

Tesis defendida por
Nancy Nieblas Núñez
y aprobada por el siguiente comité

Rufina Hernández Martínez
Director del Comité

César Valenzuela Solano
Miembro del Comité

Manuel Alberto Segovia Quintero
Miembro del Comité

Rodrigo Vargas Ramos
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador del Programa de Posgrado en
Ciencias de la Vida

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

24 de Octubre de 2012.

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



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología**

**Evaluación del potencial de *Trichoderma* sp. y *Glomus intraradices* para controlar a
Lasiodiplodia theobromae, uno de los agentes causales de la muerte regresiva por
Botriosferia en vid (*Vitis vinifera* L.)**

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en ciencias

Presenta:

Nancy Nieblas Núñez

Ensenada, Baja California, México
2012.

Resumen de la tesis de Nancy Nieblas Núñez, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Evaluación del potencial de *Trichoderma* spp. y *Glomus intraradices* para controlar a *Lasiodiplodia theobromae*, uno de los agentes causales de la muerte regresiva por Botriosferia en vid (*Vitis vinifera* L.)

Resumen aprobado por:

Rufina Hernández Martínez

El cultivo de vid en Baja California, es económicamente muy importante, ya que aquí se produce aproximadamente el 90% del vino nacional. Una de las enfermedades que genera grandes pérdidas en la vitivinicultura, es la muerte regresiva causada por hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Dentro de las especies de esta familia, *L. theobromae* es considerada la más virulenta. El uso de micorrizas arbusculares y de aislados nativos de *Trichoderma* podría ser efectivo para el control de la muerte regresiva en vid, por lo que, el objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes estrategias para el control del hongo *L. theobromae*. En ensayos de competencia dual, se evaluó el efecto *in vitro* de ocho aislados nativos de Baja California de *Trichoderma* spp. sobre tres aislados de *L. theobromae*, encontrándose un efecto antagónico similar hacia el patógeno por las ocho trichodermas evaluadas. Posteriormente, al analizarse las características morfológicas y las secuencias del factor de elongación 1 α , se identificaron siete *Trichoderma* de las especies: *T. atroviride* (L508), *T. asperellum* (T. TORO), *T. gamsii* (T5 y T6) y *T. harzianum* (T3, I6 y T. TWINS). También se evaluó *in vitro* la sensibilidad a fungicidas de cinco *Trichoderma* spp., los resultados mostraron que el tiofanato de metilo y el benomilo tienen potencial para ser combinados con estos antagonistas en el control de *L. theobromae*. Por último, se analizó en plantas de vid del cultivar Cabernet Sauvignon, el efecto del aislado *T. gamsii* T6, de *G. intraradices* y de su combinación sobre *L. theobromae*, observándose un posible sinergismo entre los dos agentes de control biológico. El tratamiento que mostró la menor incidencia del patógeno fue la combinación *T. gamsii* T6 y *G. intraradices*, aunque *T. gamsii* T6 por si sola mostró tendencia de control sobre *L. theobromae*. Por lo que se concluye que *T. gamsii* T6 y su combinación con *G. intraradices*, tienen potencial para ser utilizadas en el control biológico de *L. theobromae*.

Palabras Clave: **micorrizas, biocontrol, enfermedades fúngicas de la madera.**

Abstract of the thesis presented by Nancy Nieblas Núñez as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology.

Assessing the potential of *Trichoderma* spp. and *Glomus intraradices* to control *Lasiodiplodia theobromae*, one of the causal agents of Botryosphaeria dieback in grapevine (*Vitis vinifera* L.)

Abstract approved by:

