48 h se observó un crecimiento extensivo en todo el tronco, hifas con diferentes diámetros, con un número elevado de ramificaciones, entrando por tráqueas traqueidas y floema. Las esporas no se mostraron degradadas o colapsadas. Se observó un mayor desarrollo de hifas en el área del xilema que en el floema (Figura 33). En las tráqueas se observó la formación de tilosas en los conductos. El tejido parenquimático medular y radial no fue degradado o utilizado como medio para la colonización de la planta, sin embargo para las 24 y 48 h se observó el crecimiento sobre el mismo hasta llegar al tejido xilemático.

En cortes longitudinales a las 48 h, se observó a las hifas de *L. theobromae* UCD256Ma colonizando los conductos xilemáticos, degradando las paredes de los vasos y colonizando el tejido adjunto. En la figura 34 paneles A y B se observa un halo negro alrededor de la hifa, con un amplio daño en la pared del vaso, esto se interpretó como la degradación de la celulosa, ya que este es el sustrato de unión del calcofluor. También se observó degradación y engrosamiento de las

punteaduras para usarlas como sitios de propagación hacia las células vecinas. En la figura 34 paneles C y D se observan hifas colonizando las células de las traqueidas a partir de una tráquea. En la figura 34 panel D se observa la invasión del tejido parenquimático a partir de una tráquea colonizada, se observan ensanchamientos en las punteaduras para su utilización como puentes de entrada hacia las otras células.

Observaciones de la colonización de *D. seriata* BY06-3 en tejido de vid.

En el análisis de los cortes transversales por microscopía de epifluorescencia de *D. seriata* BY06-3 en tronco de vid, a las 12 h se observó a las esporas no germinadas sobre el tejido expuesto, las esporas no presentaron fluorescencia al teñirlas con calcofluor y también se capturaron pequeñas partículas de polvo del medio en que se encontraban las plantas. A las 24 h, varias esporas no germinaron, y las que germinaron se observó su germinación en la parte central de la espora con crecimiento de hifas, hacia las tráqueas y traqueidas, siendo las tráqueas los sitios de entrada más recurrentes (Figura 35, panel A; Figura 36, panel A). A pesar de tener un sitio de entrada cercano, las hifas no presentaron direccionalidad aparente hacia algún tejido. No se observó la formación de estructuras especiales para la colonización del tejido, tampoco se observó degradación o colapso de la espora, ni degradación del tejido sobre el que se encontraba creciendo las hifas. Las esporas germinadas presentaron pocas ramificaciones, de 2 a 3, con un crecimiento principalmente lineal sobre el tejido hasta encontrar una abertura para penetrar dentro de la planta. Se observó la presencia de septos en las hifas, no existiendo diferencias en el diámetro de las hifas generadas (Figura 35, paneles B y C). A las 48 h se observaron pocas ramificaciones, de 4 a 6, y la colonización del tejido floemático (Figura 36, panel C). No se observó degradación o colapso de las esporas. En las tráqueas se observó la formación de tilosas en los conductos (Figura 36, panel B). El tejido

parenquimático medular y radial no fue degradado o utilizado como medio para la colonización de la planta, sin embargo para las 24 y 48 h se observó el crecimiento sobre el mismo hasta llegar al tejido del xilemático.

En cortes longitudinales a las 48 h, se observó a las hifas de *D. seriata* BY06-3 colonizando los conductos xilemáticos; no se observó degradación de las paredes de los vasos o la colonización del tejido adjunto. En la Figura 37 se observa a las hifas colonizando una tráquea.

Observaciones de la colonización de *D. corticola* SASI12-3 en tejido de vid

En el análisis de cortes transversales por microscopía de epifluorescencia de *D. corticola* SASI12-3 en tronco de vid, a las 12 h se observó a las esporas no germinadas sobre el tejido expuesto, las esporas hialinas presentaron fluorescencia mientras que las esporas pigmentadas no. A las 24 h, se observó la germinación por la parte central de la espora con crecimiento de hifas, entrando en tráqueas, traqueidas y floema, siendo las tráqueas los sitios más recurrentes de entrada (Figura 38, panel C). A pesar de tener un sitio de entrada cercano, las hifas no presentaron direccionalidad aparente hacia algún tejido. No se observó la formación de estructuras especiales para la colonización del tejido, ni degradación o colapso de la espora, ni degradación del tejido sobre el que se encontraban creciendo las hifas. También se observó que la mayoría de las esporas germinaron para este lapso de tiempo, sin embargo no fueron la totalidad de las mismas (Figura 38, panel B). Las esporas germinadas presentaron pocas ramificaciones, se observó la presencia de septos en las hifas, no existiendo diferencias en el diámetro en las hifas generadas. Se observó la formación de tilosas en tráqueas (Figura 38, panel A). A las 48 h se observaron un nivel de ramificación alto (Figura 39). No se observó degradación o colapso de las esporas.

En las tráqueas se observó la formación de tilosas en los conductos. El tejido parenquimático medular y radial no fue degradado o utilizado como medio para la colonización de la planta, sin embargo para las 24 y 48 h se observó el crecimiento sobre el mismo hasta llegar al tejido xilemático (Figura 38, panel D).

En cortes longitudinales a las 48 h, se observó a las hifas de *D. corticola* SASI12-3 colonizando los conductos xilemáticos; sin embargo, no se observó degradación de las paredes de los vasos o la colonización del tejido adjunto. En la Figura 40 se observa a las hifas colonizando una tráquea, sin embargo no se observó una alta existencia de ramificaciones.

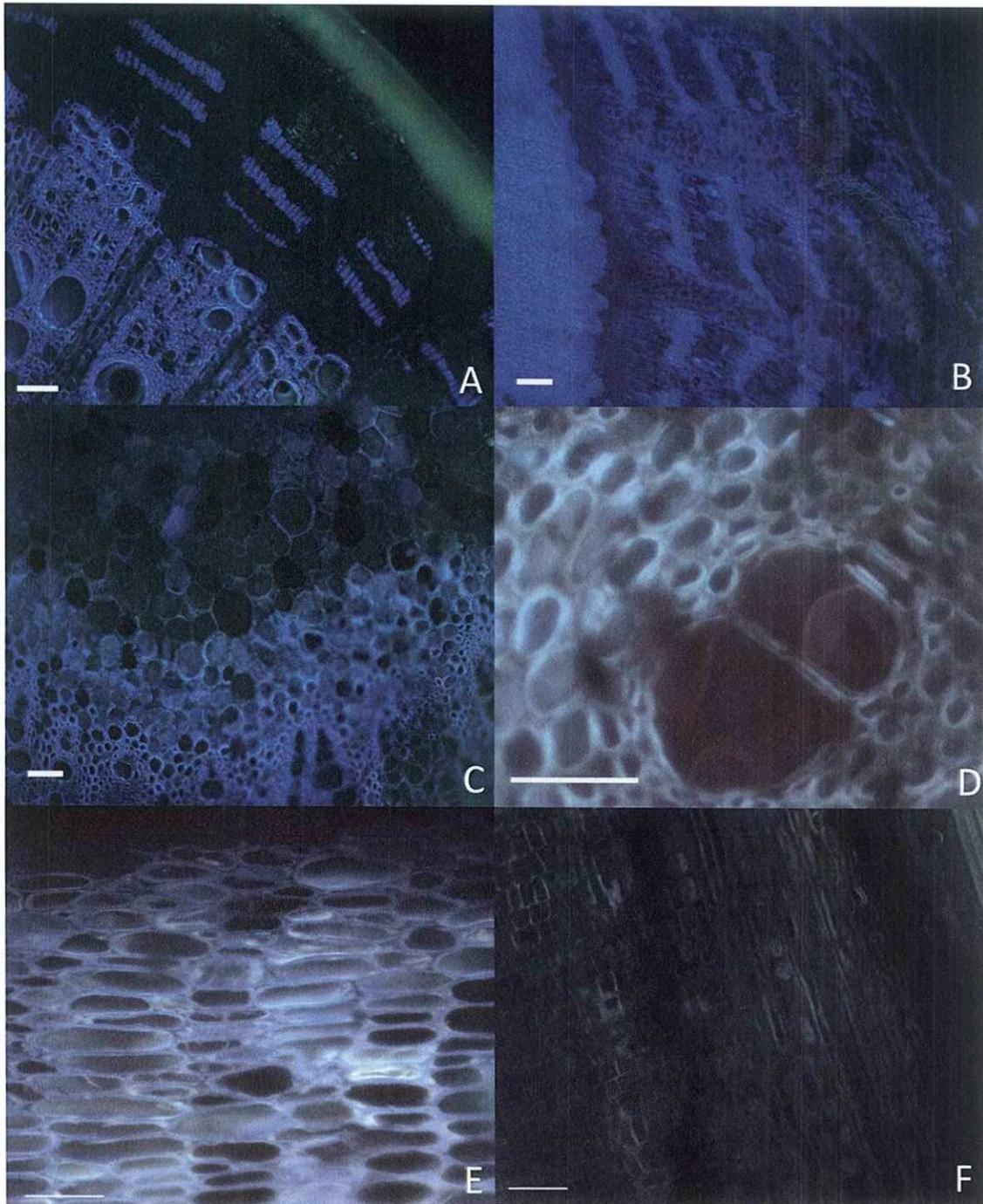


Figura 31. Cortes transversales (A-D) y longitudinales (E-F) de tallo de vid sin inocular. A, tallo de vid con diferencias de epifluorescencia entre los tejidos. B, floema, cambium y esclerénquima, este último de una tonalidad rojiza. C, parénquima medular. D, formación de tilosas (rojas) dentro de traquea. E, parénquima medular. F, parénquima libriforme en traqueidas. Barras de 50 µm.

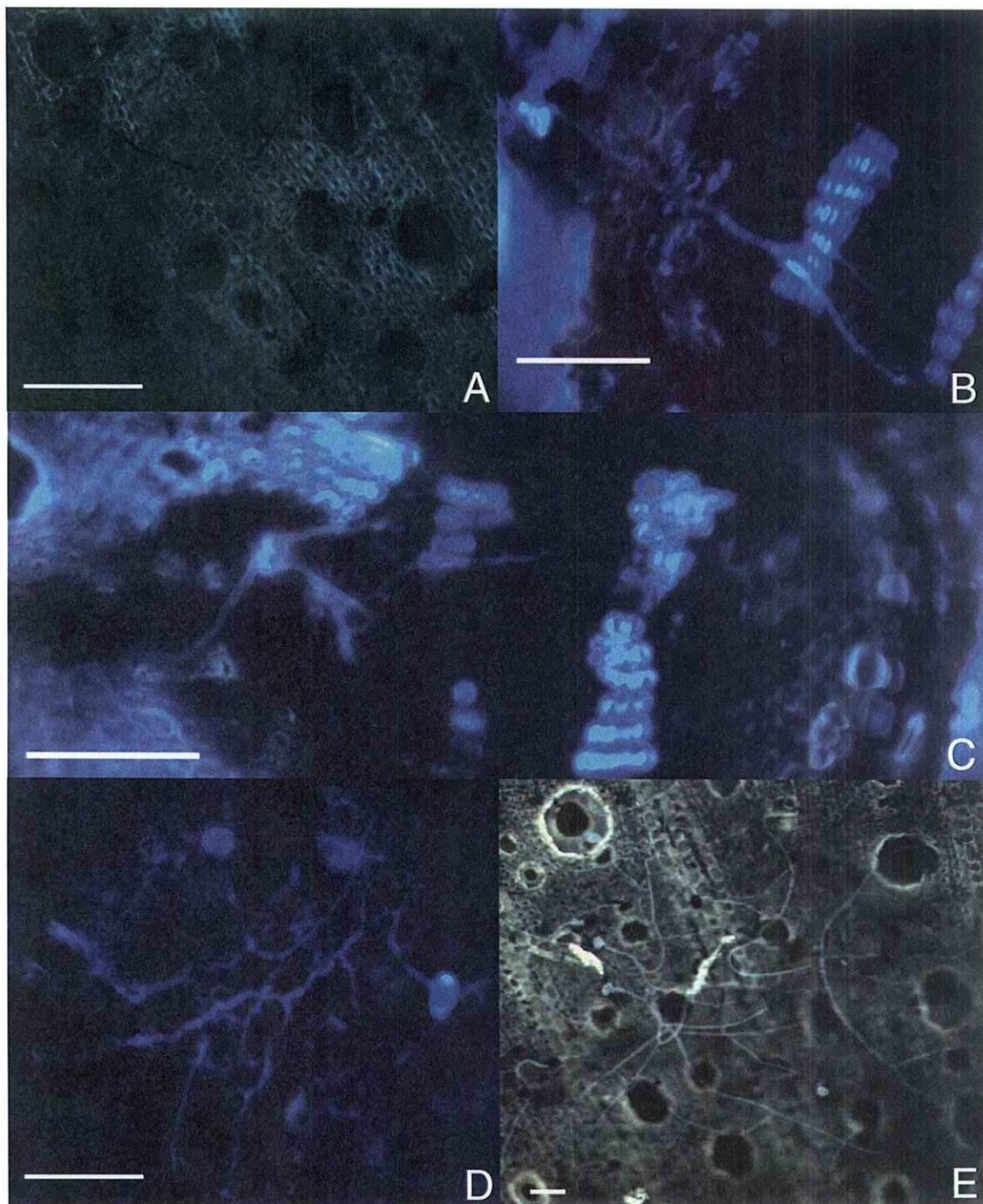


Figura 32. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa *L. theobromae* UCD256Ma a las 12 h (A) y 24 h (B, C, D y E). A, esporas sobre tallo de vid, no se observó germinación, barras de 100 μm . B, hifa colonizando tejido floemático, el color del tejido es rojo y oscuro por la presencia de lignina y una menor cantidad de celulosa. C, hifas entrando por floema y xilema. D, hifas creciendo en el tejido xilemático, se observa que a pesar de la cercanía de las tráqueas, las hifas no presentaron taxis hacia ellas. E, tejido xilemático, nótese que las algunas hifas pasaron sobre las tráqueas sin entrar a ellas. Barras B-E de 50 μm .

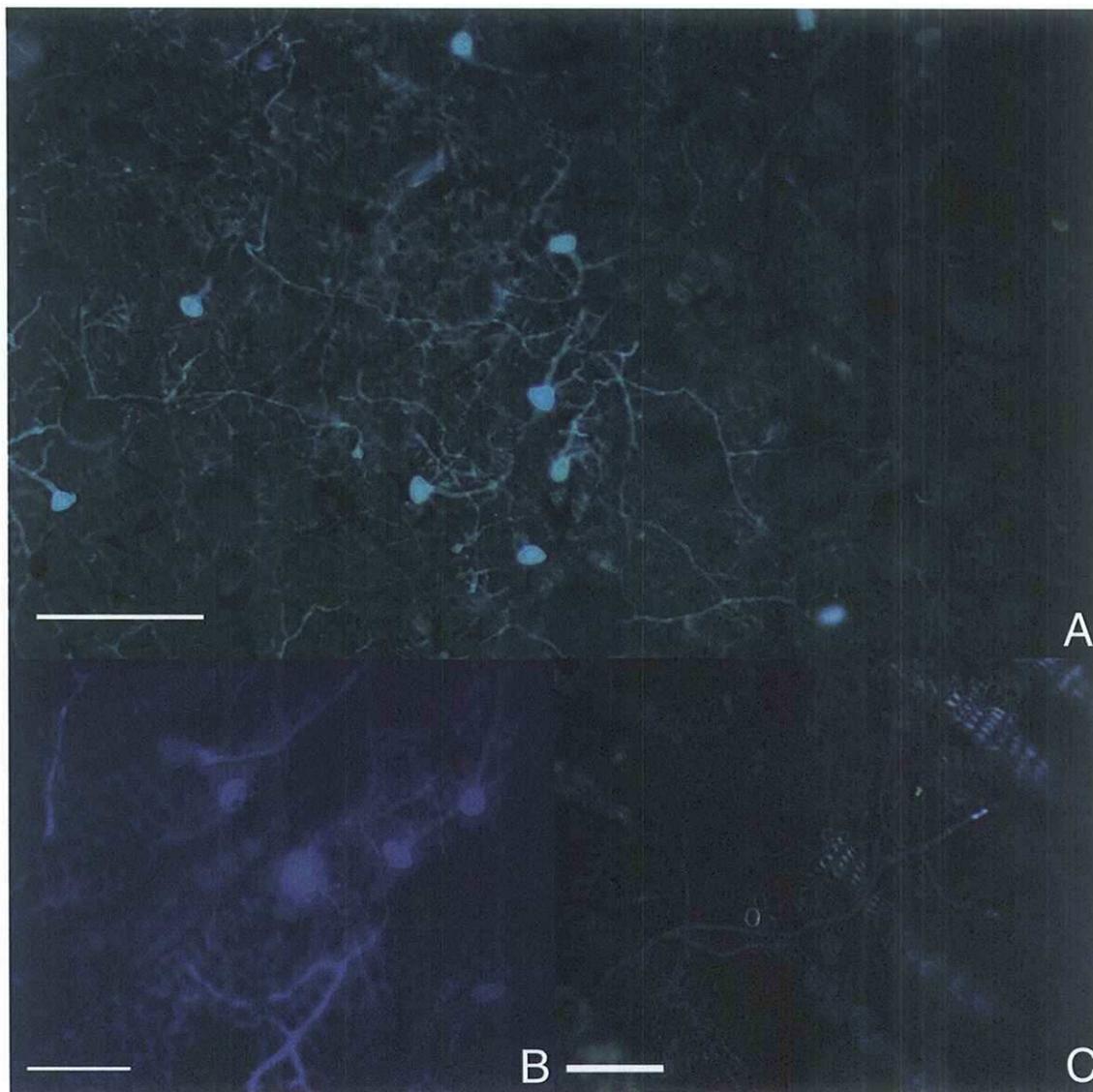


Figura 33. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa *L. theobromae* UCD256Ma a las 48 h. A, amplia colonización del tejido xilemático y producción de ramificaciones de las esporas, hifas entrando por tráqueas y traqueidas, así como contaminación por parte de partículas del aire, las esporas pigmentadas no presentaron fluorescencia. B, se observa a las hifas entrando por las tráqueas y traqueidas del tejido xilemático, presentando muchas ramificaciones. C, se observa a las hifas colonizando el tejido floemático. Barra de 50 μ m.

Figura 34. Cortes longitudinales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa *L. theobromae* UCD256Ma a las 48 h. En A y B, se observa un halo negro alrededor de la hifa, probablemente debido a la degradación de la celulosa y un amplio daño de la pared del vaso. C, ensanchamiento y degradación de las punteaduras para su uso como sitios de entrada a otras células, en este caso se observa al hongo invadiendo traqueida a partir de una tráquea. D, invasión de tejido parenquimático a partir de tráquea. Barra de 50 μ m.



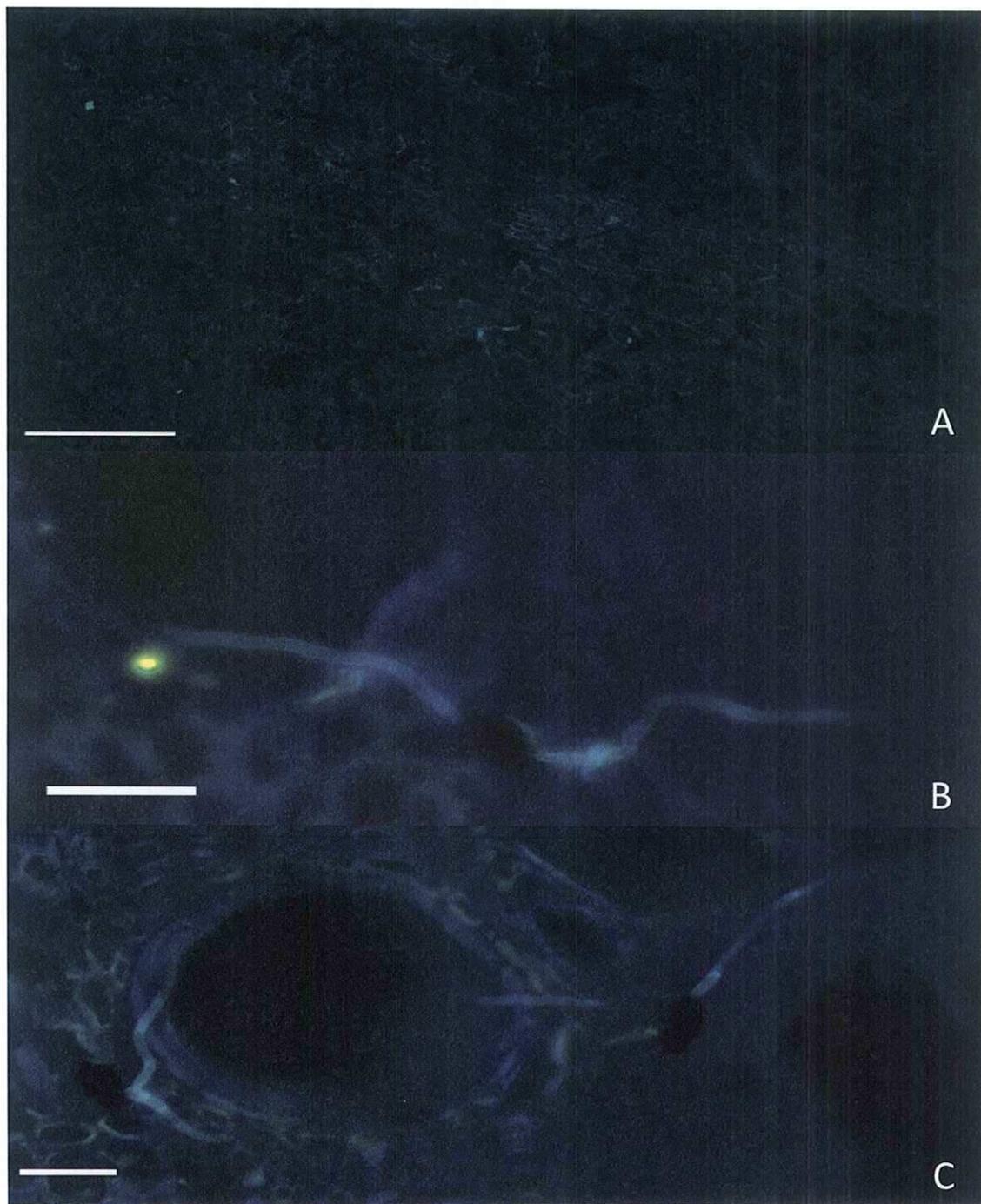


Figura 35. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa *D. seriata* BY06-3 a las 24 h. A, se observan tanto esporas germinadas como no germinadas (la mayoría) sobre el tallo de vid Barra 50 μm . En B y C, el hongo usando las tráqueas como sitio de entrada, se observaron de 2 a 3 ramificaciones producidas por cada espora. Barras de 20 μm .

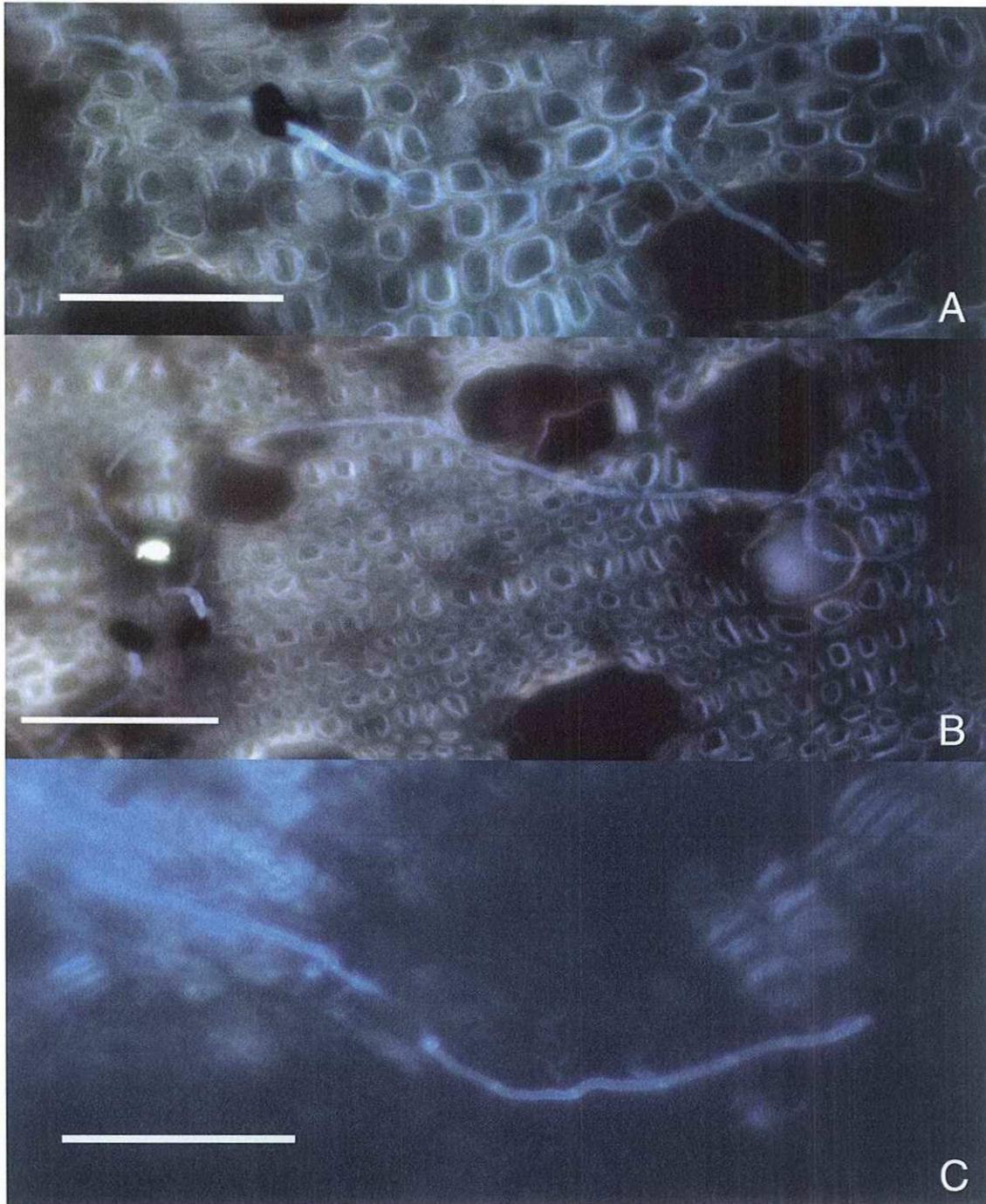


Figura 36. Cortes transversales de tronco de vid inoculados con esporas de la cepa *D. seriata* BY06-3 a las 48 h. A, espora sobre tallo de vid, se observó la hifa entrando por la tráquea. B, esporas germinadas utilizando las tráqueas y traqueidas como sitio de entrada. Cada espora produjo de 2 a 3 ramificaciones, en algunas tráqueas se observó la presencia de tilosas. C, espora germinada utilizando el floema como sitio de entrada. Barras de 50 μm .