Rufina Hernández Martínez

Baja California grapevines are a very economically important commodity, since this state produces approximately 90% of the Mexican wine. One of the diseases that generates large losses in viticulture, is Botryosphaeria dieback caused by fungi from the Botryosphaeriaceae family. Among the species of this family, *L. theobromae* is considered the most virulent. The use of arbuscular mycorrhizas and native isolates of *Trichoderma*, could be effective to control Botryosphaeria dieback on grapevine. The aim of this study was to evaluate different strategies to control the fungus *L. theobromae*. First, using dual competition assays, eight native *Trichoderma* spp. were evaluated against three isolates of *L. theobromae*, results showed similar antagonistic effects towards the pathogen displayed for the eight isolates of *Trichoderma* spp. Subsequently, through the analysis of their morphological characteristics and the sequences of the EF1 α , seven *Trichoderma* isolates were identified as members of the species: *T. atroviride* (L508), *T. asperellum* (T. TORO), *T. gamsii* (T5 and T6) and *T. harzianum* (T3, I6 and T. TWINS). Additionally, the *in vitro* sensibility to fungicides of five *Trichoderma* strains was evaluated; the results showed that methyl thiophanate and benomyl have potential to be used in combination with these antagonists for the control of *L. theobromae*. Finally, the effect of *T. gamsii* T6, *G. intraradices* and their combination was analyzed on grapevine cv. Cabernet Sauvignon infected with *L. theobromae*, a possible synergism between the two biological control agents was observed. The treatment inoculated with the combination of *T. gamsii* T6-*G. intraradices* exhibited the lowest incidence of the pathogen, although, *T. gamsii* T6 alone showed some control. In conclusion, the *T. gamsii* T6 and its combination with *G. intraradices*, have potential to be used for the biological control of *L. theobromae*.

Keywords: mycorrhizas, biocontrol, trunk diseases fungi.

Dedicatorias

Para Fernando

Para Gaby, Diego y David

Para Elisa

Agradecimientos

Al apoyo de mi familia, amigos, compañeros de trabajo; con los cuales, la realización de esta tesis fue posible.

A mis sinodales: Dr. Manuel Segovia, Dr. César Valenzuela y Dr. Rodrigo Vargas.

A mi directora Dra. Rufina Hernández.

Al CICESE por brindarme el apoyo académico y equipo técnico necesario para realización de los experimentos de este trabajo de tesis.

Al Conacyt por el apoyo económico que me brindó a través de la beca y a través de proyecto de Ciencia Básica No. 104356.

Tabla de contenido

	Página
Resumen.....	2
Abstract.....	3
Dedicatorias.....	4
Agradecimientos.....	5
Lista de figuras.....	9
Lista de tablas.....	12
1. Introducción.....	13
2. Antecedentes.....	15
2.1. Importancia del cultivo vid.....	15
2.2. Enfermedades de la vid.....	15
2.2.1. Enfermedades fúngicas de la madera de vid.....	16
2.3. Muerte regresiva de vid por <i>Botryosphaeria</i> spp.....	17
2.3.1. Muerte regresiva de vid por <i>Botryosphaeria</i> spp. en México.....	20
2.4. <i>Botryosphaeria</i> spp.....	20
2.5. Control de la muerte regresiva de vid por <i>Botryosphaeria</i>	22
2.5.1. Control químico.....	22
2.5.1.1. Benomilo.....	23
2.5.1.2. Tiofanato de metilo.....	24
2.5.1.3. Ácido bórico.....	25
2.5.2. Control biológico.....	26
2.6. <i>Trichoderma</i> spp.....	27
2.6.1. Identificación de <i>Trichoderma</i> spp.....	28
2.6.2. Mecanismos de biocontrol de <i>Trichoderma</i> spp.....	28
2.6.2.1. Competencia.....	29
2.6.2.2. Antibiosis y micoparasitismo.....	29
2.6.2.3. Estimulación del sistema de defensa de la planta.....	29
2.6.2.4. Estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal.....	30
2.6.2.5. Otros mecanismos.....	30
2.6.3. Control biológico de <i>Botryosphaeria</i> spp.....	31
2.6.4. Control con <i>Trichoderma</i> spp. y fungicidas.....	32
2.7. Micorrizas arbusculares.....	33
2.7.1. Mecanismos de biocontrol de MA.....	34
2.7.1.1. Competencia.....	34
2.7.1.2. Estimulación del sistema de defensa de la planta.....	34
2.7.1.3. Estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal.....	35
2.7.2. Uso de micorrizas arbusculares en el control de <i>Botryosphaeria</i> spp.....	35
2.8. Control con <i>Trichoderma</i> spp. y MA.....	36
2.9. Justificación.....	36
2.10. Objetivos.....	37
2.10.1. General.....	37
2.10.2. Particulares.....	37
2.11. Hipótesis.....	38