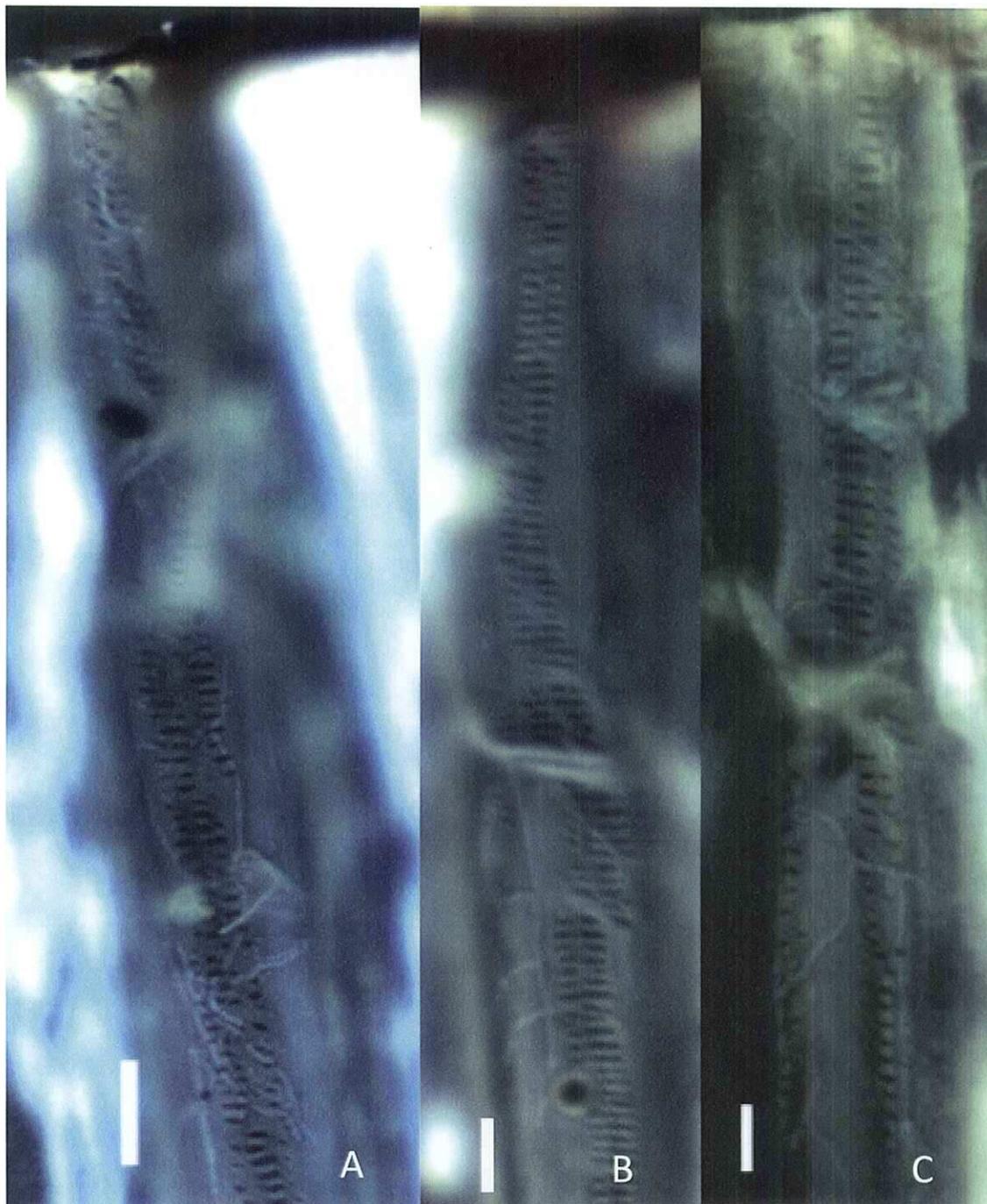


Figura 37. Cortes longitudinales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa *D. seriata* BY06-3 a las 48 h. En paneles A, B y C, se observa la colonización de la tráquea. No se observó invasión de tejidos, ni degradación de la pared celular del vaso. Barra de 50 µm.

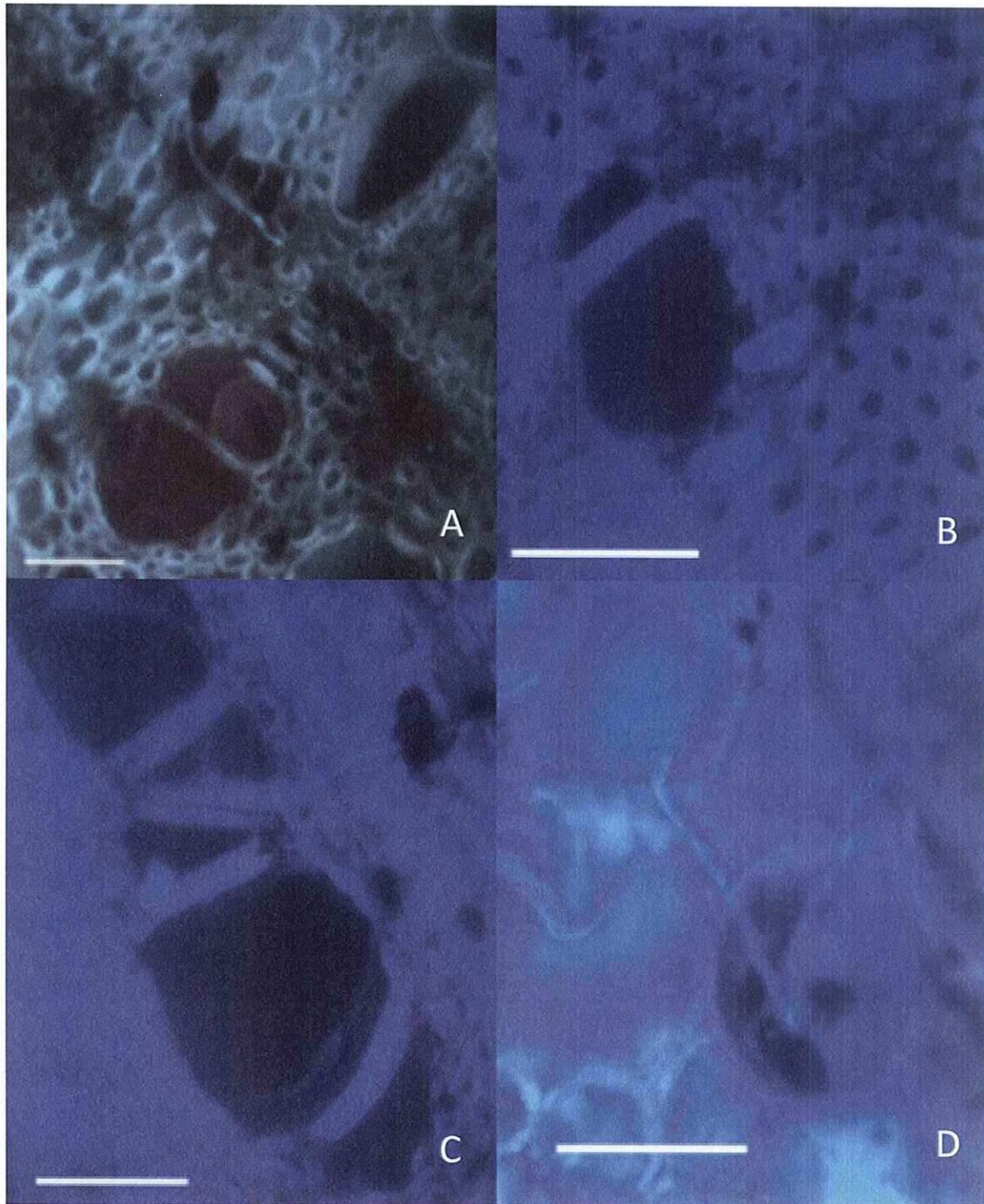


Figura 38. Cortes transversales de vid inoculados con esporas de la cepa *D. corticola* SAS112-3 a las 24 h. A, esporas germinadas sobre tallo de vid, en una de las tráqueas, en color rojo, se observa la formación de tilosas. B, se encontraron esporas no germinadas o en proceso de germinación. C, esporas germinadas utilizando las tráqueas como sitio de entrada, cada espora produjo de 2 a 3 ramificaciones. D, espora sobre tejido parenquimático medular se observa que no hubo degradación en el tejido, sólo crecimiento. Barras de 50 µm.

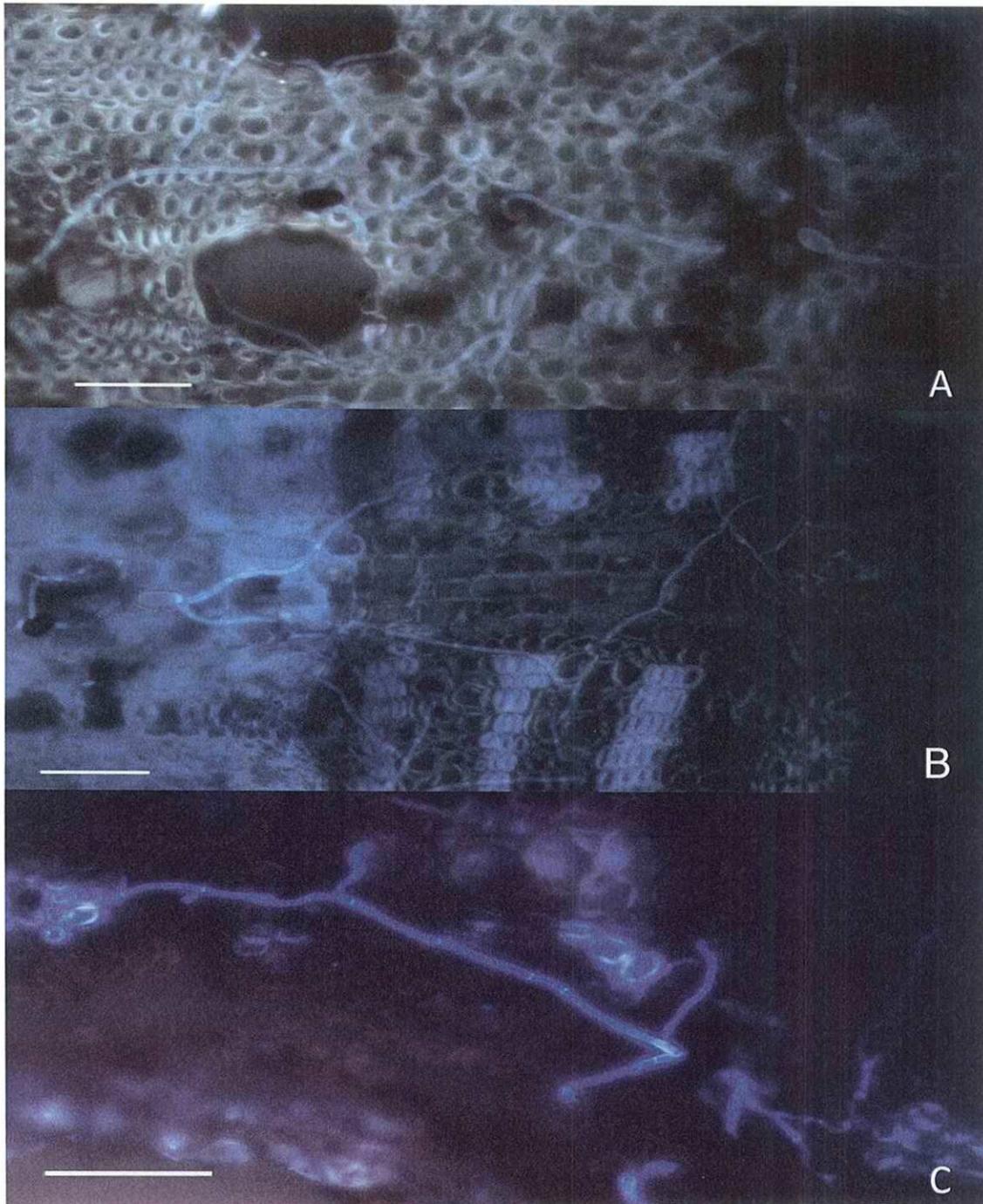


Figura 39. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa *D. corticola* SASI12-3 a las 48 h. A, esporas sobre tallo de vid, se observó colonización de tráqueas y traqueidas. B, hifas a partir de espora entrando por floema. C, esporas pigmentadas entrando por floema, se observan varias ramificaciones producidas por una espora. Barras de 50 μm .

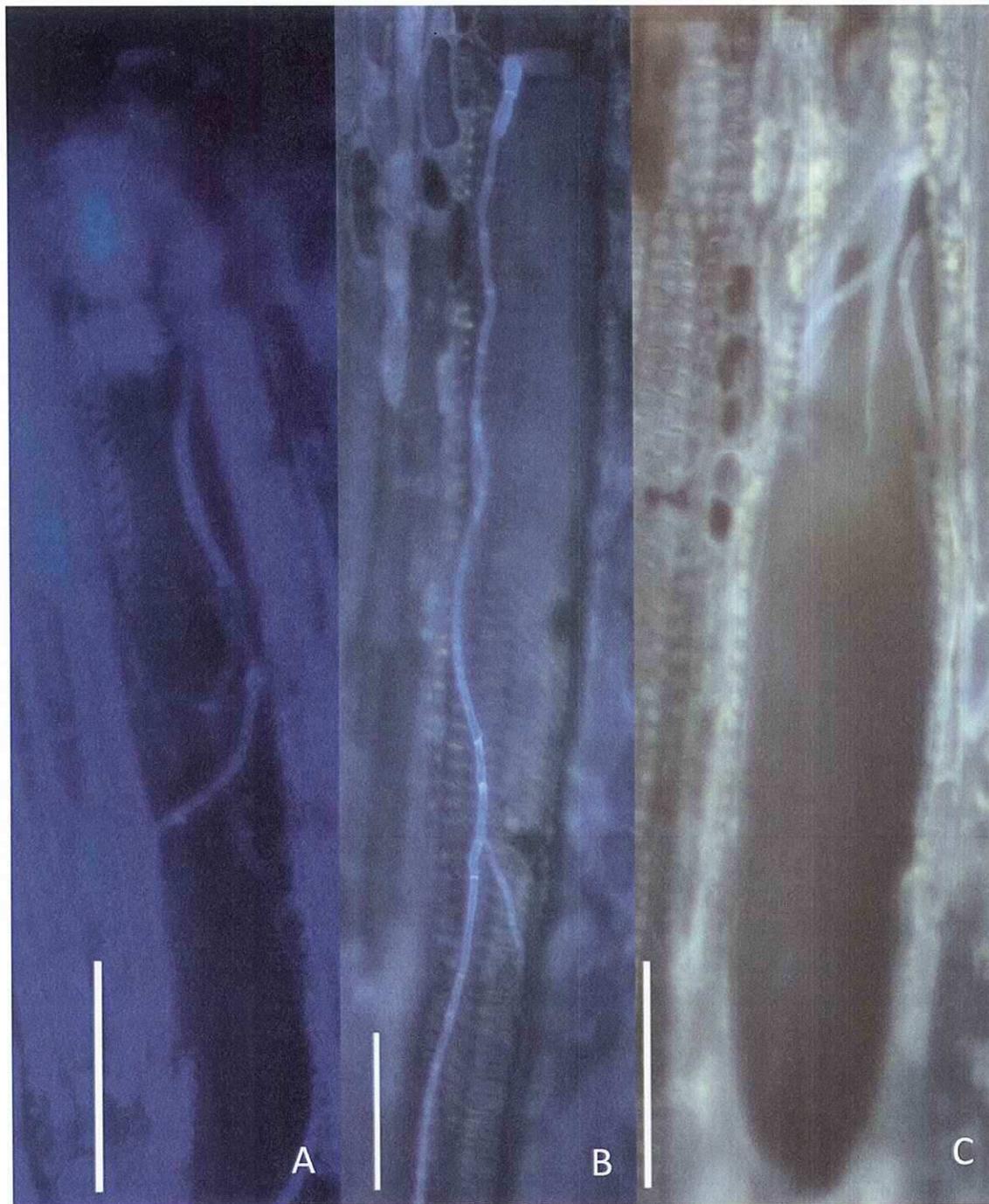


Figura 40. Cortes longitudinales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa *D. corticola* SASI12-3 a las 48 h. En A, B y C, se observó la colonización de la tráquea sin embargo no se observó invasión de tejidos, ni degradación de la pared celular del vaso. Barra de 50 μ m.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Observaciones en SEM de *L. theobromae* UCD256Ma inoculada en vid

En el análisis por SEM de las muestras a las 24 h se observó claramente la penetración de las tráqueas y traqueidas, así como el uso de las punteaduras y su degradación para ser utilizadas como medio de entrada para la colonización de las células adyacentes. También se pudo apreciar el colapso de las esporas, sin embargo no en todas. Se observó la formación de tilosas en la planta, aún con su presencia, el hongo pudo ingresar buscando otros canales de entrada. No se observó direccionalidad por parte del hongo hacia algún tejido, ya que este tendía a crecer hacia dentro y hacia afuera de los vasos del xilema y a pesar de tener cercano algún vaso no se observó desviación de las hifas hacia ellos (Figura 41).

A las 48 h se observó un crecimiento extensivo sobre el tejido, una mayor presencia de tilosas y la invasión de tráqueas y traqueidas. Aunque se observó crecimiento sobre el tejido parenquimático medular y radial no se observó desintegración o daño en el mismo (Figura 42).

Observaciones en SEM de *D. seriata* BY06-3 inoculadas en vid

En el análisis por SEM de las muestras a las 24 h se observó claramente la penetración de las tráqueas y traqueidas, pero no hubo degradación de paredes o punteaduras para la invasión de otras células. No se observó direccionalidad de las hifas hacia algún tejido, el hongo creció hacia dentro y hacia afuera de los vasos del xilema y a pesar de tener cercano algún vaso no se observó desviación de las hifas hacia ellos. Se formaron pocas ramificaciones, en algunos casos las hifas y las esporas presentaban colapso (Figura 43, paneles A y B).

A las 48 h hubo poco aumento en las ramificaciones del hongo en el tejido expuesto, sin embargo en los vasos sí se observó un aumento en las ramificaciones y una tendencia a formar hifas hacia los extremos de los vasos usando las punteaduras como sitios de anclaje y posiblemente para la colonización de las células adyacentes. Se observó la formación de tilosas por parte de la planta formando una barrera que impedía la entrada del hongo hacia el interior de los conductos xilemáticos. Aunque se observó crecimiento sobre el tejido parenquimático medular y radial no se observó desintegración o daño en el mismo (Figura 43, paneles C y D).

Observaciones en SEM de *D. corticola* SASI12-3 inoculadas en vid

En el análisis por SEM de las muestras a las 24 h se observó claramente la penetración de las tráqueas y traqueidas, sin degradación de paredes o punteaduras para la invasión de otras células. Nuevamente no se observó direccionalidad por parte del hongo, que creció hacia dentro y hacia afuera de los vasos del xilema. Se observó una amplia ramificación dentro de los vasos xilemáticos si la espora se encontraba dentro de alguno, no obstante si esta se encontraba sobre el tejido xilemáticos producía pocas ramificaciones (Figura 44, paneles A y B).

A las 48 h se observó crecimiento dentro de las tráqueas y utilizando las tráqueas como sitios de anclaje para un mayor crecimiento. Aunque se observó crecimiento sobre el tejido parenquimático medular y radial no se observó desintegración o daño en el mismo (Figura 44, paneles C y D).

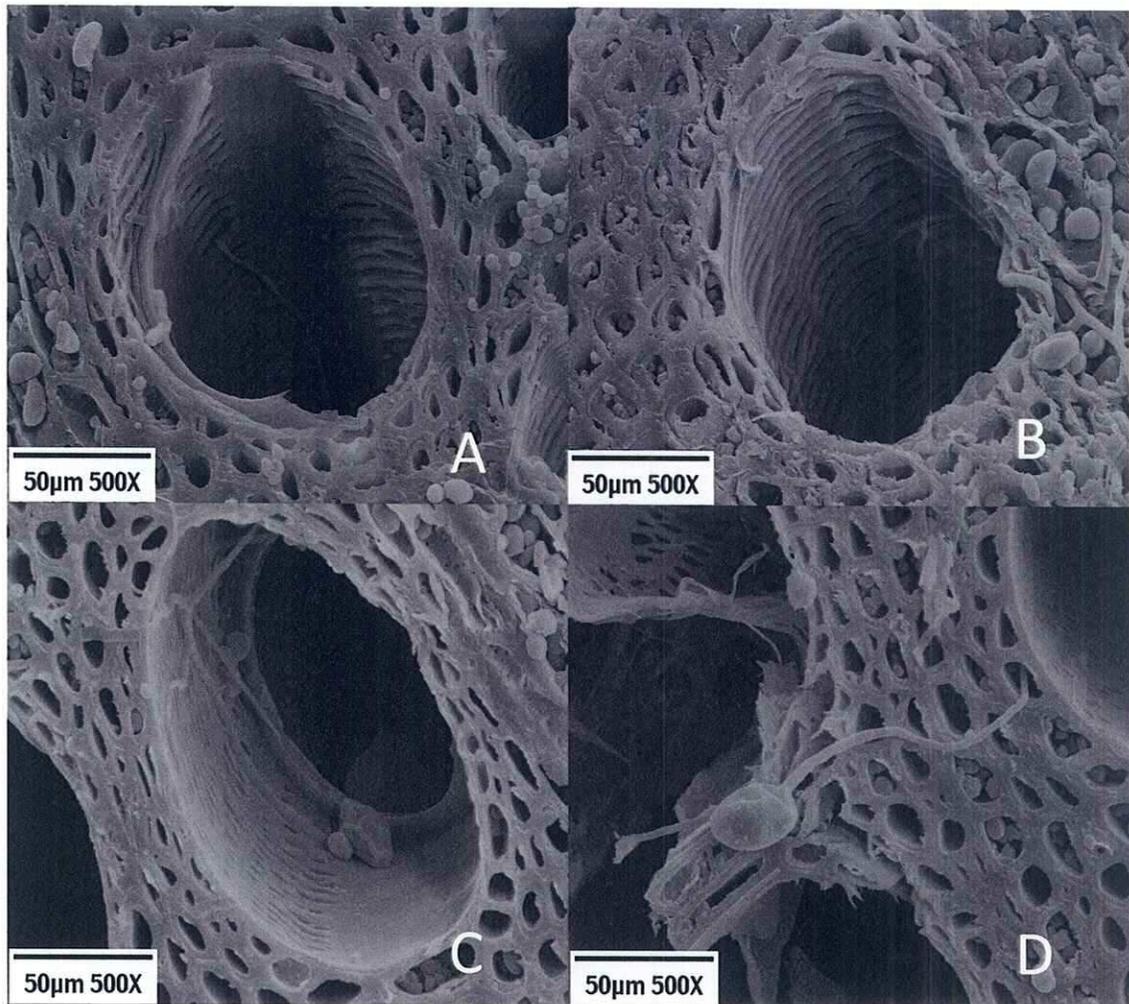


Figura 41. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma a las 24 h. A, hifa entrando por punteadura para la colonización del tejido adyacente. B, hifa entrando por punteadura, se observa degradación de la pared celular que rodea el área de la punteadura. C, espora e hifas creciendo hacia dentro y fuera de la tráquea lo que indica una falta de direccionalidad. D, hifa a partir de espora colonizando traqueidas.

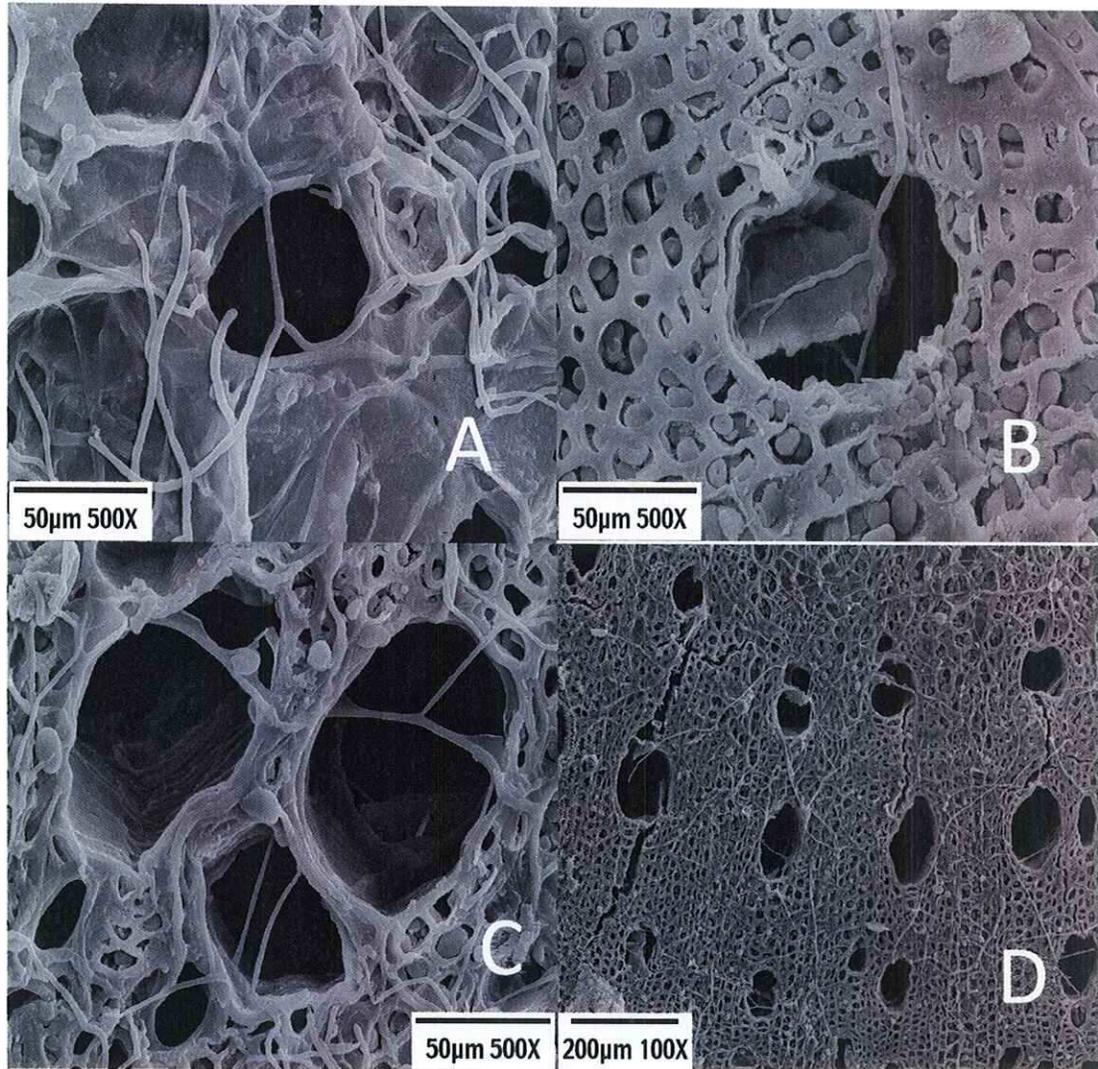


Figura 42. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma a las 48 h. A, hifas creciendo sobre parénquima medular, no se observa degradación o sitios de entrada. B, hifa entrando por tráquea con tilosa, no se observa degradación de la pared celular de la tilosa. C, hifas entrando a tráqueas. D, hifas entrando por tráqueas, se observa varias ramificaciones formadas a partir de la espora.