	Página
3. Metodología	39
3.1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto inhibitorio de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>L. theobromae</i>	39
3.2. Análisis microscópico de las interacciones de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>L. theobromae</i>	41
3.3. Caracterización morfológica de <i>Trichoderma</i> spp.	41
3.4. Identificación molecular de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	42
3.4.1. Extracción de ADN de las cepas de <i>Trichoderma</i> para su identificación molecular	42
3.4.2. Amplificación de una porción del gen <i>tefl</i> de las cepas de <i>Trichoderma</i>	43
3.4.3. Purificación y secuenciación	43
3.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la sensibilidad a fungicidas de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>L. theobromae</i>	44
3.6. Obtención de la micorriza arbuscular.....	45
3.7. Ensayos en plantas.....	45
3.7.1. Tratamientos y diseño experimental.....	45
3.7.2. Inoculación de plantas de vid con <i>G. intraradices</i>	48
3.7.3. Inoculación de plantas de vid con <i>Trichoderma</i> sp.	48
3.7.4. Inoculación de plantas de vid con el patógeno	49
3.7.5. Mantenimiento de las plantas	49
3.7.6. Evaluación de los tratamientos	50
3.7.6.1. Medición del flujo de CO ₂ del sustrato.....	50
3.7.6.2. Incidencia de <i>Trichoderma</i> T6 y de <i>L. theobromae</i>	51
3.7.6.3. Determinación del peso seco de las plantas	52
3.7.6.4. Porcentaje de micorrización	52
3.7.6.5. Análisis de suelo.....	53
3.8. Análisis estadísticos	54
4. Resultados	56
4.1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto inhibitorio de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>L. theobromae</i>	56
4.2. Microscopía de las interacciones de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>L. theobromae</i>	59
4.3. Caracterización morfológica de <i>Trichoderma</i> spp.	59
4.4. Identificación molecular de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	63
4.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la sensibilidad a fungicidas de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>L. theobromae</i>	65
4.6. Ensayo en plantas	67
4.6.1. Incidencia de <i>Trichoderma</i> sp.	67
4.6.2. Porcentaje de micorrización	68
4.6.3. Incidencia del patógeno.....	69
4.6.4. Peso seco del tallo y raíces	71
4.6.5. Evaluación del flujo de CO ₂ , temperatura y humedad del sustrato.....	72
4.6.6. Evaluación de la temperatura ambiental	75
4.6.7. Análisis de suelo.....	75
4.6.8. Correlación lineal entre las variables	81

	Página
5. Discusión.....	84
6. Conclusiones	94
Referencias bibliográficas.....	97
Anexos	113

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Conidias pigmentadas y hialinas de <i>L. theobromae</i> . Barra= 10 μ m.....	22
Figura 2. Determinación de la distancia mayor (r1) y la distancia menor (r2) alcanzada por el patógeno en un cultivo dual con <i>Trichoderma</i> sp.	40
Figura 3. Diseño experimental en dos bloques aleatorizados usado para evaluar el efecto de <i>G. intraradices</i> y <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>L. theobromae</i> en vid.	46
Figura 4. Tubo de PVC instalado en las plantas, que sirvió como base para la cámara del sistema utilizado para medir el CO ₂ del suelo.	47
Figura 5. Cámara del equipo para medir el flujo de CO ₂ del sustrato de las plantas (LI-8100A Soil CO ₂ Flux System, LI-COR Lincoln, NE, USA), sobre el tubo de PVC previamente instalado en una maceta.	51
Figura 6. Ensayo de competencia entre <i>Trichoderma</i> sp. T6 y <i>L. theobromae</i> UCD256 Ma	57
Figura 7. Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del porcentaje de inhibición por cada cepa de <i>Trichoderma</i> spp. sobre las tres cepas del patógeno..	57
Figura 8. Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del efecto cepa de <i>Trichoderma</i> sobre el porcentaje de inhibición ejercido por las ocho cepas de <i>Trichoderma</i> en las tres cepas del patógeno.	58
Figura 9. Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del efecto del factor cepa del patógeno sobre el porcentaje de inhibición ejercido por las ocho cepas de <i>Trichoderma</i> en las tres cepas del patógeno..	58
Figura 10. Interacciones microscópicas entre <i>Trichoderma</i> spp. y <i>L. theobromae</i> . A) Lisis de una hifa de <i>L. theobromae</i> cocultivada con <i>Trichoderma</i> T3.	59
Figura 11. Características microscópicas observadas en las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	61
Figura 12. Características morfológicas de aislados de <i>Trichoderma</i> spp.	62
Figura 13. Árbol filogenético consenso del análisis de una porción del gen <i>tefl</i> de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. analizadas en el presente trabajo (en negritas) y de cepas registradas en el banco de secuencias de NCBI.	64
Figura 14 Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. y de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma por cada concentración de ácido bórico.	65
Figura 15. Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. y de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma por cada concentración de tiofanato de metilo.	66
Figura 16. Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. y de <i>L. theobromae</i> UCD256Ma por cada concentración de benomilo.	67
Figura 17. Comparación entre medias de la incidencia de <i>Trichoderma</i> sp. entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher.	68
Figura 18. Comparación entre medias del porcentaje de micorrización entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher.	69