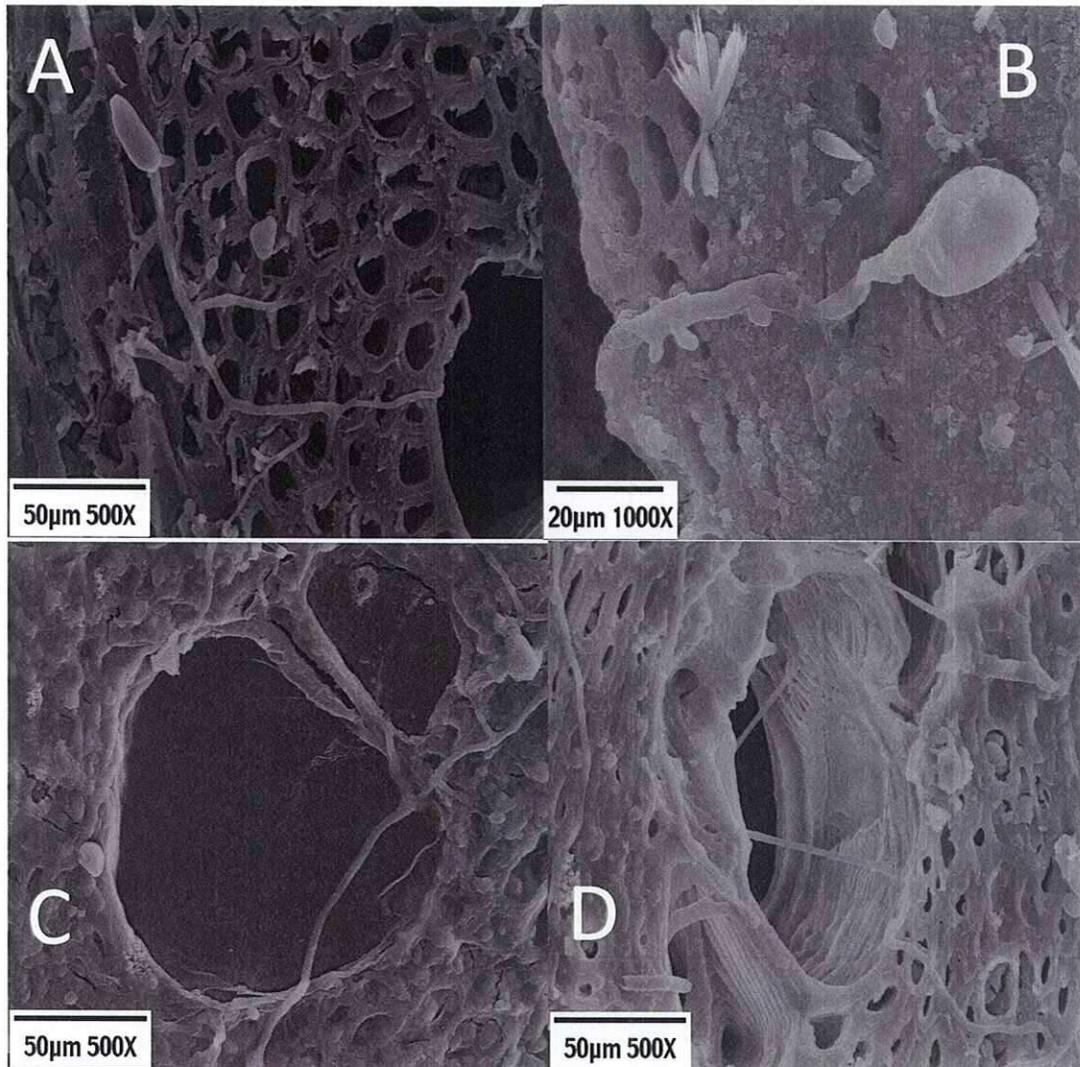


Figura 43. Cortes transversales de troncos de vid inoculados con esporas de la cepa *D. seriata* BY06-3 a las 24 h (A y B) y 48 h (C y D). En A y B, espора generando hifas las cuales entran a tráquea y traqueidas. C, entrada de hifa bloqueada por tilosa, no se observa degradación de la pared celular de la tilosa. D, hifas entrando a tráqueas, uso de punteaduras como sitios de anclaje para la colonización de las paredes de la tráquea.

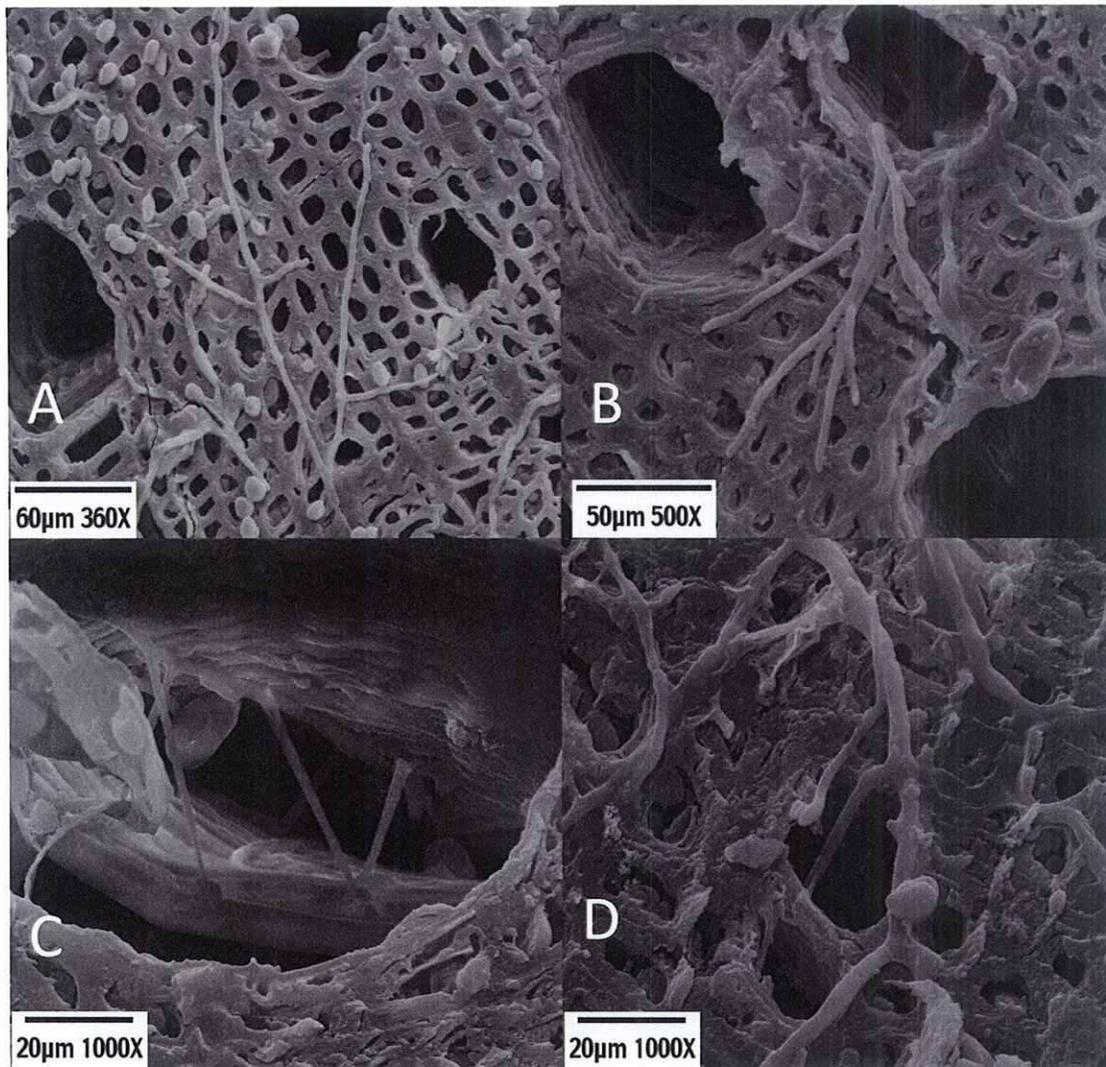


Figura 44. Cortes transversales de vid inoculados con esporas de la cepa de *D. corticola* SAS112-3 a las 24 h (A y B) y 48 h (C y D). A, hifas entrando en traqueidas. B, espora geminada entrando y produciendo hifas hacia dentro y fuera de la tráquea. C, espora dentro de tráquea colonizando el vaso y utilizando las punteaduras como sitios de anclaje sin embargo no se observa daño en la pared celular. D, hifas entrando en tráquea.

V

Discusiones

El presente trabajo es el primero en estudiar la afectación de crecimiento, el número de hifas, la biomasa y la germinación en presencia de madera en el medio de cultivo en especies de *Botryosphaeria*. Estas especies recientemente han empezado a ganar importancia como patógenos de vid (*Vitis vinifera*) alrededor del mundo, por consiguiente, el entendimiento de su biología, epidemiología, modo de infección y desarrollo nos proveerán de información importante para la implementación de métodos químicos, orgánicos y culturales para su control. Las especies de *Botriosphariaceae* tienen una tendencia a infectar por medio de esporas las heridas producidas durante la época de poda (Epstein *et al.*, 2008).

Son pocos los estudios de los parámetros físicos que afectan la germinación de las esporas, se acepta que la temperatura es uno de ellos (Úrbez-Torrez *et al.*, 2010). Se tiene reportado que el micelio de la mayoría de las especies de *Botriosphariaceae* crece a una temperatura óptima entre 27° a 28°C (Úrbez-Torres *et al.*, 2006a), mientras que para la germinación de las esporas el óptimo es entre 25° a 30°C (Úrbez-Torrez *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2005). Basados en los párrafos anteriores se aceptó 28°C como una temperatura idónea para realizar los estudios de biometría de las esporas.

Los rangos de crecimiento radial analizados en el presente estudio mostraron que de las tres cepas analizadas, *L. theobromae* UCD256Ma fue la que presentó el mayor crecimiento en ambos medios en comparación a la cepa de *D. seriata* BY06-3, que presentó un crecimiento intermedio, y *D. corticola* SAS112-3,

que tuvo un crecimiento bajo, coincidiendo con lo reportado por Úrbez-Torres *et al.* (2006). La cepa de *L. theobromae* UCD256Ma no presentó diferencias significativas en crecimiento comparando los medios con madera y sin madera, oponiéndose a lo reportado por López-Zambrano y Hernández-Martínez (2011) en donde se comparan el crecimiento en medio mínimo de Vogel con y sin madera, esto puede ser debido a que estos autores partieron de micelio, mientras que en el presente estudio se partió de esporas. Por su parte, las cepas de *D. seriata* BY06-3 y *D. corticola* SASI12-3 fueron significativamente afectadas por la presencia de madera en el medio, siendo esta última la que presentó mayor diferencia. Adicionalmente, estudios previos en *D. seriata* reportaron un mayor crecimiento y formación de picnidios en presencia de madera (Amponsah *et al.*, 2008).

Los resultados de este estudio de la afectación de la germinación, mostraron que las esporas de la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma presentaron un porcentaje de germinación mayor en el menor tiempo en el medio con madera, tanto para esporas hialinas como pigmentadas, coincidiendo con lo reportado en esta especie en estudios de síntesis de RNAm *in vitro* e *in vivo* donde se concluye que existe la síntesis de RNAm más pesados cuando se presenta tejido vegetal (Wenzler and Brambl, 1978). Las esporas pigmentadas fueron las que presentaron un mayor porcentaje de germinación, tanto en presencia como en ausencia de madera, en comparación a las esporas hialinas; esto difiere a lo reportado por Úrbez-Torres y *et al.* (2010), quienes observaron un mayor porcentaje de germinación en esporas hialinas que en pigmentadas, cabe mencionar que aunque se utilizó la misma cepa para realizar dichos estudios estas fueron inoculadas en condiciones y medios diferentes a los utilizados por Úrbez-Torres y colaboradores, lo que podría explicar la variación significativa en la germinación de las esporas. Ellos señalan que la pigmentación en estas esporas podría ser una consecuencia del envejecimiento más que de maduración de las mismas, el

presente estudio revela lo contrario, sin embargo como el mismo Úrbez-Torres menciona aún faltan muchos estudios en este campo.

La cepa de *D. seriata* BY06-3 presentó diferencias de germinación siendo hasta un 47% en comparación a la germinación en presencia de madera en el medio. Úrbez-Torres y colaboradores (2010) marcan una tasa de germinación de hasta un 80% a las 2 h de inoculación, sin embargo en el presente estudio no se observó germinación en CM o SM en dicho lapso de tiempo, lo cual pudo deberse nuevamente a las condiciones de cultivo y la presencia de madera usados aquí, además se ha reportado variación de germinación con respecto a la cepa utilizada, así como el medio de cultivo empleado para su germinación (Arauz and Sutton, 1989), por lo que la capacidad de germinación varía de cepa a cepa, no importando que hayan sido aisladas de el mismo sitio geográfico (Phillips *et al.*, 2007, Úrbez-Torres *et al.*, 2010).

La cepa de *D. corticola* SASI12-3 no presentó diferencias significativas en germinación entre esporas hialinas y pigmentadas, sin embargo, si presentó diferencias significativas de germinación entre tratamientos en madera (CM) y sin madera (SM). En CM, a las 2 h de inoculación se observó hasta un 60% de germinación mientras que en SM no se observó germinación. Los datos obtenidos en CM son similares a los reportados por Úrbez-Torres y colaboradores (2010) en PDA a 30°C.