Página

Figura 19. Estructuras micorrícicas observadas en las raíces de las plantas inoculadas con <i>G. intraradices</i>	69
Figura 20. Comparación entre medias de la incidencia del patógeno entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher.....	70
Figura 21. Comparación de la incidencia del patógeno, sólo evaluando los tratamientos con patógeno, con n=4, utilizando la prueba a posteriori de Fisher..	71
Figura 22. Comparación entre medias del peso seco de la raíz entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher.....	72
Figura 23. Comparación entre medias de la la temperatura del sustrato. entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher.	73
Figura 24. Comparación entre medias del flujo de CO ₂ del sustrato. entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher.....	73
Figura 25. Comparación entre medias del flujo de CO ₂ del sustrato en plantas micorrizadas (M) y no micorrizadas (SM) con <i>G. intraradices</i> , utilizando la prueba <i>t</i> -Student. La temperatura fue normalizada a 25°C.....	74
Figura 26. Comparación entre medias del flujo de CO ₂ del sustrato en plantas inoculadas (T) y sin inocular (ST) con <i>T. gamsii</i> cepa T6, utilizando la prueba <i>t</i> -Student. Las barras indican la desviación estándar. Los datos de temperatura fueron normalizados a 25°C..	74
Figura 27 Comparación entre medias del flujo de CO ₂ del sustrato en plantas con patógeno (P) y sin él (SP), utilizando la prueba <i>t</i> -Student. Las barras indican la desviación estándar. Los datos de temperatura fueron normalizados a 25°C.....	74
Figura 28. Comparación entre medias del contenido de fósforo en el sustrato entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher..	75
Figura 29. Comparación entre medias del contenido de fósforo en el sustrato de plantas micorrizadas (M) y no micorrizadas (SM) con <i>G. intraradices</i> , utilizando la prueba <i>t</i> -Student..	76
Figura 30. Comparación entre medias del contenido de fósforo en el sustrato de plantas con el patógeno (P) y sin el mismo (SP), utilizando la prueba <i>t</i> -Student. Las barras indican la desviación estándar..	76
Figura 31. Comparación entre medias del contenido de zinc en el sustrato entre 8 tratamiento en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher.....	77
Figura 32. Comparación entre medias del contenido de zinc en el sustrato de plantas micorrizadas (M) y no micorrizadas (SM) con <i>G. intraradices</i> , utilizando la prueba <i>t</i> -Student..	78
Figura 33. Comparación entre medias del contenido de zinc en el sustrato de plantas con el patógeno (P) y sin el mismo (SP), utilizando la prueba <i>t</i> -Student..	78
Figura 34. Comparación entre medias de la conductividad electrica del sustrato entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher..	79
Figura 35. Comparación entre medias de la coductividad eléctrica del suelo de plantas micorrizadas (M) y no micorrizadas (SM) con <i>G. intraradices</i> , utilizando la prueba <i>t</i> -Student..	79

Página

Figura 36. Comparación entre medias del pH del sustrato entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher.	80
Figura 37. Comparación entre medias del pH del sustrato en plantas micorrizadas (M) y no micorrizadas (SM) con <i>G. intraradices</i> , utilizando la prueba <i>t</i> -Student.	81
Figura 38. Correlación entre la incidencia de <i>Trichoderma</i> sp. y el flujo de CO ₂ del sustrato, de los tratamientos inoculados éste antagonista ($p < 0.05$).	82
Figura 39. Correlación entre la incidencia del patógeno y la de <i>Trichoderma</i> sp., de los tratamientos inoculados con <i>L. theobromae</i> ($p < 0.05$).	83