Los resultados obtenidos aquí muestran a las esporas pigmentadas de *L. theobromae* UCD256Ma como las que presentaron un mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo en presencia de madera, seguida de *D. corticola* SASI12-3 y por último *D. seriata* BY06-3, estos resultados fueron similares a lo observado en microscopía de epifluorescencia al observar la germinación de esporas a 24 h sobre tronco de vid.

Con respecto al número de hifas producidas a partir de esporas, la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma presentó un mayor número de hifas en presencia de madera, coincidiendo con lo reportado por López-Zambrano y Hernández-Martínez (2011), quienes realizaron un estudio del índice de ramificaciones a partir de micelio en medio mínimo de Vogel con madera (MMVM) y sin madera (MMV). Las diferencias en número de hifas entre esporas hialinas y pigmentadas sugiere una diferencia en su expresión genética, en otros estudios se ha reportado a las esporas hialinas como uninucleadas y a las esporas pigmentadas como multinucleadas (Uduebo, 1975, Van Niekerk *et al.*, 2004, Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

La cepa de *D. seriata* fue la que presentó el menor número de hifas en comparación a las otras dos cepas, sin embargo, el número fue mayor cuando se encontraba presente la madera en el medio. Esto ya se ha reportado con anterioridad en otros estudios, que cuando se agregó celulosa se encontró un mayor número de hifas que en su ausencia (Cobos *et al.*, 2010). Por su parte *D. corticola* fue la más afectada por la presencia de madera en el medio produciendo diferencias altamente significativas entre ambos tratamientos.

Anteriormente se reportó una mayor producción de biomasa en MMVM que en MMV para la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma a partir de micelio (López-Zambrano and Hernández-Martínez, 2011), y se obtuvieron resultados similares a los del presente estudio, sin embargo hubo diferencias en la cantidad de biomasa obtenida en el mismo periodo de tiempo, esto pudo deberse a que la espora presenta un periodo de dormancia y vías de señalización diferentes para el inicio de la germinación que para el crecimiento (Van Etten *et al.*, 1972). En *D. seriata* se ha reportado que al agregar celulosa al medio se provoca un aumento en la generación de biomasa, en comparación a los medios sin celulosa (Cobos *et al.*, 2010), coincidiendo con los datos obtenidos. *D. corticola* presentó una mayor

biomasa en presencia de madera, sin embargo, en comparación con la otras cepas fue la que menor biomasa produjo.

En el estudio de las esporas usando microscopía confocal se observó la ausencia de lípidos en la cubierta de las esporas pigmentadas, debido a que el FM4-64 es un colorante lipofílico y no se observó fluorescencia (Bolte *et al.*, 2004). En el caso de las microscopías por calcofluor no se observó fluorescencia en las esporas pigmentadas de ninguna de las cepas, el sustrato de unión del calcofluor son la celulosa y la quitina (Galbraith, 1981, Broach *et al.*, 1997). Actualmente, no se tienen reportes en cuanto a la composición de las esporas, sin embargo, se ha observado la existencia de una capa externa que no se forma a partir del envejecimiento de la primera (Uduebo, 1975), por otro lado en microscopía electrónica de transmisión se ha observado una capa externa de material electrodenso posiblemente formado de carbohidratos (Cedeño *et al.*, 1996), lo cual explica la ausencia de fluorescencia, tanto con FM4-64 como con calcofluor.

En las microscopías de epifluorescencia se observó una clara diferencia de fluorescencia en los tejidos. En estudios de fluorescencia del floema y xilema en *Vitis vinifera* (Aloni and Peterson, 1991), señalan la falta de fluorescencia en floema secundario, cambium y esclerénquima mientras que el xilema y el floema secundario presentaron fluorescencia. La unión de calcofluor con la celulosa (Galbraith, 1981, Broach *et al.*, 1997), destaca la falta de esta molécula en los tejidos sin fluorescencia. Mientras que los tejidos donde se encontró fluorescencia coinciden con los reportes de celulosa presentada en estos tejidos, siendo de un 47% en xilema, 32 % en floema y 34 % en parenquima (Thornber J. P. and Northcote, 1961). La autofluorescencia de la lignina (360 ems / 220 exc) ha sido reportada en varios estudios (Albinsson *et al.*, 1999, Machado *et al.*, 2001), coincidiendo con la longitud de onda utilizadas en el estudio y la composición de la pared celular en *Vitis vinifera* que se ha reportado que tiene una mayor

concentración de lignina en esclerénquima y tilosas (Sun *et al.*, 2006) lo que coincide con lo observado en el presente estudio.

Por otro lado en las microscopías de epifluorescencia y electrónica ninguna de las cepas estudiadas presentó estructuras para la penetración del tejido, esto coincide con lo reportado en *B. dothidea* en manzana que no formó apresorios cuando se encontraba cercano o sobre una herida y en su crecimiento hacia la herida (Kim *et al.*, 1999), sin embargo en el presente estudio no se presentó direccionalidad hacia algún tipo de tejido de la planta, tal vez porque la inoculación se hizo directamente en heridas de provocadas.

Úrbez-Torres y colaboradores (2010) reportaron para *B. dothidea* un 90% de germinación a las 4 h en PDA a 25°C, mientras que Kim y colaboradores en 1999 para esta misma especie en manzana en un periodo de 9 h a 25°C no reportaron una germinación completa, esto coincide con comportamiento en este estudio ya que en condiciones *in vitro* en presencia de madera, en un periodo de 12 h se obtuvo entre un 80 a un 100% de germinación en las tres cepas estudiadas, mientras que en estudios *in vivo* en el mismo periodo de tiempo no se observó germinación. Se ha aceptado que el tallo es el tejido conductor y reservorio de compuestos antimicrobianos (Agrios, 2005), en *Vitis vinifera* se reporta la existencia de proteínas relacionadas a patogenicidad, fitoalexinas, y otros compuestos antifúngicos que se liberan como resultado del estrés (Ferreira *et al.*, 2006) los cuales pudieron haber influido en la germinación de las esporas en heridas de vid.

En las observaciones en microscopía de epifluorescencia y electrónica a las 24 y 48 h se observó una tendencia marcada en las tres cepas por utilizar como sitio de entrada preferente las traqueas, en segunda instancia las traqueidas y muy pocas veces el floema. El uso de las traqueas y traqueidas por *L. theobromae* como forma preferencial de invasión y colonización en plantas ha sido reportado

en pino (Cedeño *et al.*, 1996), álamo (Encinas and Daniel, 1997), anacardo (Muniz *et al.*, 2011) y árbol del caucho (Encinas and Daniel, 1997). Para *D. seriata* se observó una colonización mayor de traqueas y traqueidas, y en estados avanzados de la enfermedad se le ha observado colonizado el floema (Biggs and Britton, 1988); en el presente estudio se observó que al inicio de esta interacción el floema es también utilizado como sitio de acceso, sin embargo, no se observó la progresión de la misma en cortes longitudinales. Cabe destacar que este el primer reporte de la interacción inicial de la colonización de *Vitis vinifera* para *L. theobromae*, *D. seriata* y *D. corticola*.

Pruebas de patogenicidad en *Vitis vinifera* han mostrado a *L. theobromae* como un patógeno altamente virulento, provocando el mayor daño en tejido en comparación con otras especies de la familia *Botriosphariaceae* (Candolfi, 2009, Úrbez-Torres and Gubler, 2009), esto coincidió con las observaciones realizadas para la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma que presentó un mayor crecimiento sobre los troncos de vid en comparación con *D. corticola* SAS12-3 y *D. seriata* BY06-3, coincidiendo con lo obtenido en las pruebas biométricas.

De misma forma las observaciones a 48 h, mostraron fluorescencia en las hifas del hongo, debido a la unión del calcofluor con la quitina de la paredes celulares de las hifas (Broach *et al.*, 1997), pero los halos oscuros alrededor de las mismas denotaron la degradación de la celulosa, el sustrato de unión del calcofluor, lo que muestra que existe la producción de celulasas en las puntas de las hifas desde el inicio de la interacción hongo-planta. También se observó la degradación de la pared de los vasos xilemáticos e invasión de las células parenquimatosas. Este mismo comportamiento fue observado en la interacción de *L. theobromae* con anacardo (Muniz *et al.*, 2011) y ya se ha reportado la existencia de una alta producción de celulasas por parte de *L. theobromae* (Umezurike, 1970, Porntip *et al.*, 2010). La celulosa es la primera línea de defensa de la planta (Schafer, 1994), siendo este el componente el que se encuentra en mayor

cantidad en la pared celular del tejido xilemático (Francis W.M.R, 2007). Un hongo patógeno en plantas puede ser reconocido por la producción de un amplio rango de enzimas extracelulares capaces de degradar la pared celular (Lehtinen, 1993), las celulasas son enzimas vitales para llevar a cabo la penetración y obtención de nutrientes para el soporte del crecimiento fúngico por lo que son consideradas factores de patogenicidad (Novo *et al.*, 2006, Agrios, 2005). Por lo tanto, la producción de celulasas por *L. theobromae* al inicio de la interacción hongo-planta destaca la falta de una fase endofítica de este hongo en *Vitis vinifera*. Cabe resaltar que esto no puede ser extrapolado a otras especies de plantas sin previos estudios, ya que se ha reportado a *L. theobromae* como endófito de otras especies (Rubini *et al.*, 2005, Pandi M. *et al.*, 2011).

La microscopía de epifluorescencia y electrónica de barrido muestran a *D. seriata* en cortes longitudinales y transversales a las 24 y 48 h, en los cuales no se observó degradación del tejido, sólo crecimiento y una mayor ramificación en los vasos xilemáticos de *V. vinifera*. Cobos y colaboradores (2010), al analizar el proteoma de *D. seriata* obtuvieron un total de 75 proteínas de las cuales 12 están implicadas como factores de patogenicidad, por lo que se puede aseverar que este hongo tiene la capacidad de presentar una fase patogénica; sin embargo, no es posible compararlo con *L. theobromae* el cual presentó 93 tipos de proteínas de alto peso molecular al estar *in vivo* (Wenzler and Brambl, 1978). Esto apoya a la idea planteada por Taylor (2005) que dice que *D. seriata* tiene la capacidad de penetrar y sobrevivir en una planta como endófito o saprófito, con capacidad de convertirse en un patógeno.

En las microscopías de epifluorescencia y electrónica de barrido de *D. corticola* en cortes longitudinales y transversales a las 24 y 48 h, no se observó degradación del tejido, sólo crecimiento y ramificación dentro del xilema colocándolo más como un endófito que como un patógeno. Esto coincide con lo reportado por Candolfi en 2009 quien reporta a esta especie como la que presentó

el menor porcentaje en producción de enzimas en comparación con otras especies de *Botryosphaeria*. Por otro lado, Úrbez-Torres y colaboradores en 2009 y 2011 reportan a *D. corticola* como un agente causante de enfermedad en vid, al haber realizado pruebas de patogenicidad en vástagos de diferentes cultivares, el origen de las cepas pudo haber sido la causa de las discrepancias halladas.

La microscopía electrónica de las tres cepas corrobora el uso de tráqueas como sitio preferente para colonización de la planta. De la misma forma no se encontró degradación del tejido parenquimático, en cortes transversales; sin embargo, en el caso de *L. theobromae* a las 24 h se observó su capacidad de degradar tejido xilemático y a las 48 h la invasión y degradación del tejido parenquimático, siendo más lento el avance y degradación del mismo en comparación con el tejido xilemático. Se ha reportado un comportamiento similar para *D. seriata* en durazno donde se describe que la colonización de los vasos del xilema se presentó 7 días después de su inoculación, mientras que la colonización del tejido parenquimático se presentó después de 28 días (Biggs and Britton, 1988).

La formación de tilosas coincidió con lo reportado con Sun y colaboradores en 2006, este sistema de defensa es eficiente al proveer resistencia a la degradación por los hongos, reportándose que 6 días después de haber provocado una herida, entre el 60 y 80% de los vasos han sido bloqueados por tilosas. Sin embargo la capacidad de estos hongos de encontrar sitios de entrada independiente de tráqueas le confiere una gran habilidad para colonización de vid y está de acuerdo con lo reportado por Úrbez-Torres y Gubler (2011) quienes señalan que el tiempo de sensibilidad a infección en heridas de poda es entre los 12 y 36 días.

En microscopía electrónica se observó el uso de punteaduras como sitio de entrada a otros tejidos por la cepa de *L. theobromae* UCD256Ma y la degradación

de las mismas por las enzimas del hongo. Este mismo comportamiento fue reportado por Muniz y colaboradores (2011) en anacardo. Por otro lado, Cedeño y colaboradores en 1996 analizando la interacción de *L. theobromae* con pino, observaron que *L. theobromae* presenta dos tipos de hifas, divididas de acuerdo a su diámetro y a los depósitos tipo melanina alrededor de ellas. Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias en el diámetro o en la pigmentación de las hifas generadas, esto posiblemente se debió a que sólo se observó el estado inicial del desarrollo de *L. theobromae*. Cedeño y colaboradores también reportaron que la direccionalidad de *L. theobromae* está basada en los requerimientos nutrimentales; sin embargo, las observaciones realizadas, en el presente estudio, no muestran la existencia de una direccionalidad ya que las hifas tendían a crecer hacia dentro y fuera del tejido y no mostraban direccionalidad hacia algún tejido en particular.

VI

Conclusiones

En las tres cepas analizadas, la tasa de crecimiento fue significativamente más alta cuando había presencia de madera en el medio de cultivo. La cepa de *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma fue la que presentó los valores más altos, seguida por *Diplodia seriata* BY06-3 y *Diplodia corticola* SASI12-3.