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Especies de la familia Botryosphaeriaceae aisladas de vid en diferentes países. Modificada de Úrbez-Torres (2011).	18
Tabla 2. Tratamientos del ensayo en planta utilizados para evaluar el efecto de <i>G. intraradices</i> y <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>L. theobromae</i> en vid, y el número asignado a cada uno.	46
Tabla 3. Características químicas del sustrato utilizado para las plantas de vid.	47
Tabla 4. Composición de la mezcla fertilizante aplicada a las plantas de vid, basada en la solución de Hoagland (Hoagland y Arnon 1938), cuyo contenido de fósforo fue reducido al 25%.	50
Tabla 5. Matriz de correlación ^a entre las variables medidas en los tratamientos en planta.	81

1. Introducción

La vid es uno de los frutales más importantes en el mundo (Creasy y Creasy, 2009). En Baja California, México, su cultivo es de gran trascendencia, debido a que en este Estado se produce aproximadamente el 90% del vino nacional (Sistema Producto Vid, 2009). Ensenada, es el municipio donde se localiza alrededor del 90% del área cultivable de vid de Baja California (Sepúlveda-Betancourt, 2009).

Las enfermedades fúngicas de la madera de vid causan grandes pérdidas en la vitivinicultura (Gubler et al., 2005). Dentro de estos padecimientos, se encuentra la muerte regresiva ocasionada por especies de la familia Botryosphaeriaceae (Úrbez-Torres, 2011). En California, Estados Unidos, se ha visto que *Lasiodiplodia theobromae* es la especie más virulenta de esta familia (Úrbez-Torres y Gubler, 2009). Al igual que todas las enfermedades fúngicas de la madera, la muerte regresiva por *Botryosphaeria* spp. no es curable. Hasta el día de hoy ningún método de control es totalmente efectivo para eliminar el problema (Úrbez-Torres, 2011), por lo que se recurre a medidas preventivas, las cuales se basan generalmente en prácticas culturales, el saneamiento del viñedo y en la aplicación de fungicidas (Úrbez-Torres, 2011).

Dentro de los fungicidas que han demostrado ser efectivos en el control de especies de la familia Botryosphaeriaceae, se encuentran: el benomilo (Leavitt, 1990; Bester et al., 2007), el tiofanato de metilo y el ácido bórico (Rolshausen et al., 2010). Estos compuestos químicos tienen la desventaja de ser poco persistentes en la planta, lo que hace necesaria su aplicación periódica, situación que incrementa los costos de producción del cultivo. Además, debido a sus impactos negativos sobre el medio ambiente y la salud de los seres humanos, recientemente, ha comenzado a desarrollarse una tendencia cada vez más creciente a reducir el uso de fungicidas y a optar por métodos de control más amigables con el medio ambiente como los llamados biocontroladores. Los biocontroladores son microorganismos antagonistas de fitopatógenos y por ende se utilizan en el manejo de enfermedades de plantas (Pal y McSpadden-Gardener, 2006).

Trichoderma spp., son hongos antagonistas de fitopatógenos que han mostrado resultados favorables en el control biológico de la muerte regresiva de vid por *Botryosphaeria* spp. (Fourie y Halleen, 2006; Halleen et al., 2010; Mutawila et al., 2011; Kotze et al., 2011). El uso de cepas de *Trichoderma* spp. nativas de la misma zona donde ocurren los hongos patógenos, ha tenido mayor efecto biocontrolador sobre los mismos, en comparación a la utilización de cepas comerciales foráneas (Plata-Caudillo, 2010; Kotze et al., 2011). Por otro lado, el uso *combinado* de estos antagonistas y fungicidas en el control de fitopatógenos, ha tenido mejores resultados que la aplicación del agente químico y el biológico por separado (Cole y Zvenyika, 1988; Elad y Zimand, 1993; Malathi et al., 2002).