En todas las cepas analizadas, el número de hifas a partir de espora fue mayor cuando había presencia de madera en el medio de cultivo. La cepa de *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma fue la que presentó los valores más altos, seguida por *Diplodia corticola* SASI12-3 y finalmente *Diplodia seriata* BY06-3 que presentó los valores más bajos.

El porcentaje de germinación de todas las cepas fue mayor cuando había presencia de madera en el medio de cultivo. La cepa de *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma fue la que presentó los valores más altos, seguida por *Diplodia corticola* SASI12-3 y *Diplodia seriata* BY06-3.

La biomasa fue significativamente más alta para las tres cepas, cuando había presencia de madera en el medio de cultivo. Siendo la cepa de *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma la que presentó los valores más altos, *Diplodia seriata* BY06-3 presentó valores intermedios y *Diplodia corticola* SASI12-3 presentó los valores más bajos.

Las esporas pigmentadas no se tiñeron con FM4-64 ni con calcofluor, lo que indica que no existe la presencia de lípidos o quitina en la recubierta de estas esporas.

No se encontró direccionalidad de las hifas hacia algún tejido en particular de vid, siendo el floema, las traqueidas y las tráqueas los sitios de penetración utilizados, las tráqueas fueron las más recurrentes.

Lasiodiplodia theobromae UCD256Ma aparentemente no presentó fase endófito en vid, ya que degradó la pared celular y colonizó tejido parenquimático al inicio de la interacción planta-patógeno. Por otro lado, *Diplodia seriata* BY06-3 y *Diplodia corticola* SAS112-3 presentaron una fase endófito al inicio de la interacción planta-patógeno ya que no hubo degradación de las paredes celulares.

VII

Literatura citada

Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Goltapeh, E., Zare, R. y Phillips, A. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25(1): 1-10.

Agrios; G. (2005). *Plant Pathology*. Burlington, Mass, USA, Elsevier Academic Press, 5ta Ed. 922 p.

Albinsson, B., Li, S., Lundquist, K. y Stomberg, R. (1999). The origin of lignin fluorescence. *Journal of Molecular Structure*, 508(1-3): 19-27

Aloni, R. y Peterson, C. (1991). Naturally occurring periderm tubes around secondary phloem fibers in the bark of *Vitis vinifera*. *IAWA Bulletin* 12(1): 57-61.

Amponsah, N., Jones, E., Ridgway, H. y Jaspers, M. (2008). Production of *Botryosphaeria* species conidia using grapevine green shoots. *New Zealand Plant Protection*, 61: 301-305.

Arauz, L. y Sutton, T. (1989). Influence of temperature and moisture on germination of ascospores and conidia of *Botryosphaeria obtusa*. *Phytopathology*, 79: 667-674.

Barr, M. E. (1987). *Prodromus to class Loculoascomycetes*. Amherst. Mass. USA Dept. of Botany, Univ. of Massachusetts. 1ra Ed. 168 p.

Biggs, A. y Britton, O. (1988). Presymptom histopathology of peach trees inoculated with *Botryosphaeria obtusa* and *B. dothidea*. *Phytopathology*, 78(8): 1109-1118.

Böhm, C., Dolejsi A., Dvorak A., Hieke H., Jasa B. y H., K. (1989). Enciclopedia de la jardinería. Checoslovaquia. SUSAETA. 1ra Ed. 440 p.

Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N. y Satiat-Jeunemaitre, B. (2004). FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy*, 214(2): 159-173.

Broach, J., Pringle, J. y Jones, E. (1997). *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Cell cycle and cell biology*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1ra Ed. 1131p.

Bruno, G. y Sparapano, L. (2007). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(4-6): 182-194.

Candolfi-Vasconcelos, M. y Koblet, W. (1990). Yield, fruit quality, bud fertility and starch reserves of the wood as a function of leaf removal in *Vitis vinifera* - Evidence of compensation and stress recovering. *Vitis*, 29: 199-221.

Candolfi, O. (2009). Caracterización de anamorfos de *Botryosphaeriaceae* asociados a deterioro progresivo en vid (*Vitis vinifera* L.) aislados de la región vitivinícola de Baja California. México: Tesis de Maestría, CICESE. 98 p.

Castillo-Pando, M., Somers, A., Green, C. D., Priest, M., y Sriskanthades, M. (2001). Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. *Australasian Plant Pathology*, 30: 59-63.

Cedeño, L., Sari, M. y Palacios-Prü, E. (1996). Ultrastructure of *Lasiodiplodia theobromae* causal agent of caribbean pine blue stain in Venezuela. *Interciencia* 21: 264–265.

CMV. (2011). Consejo Mexicano Vitivinícola, Disponible en: <http://www.uvayvino.org/>, (Acceso Agosto del 2011).

Cobos, R., Barreiro, C., Mateos, R. y Coque, J. (2010). Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. *Proteome Science*, 8: 1-16.

Denman, S., Crous, P., Taylor, J., Kang, J., Pascoe, I. y Wingfield, M. (2000). An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45: 129-140.

Díez-Navajas, M., Greif, C., Poutaraud, A. y Merdinoglu, D. (2007). Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycetes *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues. *Francia: ScienceDirect*, 38: 680-683.

Dubos, B. (2002). *Maladies cryptogámiques de la vigne*. Éditions Féret. 1ra Ed. 207 p.

Dubos, B., Cere, L., Larignon, P. y Fulchic, R. (2001). Observations on black dead arm in french vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: S336-S342.

Encinas, O. (1996). Development and significance of attack by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. y Maubl. in Caribbean pine wood and some other wood species. Swedish University of Agricultural Sciences. 1ra Ed. 135 p.

Encinas, O. y Geoffrey, D. (1997). Degradation of the gelatinous layer in aspen and rubberwood by the blue stain fungus *Lasiodiplodia theobromae*. IAWA Journal, 18: 107–115.

Epstein, L., Kaur, S. y VanderGheynst, J. S. (2008). *Botryosphaeria*-related dieback and control investigated in noncoastal California grapevines. California Agriculture, 62(4): 161-166.

FAO. (2007). FAOSTAT. Disponible en: <http://faostat.fao.org>, (Acceso Junio del 2010).

Ferreira, R., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C., Chen, Z., Batista, L. Duarte, J., Borges, A. y Teixeira, A. (2006). Fungal Pathogens: The Battle for Plant Infection. Critical Reviews in Plant Sciences, 25(6): 505-524.

Flemmer, A., Anderson, F., Hansen, P. y McLaren, D. (2010). Microscopic observations of a compatible host/pathogen interaction between a potential biocontrol agent (*Uromyces pencanus*) and its target weed (*Nassella neesiana*). Mycoscience, 51(5): 396-400.

Florence, E. J. M., Gnanaharan, R., Singh, P. y Sharma, J. K. (2002). Weight Loss and Cell Wall Degradation in Rubberwood Caused by Sapstain Fungus *Botryodiplodia theobromae*. Holzforschung, 56(3): 225-228.

Flores-Vindas, E. (1999). La Planta. Estructura y función. Vol. 1. San José, Costa Rica. Libro Universitario Regional (LUR). 367 p.

Schwarze Francis. (2007). Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*, 21(4): 133-170.

Galbraith, D. W. (1981). Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by plant protoplasts using Calcofluor White. *Physiologia Plantarum*, 53(2): 111-116.

García, F., Torres-Güell, E., Camprubi, A., Estaún-Morell, V., Calvet, C., Martos, S. y Luque, J. (2005). Enfermedades de madera de la vid en Cataluña. *Viticultura enología profesional*, 99: 19-28.

Giménez-Jaime, A., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J. y Armengol, J. (2006). Occurrence of Fungal Pathogens Associated with Grapevine Nurseries and the Decline of Young Vines in Spain. *Journal of Phytopathology*, 154(10): 598-602.

Gola, G., Negri, G. y Cappelletti, C. (1965). *Tratado de botánica*. Barcelona. España. LABOR. 3ra Ed. 1957 p.

Goodman, R., Kiraly Z. y Wood, K. (1986). *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. Columbia, Missouri, USA. University of Missouri Press. 1ra Ed. 433 p.

Gubler, W., Rolshausen, P., Trovillase, F., Úrbez- Torres, J. y Voegel, T. (2005). Grapevine trunk diseases in California. *Practical Winery Vineyard*. January/February. 6-25 p.

Halleen, F., Fourie, P. y Crous, P. (2006). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: S55-S67.

Hidalgo, L. (2002). *Tratado de Viticultura General*. Madrid, España. Mundi-Prensa. 3ra Ed. 1241 p.

Hong-Ye, L., Rou-Bin, C. y Yong-Tan, M. (1995). In vitro inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop Protection*, 14(3): 187-191.

INEGI. (2011). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México. Disponible en: www.inegi.gob.mx (Acceso Agosto del 2011).

Izco, J., Barreno, E., Brugués, M., Costa, M., Devesa, A., Fernández, F., Gallardo, T., Izco, J., Limona, X., Prada, C., Talavera, S. y Valdés, B. (2004). *Botánica*. Madrid, España. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA. 2da Ed. 906 p.

Keller, M. (2010). *The Science of Grapevines*. Washington, USA. Elsevier. 1ra Ed. 377 p.

Khanzada, M., Lodhi, A. y Shahzad, S. (2004). Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango. *Pakistan Journal of Botany*, 36: 181-189.

Kim, K., Kim, K. y Park, E. (2005). An Infection Model of Apple White Rot Based on Conidial Germination and Appressorium Formation of *Botryosphaeria dothidea*. Korea: *The Plant Pathology Journal*. 21: 322-327.

Kim, K., Park, E. y Ahn, K. (1999). Pre-Penetration Behavior of *Botryosphaeria dothidea* on Apple Fruits). Korea: *The Plant Pathology Journal*. 15: 223-227.

Kleist, G. y Seehann, G. (1997). Colonization patterns and topochemical aspects of sap streak caused by *Stereum sanguinolentum* in Norway spruce. *European Journal of Forest Pathology*, 27(6): 351-361.

Lakshmanan, P. y Jagadeesan, R. (2004). Malformation and cracking of nuts in coconut palms (*Cocos nucifera*) due to the interaction of the eriophyid mite *Aceria guerreronis* and *Botryodiplodia theobromae* in Tamil Nadu, India. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111(2): 206-207.

Lehtinen, U. (1993). Plant cell wall degrading enzymes of *Septoria nodorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43(2): 121-134.

López-Zambrano, L., y Hernández-Martínez, R. (2011). Comportamiento de *Lasiodiplodia theobromae*, un hongo asociado al cancro por *botriosferia*, en presencia de madera de vid. XIV Congreso de Ciencias Agrícolas, Mexicali, México.

Machado, A., Nicodem, D., Ruggiero, R., Perez, S. y Castellan, A. (2001). The use of fluorescent probes in the characterization of lignin: the distribution, by energy, of fluorophores in *Eucalyptus grandis* lignin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 138(3): 253-259.

Michailides, T. (1991). Pathogenicity, Distribution, Sources of inoculum, and infection Courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. Department of Plant Pathology, University of California. California, USA. *Phytopathology*, 81: 566-573.

Mills, L., Ferguson John y Keller, M. (2006). Cold-hardiness evaluation of grapevine buds and cane tissues. *Am. J. Enol. Vitic*, 57: 194-200.

Mohali, S., Burgess, T. y Wingfield, M. (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology*, 35(6): 385-396.

Mugnai, L., Graniti, A. y Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant disease*, 83(5): 404-418.

Mundy, D. y Manning, M. (2010). Ecology and management of grapevine trunk diseases in New Zealand: a review. *New Zealand Plant Protection*, 63: 160-166.

Muniz, R., Freire, F., Viana, F., Cardoso, E., Cooke, P., Wood, D. y Guedes, M. (2011). Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: Microscopical features. *Micron*, 42(5): 419-428.

Novo, M., Pomar, F., Gayoso, C. y Merino, F. (2006). Cellulase activity in isolates of *Verticillium dahliae* differing in aggressiveness. *Plant disease*, 90(2): 155-160.

Pandi M., Kumaran, S., Choi, Y., Kim, J. y Muthumary, J. (2011). Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*. *African Journal of Biotechnology*, 10(8): 1428-1435.

Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Alvarez, M., Fraile, B., Anadón, R. y Sáez, J. (2002). *Citología e histología vegetal y animal*. Madrid, España. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA. 3ra Ed. 1002 p.

Paoletti, E., Anselmi, N. y Franceschini, A. (2007). Pre-exposure to ozone predisposes oak leaves to attacks by *Diplodia corticola* and *Biscogniauxia mediterranea*. *The Scientific World JOURNAL*, 7: 222-230.

Pearson, R. y Goheen, A. (1988). Compendium of grape diseases. St. Paul, Nuevo México, USA. APS Press. 3ra Ed. 121 p.

Pérez-Marín, J. (2001). Como reconocer y controlar las enfermedades del viñedo. Vida rural, 121: 33-37.

Péros, J. y Berger, G. (1994). A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to *Eutypa dieback*. Agronomie, 14(8): 515-523.

Petzoldt C., Moller, W. y Sall, M. (1981). *Eutypa dieback* of grapevine: seasonal differences in infection and duration of susceptibility of pruning wounds. Phytopathology, 71(5): 540-543.

Phillips, A. (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. Phytopathologia Mediterranea, 41: 3-18.

Phillips, A., Crous, P. y Alves, A. (2007). *Diplodia seriata*, the anamorph of "*Botryosphaeria*" *obtusa*. Fungal Diversity, 25: 141-155.

Phillips, A. J. L. (1998). *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. Journal of Phytopathology, 146(7): 327-332.

Porntip, T., Douglas, D., Tanachai, P. y Koslanund, R. (2010). Hexanal vapours suppress spore germination, mycelial growth, and fungal-derived cell wall degrading enzymes of postharvest pathogens of longan fruit. Chiang Mai J. Sci., 38(1): 139-150.

Rego, C., Farropas, L., Nascimento, T., Cabral, A. y Oliveira, H. (2006). Black foot of grapevine: sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: S93-S100.

Reynier, A. (2005). *Manual de viticultura*. Madrid, España. Mundi-Prensa. 6ta Ed. 497 p.

Rolshausen, P., Urbez-Torres, J., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R., y Gubler, W. (2010). Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *Am. J. Enol. Vitic.*, 61(1): 113-119.

Roux, J., Wingfield, M., Byabashaija, M. y Wingfield, M. (2001). Diseases of plantation eucalyptus in Uganda. *South African Journal of Science*, 97: 16-18.

Rubini, M., Silva-Ribeiro, R., Pomella, A., Maki, S., Araújo, L., Santos D. y Azevedo, J. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease. *Int J Biol Sci*, 1: 24-33.

Ruel, K. y Joseleau, J. (1987). Role of H₂O₂ in the degradation of wood polysaccharides by fungi. *Food Hydrocolloids*, 1(5-6): 515-517.

Salazar, D. y Melgarejo, P. (2005). *Viticultura*. Madrid, España. AMV y Mundi-Prensa. 1ra Ed. 325 p.

Schafer, W. (1994). Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annual Review of Phytopathology*, 32(1): 461-477.

Scheck, H., Vasquez, S., Fogle, D. y Gubler, D. (1998). Grape growers report losses to black-foot and grapevine declin. *California Agriculture*, 52(4): 19-23.

Schnee, S., Viret, O. y Gindro, K. (2008). Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72: 128-133.

Schwarze, F., Engels, J. y Mattheck, C. (2000). *Fungal strategies of wood decay in trees*. Freiburg, Alemania. Springer. 1ra Ed. 185 p.

Slippers, B. y Wingfield, M. (2007). *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21: 90-106

Smith, H., Kemp, G. H. J., y Wingfield, M. J. (1994). canker and die-back of eucalyptus in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Pathology*, 43(6): 1031-1034.

Sperry, J., Holbrook, M., Zimmermann, M., y Tyree, M. (1987). Spring filling of xilem vessels in wild grapevine. *Plant Physiology*, 83: 414-417.

SPV. (2010). *Sistema Producto Vid*. Disponible en: <http://vidyvino.org>: (Acceso Junio 2010).

Summerbell, R., Kraiden, S., Levine, R. y Fuksa, M. (2004). Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. *Medical mycology*, 42(6): 543-547.

Sun, Q., Rost T. y Matthews, M. (2006). Pruning- induced tylose development in stems of current-year shoots of *Vitis vinifera* (Vitaceae). *American Journal of Botany*, 93: 1567-1576.

Surico, G., Mugnai, L. y Marchi, G. (2006). Older and more recent observations on Esca: a critical review. *Phytopatologia Mediterranea*, 45: 68-86.

Surico, G., Mugnai, L., y Marchi, G. (2008). The Esca disease complex integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria. Springer Netherlands. 3: 119-136.

Taylor, A., Hardy, G., Wood, P., y Burgess, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 34(2): 187-195.

Thornber J. y Northcote, D. (1961). Changes in the chemical composition of a cambial cell during its differentiation into xylem and phloem tissue in trees. *Biochem Journal*, 81(3): 449–455.

Uduebo, A. E. (1975). Fine structural studies on the pycnidiospores of *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Annals of Botany*, 39(3): 605-610.

Umezurike, G. M. (1970). Cellulase and β -Glucosidase Components in Culture Filtrates from *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Journal of Experimental Botany*, 21(3): 639-650.

Úrbez-Torres, J., Leavitt, G., Voegel, T. y Gubler, W. (2006a). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California *Plant Disease*. 90(12): 1490–1503.

Úrbez-Torres, J., Battany, M., Bettiga, L., Gispert, C., McGourty, G., Roncoroni, J., Smith, R., Verdegaal, P; y Gubler, W. D. (2010a). *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant disease*, 94(6): 717-724.

- Úrbez-Torres, J., y Gubler, W. (2009). Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevine cankers in California. *Plant disease*, 93(6): 584-592.
- Úrbez-Torres, J., y Gubler, W. (2011). Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology*, 60(2): 261-270.
- Úrbez-Torres, J., Gubler, W., Peláez, H., Santiago, Y., Martín, C. y Moreno, C. (2006b). Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea*, and *B. parva* Associated with Grapevine Trunk Diseases in Castilla y León Region, Spain. *Plant disease*, 90(6): 835-835.
- Úrbez-Torres, J., Leavitt, G., Guerrero, J., Guevara, J., y Gubler, W. (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant disease*, 92(4): 519-529.
- Úrbez-torres, J., Peduto, F., Rooney-Latham, S. y Gubler, W. (2010b). First report of *Diplodia corticola* causing grapevine (*Vitis vinifera*) cankers and trunk cankers and dieback of canyon live oak (*Quercus chrysolepis*) in California. *Plant disease*, 94(6): 785-785.
- Úrbez-Torres, J., Bruez, E., Hurtado, J., y Gubler, W. D. (2010). Effect of temperature on conidial germination of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Plant Disease*, 94(12): 1476-1484.
- Valtaud, C., Larignon, P., Roblin, G., y Fleurat-Lessard, P. (2009). Developmental and ultrastructural features of *Phaeomoniella chlamydospora* and
-

Phaeoacremonium aleophilum in relation to xylem degradation in esca disease of grapevine. *Journal of Plant Pathology*, 91(1): 37-51.

Van Etten, L., Roker, H. y Davies, E. (1972). Protein synthesis during fungal spore germination: differential protein synthesis during germination of *Botryodiplodia theobromae* spores. *Journal Bacteriol*, 112(2): 1029-1031.

Van Niekerk, J., Crous, P., Groenewald, Z., Fourie, P. y Halleen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96(4): 781-798.

Van Niekerk, J., Fourie, P., Hallenn, F. y Crous, P. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45: 43-54.

Weaver, R. (1988). Cultivo de la uva. Distrito Federal, México. CONTINENTAL. 3ra Ed. 420 p.

Wenzler, H. y Brambl, R. (1978). *In vitro* translation of polyadenylate-containing RNAs from dormant and germinating spores of the fungus *Botryodiplodia theobromae*. *Journal Bacteriol*, 135(1): 1-9.

Whiteman, S., Stewart, A., Ridgway, H. y Jaspers, M (2007). Infection of rootstock mother-vines by *Phaeomoniella chlamydospora* results in infected young grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 36(2): 198-203.

Wingfield, M., Crous, P., y Coutinho, T. (1996). A serious canker disease of eucaliptus in South Africa caused by a new species of *Coniothyrium*. *South Africa: Mycopathologia*, 136: 139-145.

Woo, P., Lau, P., Ngan, Y., Tse, H., Tung, K., y Yuen, K. (2008). *Lasiodiplodia theobromae* pneumonia in a liver transplant recipient. J. Clin. Microbiol., 46(1): 380-384.

Wright, A. y Harmon, P. (2009). First report of *Lasiodiplodia theobromae* associated with stem blight of southern highbush blueberries in florida. Plant disease, 93(9): 962-962.

Anexo I

TINCIONES

Safranina al 0.1%.

Safranina..... 0.1 g

Alcohol al 95%..... 100 ml

Mezclar todo en un frasco y agitar hasta que homogenice. Mantener en un lugar fresco.

Azul de metileno

Azul de metileno.....5ml

Alcohol etílico al 96%.....20ml

Mezclar todo en un frasco y agitar hasta que homogenice. Mantener en un lugar fresco.

Fast Green

Fast green..... 0.5 gr

Alcohol etílico al 95%..... 50 ml

Aceite de clavo..... 50 ml

Mezclar todo en un frasco y agitar hasta que homogenice. Mantener en un lugar fresco.

Azul de alcian

Acido acético 100%.....15ml

Agua destilada.....485ml

Azul de alcian.....5 gr

Mezclar todo en un frasco y agitar hasta que homogenice. Mantener en un lugar fresco.

Calcofluor White stain (fluka)

KOH 10%..... 0.5 ml

Calcofluor..... 0.5 ml

Mezclar en un tubo eppendorf con pipeta hasta que la coloración cambie a morado. Mantener en un lugar fresco.

Calcofluor White stain (fluka)

KOH 15%..... 100 ml
Calcofluor..... 0.1 gr

Mezclar en un frasco estéril y mantener en agitación por 1 hr, posteriormente pasar por un filtro de 0.5 μ m para quitar impurezas. Mantener en un lugar fresco.

ANTI-BACTERIAL**Cloranfenicol 10 mg/ml**

Cloranfenicol..... 2 gr
Etanol 96%..... 200 ml
Filtro 0.2 μ m

Disolver el cloranfenicol en el etanol. Esterilizar por medio de filtración a través de un filtro de 0.2 μ m. Poner en frasco estéril y mantener a 4 °C.

Tetraciclina

Tetraciclina..... 2.5 gr
Etanol 70%..... 100 ml
Filtro 0.2 μ m

Disolver el cloranfenicol en el etanol. Esterilizar por medio de filtración a través de un filtro de 0.2 μ m. Poner en frasco estéril ambar o cubrir con aluminio y mantener a 4°C .

FIJADORES**FAA**

Formaldehído al 37%.....5ml
Ácido acético glacial.....5ml
Alcohol etílico al 50%.....90ml

Mezclar todo en un frasco y agitar hasta que homogenice. Mantener en un lugar fresco.

Reactivo de karnovsky

a) Solución stock:

Paraformaldehido.....	2 gr.
Hidróxido de sodio 1M.....	2 a 4 gotas
Glutaraldehido 50%.....	5 ml
Buffer de cacodilato 0.2 M (pH7.4).....	20 ml

Mezclar el paraformaldehido con 25 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y calentar a 60°C hasta que empiece a soltar vapor. Agregar el hidróxido de sodio y agitar hasta que la solución se aclare. Enfriar la solución y filtrar. Agregar el glutaraldehido y el buffer 0.2 M. el rango de pH deberá estar de 7.2 a 7.4.

b) Buffer de cacodilato de sodio:

Cacodilato de sodio.....	4.28 gr. (0.1M) o 8.56 (0.2M)
Cloruro de calcio.....	25 gr.
Ácido clorhídrico 0.2 N.....	2.5 ml
Agua destilada.....	200 ml

Mezclar todo lo anterior y ajustar el pH a 7.4 con HCL.

c) Solución de trabajo:

Diluir la solución stock 1:4 (500 mOsm) y 1:2 (700 mOsm) en buffer de cacodilato al 0.1M, poner en frascos, etiquetar y fechar. Mantener en refrigeración.

Nota: altamente toxico y cancerígeno.

BUFFERS

Hidróxido de potasio al 10% y 15%

A un matraz aforado de 100 ml agregar 10 o 15 gr de KOH y aforar con agua destilada.

Buffer de Fosfatos 0.2M pH 7.2

a) Solución A

NaH₂PO₄.....31.2 gr.
 Agua destilada.....1000ml

b) Solución B

Na₂HPO₄.....53.61 gr.
 Agua destilada.....1000ml

c) Mezcla para la obtención de Buffer

Solución A.....62.5%
 Solución B.....37.5%

Nota: para ajustar del pH use NaOH y H₂PO₄

MEDIOS DE CULTIVO

Agar-agua

Agar..... 10 grs
 Agua destilada..... 500 ml
 Mezclar en un frasco PYREX de 1000 ml y colocar en autoclave a 120°C y 15 atm de presión por 20 min para esterilizar.

Medio mínimo de Vogel

Sales de Vogels 50 X (2%) 10 ml
 Agar..... 10 gr
 Sacarosa..... 10 gr
 Agua destilada..... 500 ml
 Mezclar en un frasco PYREX de 1000 ml y coloque en autoclave a 120 °C y 15 atm de presión por 20 min para esterilizar.

Medio mínimo de Vogels Madera

Sales de Vogels 50 X (2%)..... 10 ml
 Agar..... 10 gr
 Sacarosa..... 10 gr
 Madera molida..... 5 gr
 Agua destilada..... 500 ml

Corte pequeños pedazos de madera y colóquelos en una licuadora, para molerlos. Tamice el molido por luz de malla 1.6 mm. Mezcle con los otros ingredientes en frasco PYREX de 1000 ml y coloque en autoclave a 120 °C y 15 atm de presión por 20 min para esterilizar.

Sales de Vogel 50X

Citrato de sodio.....	15 gr
Fosfato de potasio monobásico.....	25 gr
Nitrato de amonio.....	10 gr
Sulfato de magnesio anhídrido.....	1 gr
Cloruro de calcio anhídrido.....	0.5 gr
Elementos traza.....	500 µl
Biotina (0.1 mg/ml).....	250 µl
Cloroformo.....	200 µl

Mezclar todo en un frasco de 250 ml, mantener en agitación por un periodo de 12 h.

Elementos traza para sales de Vogel

Ácido cítrico monohidratado.....	5 gr
Sulfato de zinc heptahidratado.....	5 gr
Sulfato de amonio ferroso sextahidratado.....	1 gr
Sulfato de cobre monohidratado.....	0.25 gr
Sulfato de manganeso monohidratado.....	0.05 gr
Ácido trioxobórico anhídrido.....	0.05 gr
Molipdato de sodio dihidratado.....	0.05gr
Cloroformo.....	1 ml
Agua destilada.....	100 ml

Mezclar todo en un frasco de 250 ml, mantener en agitación por un periodo de 12 h.