El uso de micorrizas arbusculares también ha mostrado efectividad en el biocontrol de especies de la familia Botryosphaeriaceae, pero en hospederos diferentes a la vid (Ming et al., 2000; Krishna et al., 2010). Además, en algunos estudios, se ha visto un efecto sinérgico cuando se combinan estos simbiosistas con *Trichoderma* spp. en el control de fitopatógenos (Martínez-Medina et al., 2011; Mwangi et al., 2011).

En el presente trabajo, primeramente se evaluó *in vitro* el efecto antagonista de ocho cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre tres cepas de *L. theobromae*, con el objetivo de encontrar cepas con potencial para usarse en su control biológico. Posteriormente, se caracterizaron morfológica y genéticamente, a nivel de especie, las cepas de *Trichoderma* utilizadas y se evaluó su sensibilidad a fungicidas, con el propósito encontrar cepas con potencial para usarse en combinación con agentes químicos para el control de *L. theobromae*. Por último, se hizo un ensayo en planta para determinar el efecto combinado y separado de una cepa de *Trichoderma* y una micorriza arbuscular sobre *L. theobromae* en vid.

2. Antecedentes

2.1. Importancia del cultivo vid

El cultivo de la vid (*Vitis vinífera* L.) es muy antiguo, se practica desde hace más de 7,000 años. Sus orígenes fueron en Europa y Asia Central, en la región del Mar Negro y el Mar Caspio, de donde se expandió al resto del mundo. En el continente americano la vid fue introducida por los colonos españoles (Hidalgo, 2002). Su fruto, la uva, se consume directamente en forma fresca, como conserva en forma de pasas, o se utiliza para la elaboración de jugos, vinagre y aceite, pero uno de los principales usos es la elaboración de vino, una bebida milenaria conocida mundialmente (Hidalgo, 2002).

La viticultura es una de las mayores industrias frutícolas en el mundo (Creasy y Creasy, 2009). La superficie mundial del cultivo de la vid es de 7,585 millones de ha, con una producción total aproximada de 69'170,000 t (OVI, 2012). En Baja California, la producción de uva para vino es muy importante, debido a que este Estado genera aproximadamente el 90% de los vinos nacionales. El mercado bajacaliforniano vinícola cuenta con vinos de calidad internacional y se encuentra en constante crecimiento (Sistema Producto Vid, 2009). La actividad vitícola en el Estado ocupa una superficie de 3,326 ha, repartidas en 148 productores pertenecientes a los municipios de Tijuana, Mexicali y Ensenada. El municipio de Ensenada contribuye con el 91.4% de la superficie del cultivo. En este municipio, el Valle de Guadalupe tiene el 56% del área cultivable municipal y el 51% del área estatal. El 80% de la producción estatal se utiliza para la producción de vino y el 18.3% para uva de mesa y pasas (Sepúlveda-Betancourt, 2009).

2.2. Enfermedades de la vid

Como cualquier cultivo intensivo, el de la vid, puede ser afectado por una gran variedad de enfermedades causadas por factores abióticos o bióticos. Los factores abióticos pueden ser exceso o deficiencia de la temperatura, la humedad, la luz, los nutrientes, etc. Dentro de los

factores bióticos se encuentran los virus, las bacterias, los hongos, los nematodos, los insectos; entre otros. Los patógenos fúngicos causan las enfermedades más agresivas y difíciles de controlar (Agrios, 2005)

2.2.1. Enfermedades fúngicas de la madera de vid

Las enfermedades causadas por hongos que afectan a la madera de vid ocasionan grandes pérdidas económicas alrededor del mundo (Gubler et al., 2005). Los agentes causales de estas enfermedades entran a la planta principalmente por las heridas de poda o aberturas naturales, a través de las cuales invaden el sistema vascular (Leavitt, 1990; Halleen et al., 2003; Gubler et al., 2005; Epstein et al., 2008; Serra et al., 2008). Los daños ocasionados en las plantas por estos patógenos son consecuencia de la obstrucción de los vasos xilemáticos y de la producción de toxinas (Pascoe, 1998). Los síntomas característicos son la muerte de brazos, brotes o cordones, la formación de canchales y eventualmente la muerte de la planta (Gubler et al., 2005). Se ha visto que las heridas de poda son susceptibles a la infección hasta cuatro meses después de que ésta se realiza (Serra et al., 2008), y que se vuelven menos vulnerables con el aumento de la temperatura (Úrbez-Torres y Gubler, 2011).

Las enfermedades fúngicas de la madera de vid son principalmente: la enfermedad de Petri, relacionada con diferentes especies del género *Phaeoacremonium* y la especie *Phaeomoniella chlamydospora* (Larignon y Dubos, 1997); la yesca, asociada con los hongos basidiomicetos: *Fomitiporia mediterranea* Fischer y *Stereum hirsutum* (Willd.:Fr.) S.F. Gray, y con los ascomicetos *Phaeoacremonium* spp. y *P. chlamydospora* (Mugnai et al., 1999); la eutipiosis, producida por el ascomiceto *Eutypa lata* (Pers.:Fr.) Tul. & Tul (Rolshausen et al., 2006); el pie negro, asociada con las especies del género *Cylindrocarpon*, principalmente *C. destructans* (Zins) y otras especies del género *Campylocarpon* (Halleen et al., 2007); y la muerte regresiva ocasionada por diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae (Úrbez-Torres, 2011).

La muerte regresiva de vid asociada a especies de la familia Botryosphaeriaceae es punto central de este trabajo, por lo cual a continuación se presentan los antecedentes principales de esta enfermedad.

2.3. Muerte regresiva de vid por *Botryosphaeria* spp.

Los síntomas de la muerte regresiva por *Botryosphaeria* spp. son principalmente: necrosis o cancro sectorial, rayas oscuras en la madera, síntomas foliares y la inhibición de los brotes. Estos síntomas son muy similares a los ocasionados por otros patógenos como *E. lata*, *Phomopsis viticola*, *P. chlamidospora* y *P. aleophilum*, por lo que anteriormente, la muerte regresiva por *Botryosphaeria* se confundía con otros padecimientos y no era considerada como una enfermedad relevante (Úrbez-Torres, 2011). No fue sino hasta la década pasada cuando las especies de la familia Botryosphaeriaceae adquirieron importancia como patógenos de la vid, debido a los estudios realizados en diferentes partes del mundo (Phillips, 2002; Van Niekerk et al., 2004; Taylor et al., 2005; Úrbez-Torres y Gubler, 2009; Úrbez-Torres, 2011). Las pérdidas del cultivo de vid en California, por *Botryosphaeria* spp. y *E. lata*, se estiman en alrededor de 260 millones de dólares por año (Siebert, 2001). En la Tabla 1 se muestran las especies de *Botryosphaeria* que se han aislado de plantas de vid alrededor del mundo.

La muerte regresiva por *Botryosphaeria* spp. es un término reciente, propuesto por Úrbez-Torres (2011), y agrupa al cancro causado por *Botryosphaeria* spp. (Bot canker, en inglés) y al brazo muerto por *Botryosphaeria* spp. Esta propuesta se debe a que, en los últimos años, los nombres de las dos enfermedades se han empleado indistintamente y existe confusión para diferenciar un padecimiento de otro. A continuación se mencionan los síntomas considerados originalmente para el brazo muerto y el cancro por *Botryosphaeria* spp.

Tabla 1. Especies de la familia Botryosphaeriaceae aisladas de vid en diferentes países. Modificada de Úrbez-Torres (2011).

Especie	Países
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Australia, Brasil, Canadá, Chile, China, España, Nueva Zelanda, EUA, Portugal, Francia
<i>Diplodia corticola</i>	México, EUA
<i>Diplodia mutila</i>	Australia, Canadá, Hungría, Nueva Zelanda, EUA, Portugal
<i>Diplodia seriata</i>	Australia, Canadá Nueva Zelanda, España, Francia, Líbano, México, USA, Portugal, Sudáfrica, Italia, Chile
<i>Dothiorella iberica</i>	Australia, EUA
<i>Dothiorella americana</i>	EUA
<i>Guignardia bidwellii</i>	EUA
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	EUA, Sudáfrica
<i>Lasiodiplodia missouriana</i>	EUA
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Australia, Bolivia, Italia, Chile, Egipto, Italia, México, EUA, Sudáfrica, España
<i>Lasiodiplodia viticola</i>	EUA
<i>Neofusicocum australe</i>	Australia, México, EUA, Sudáfrica
<i>Neofusicocum luteum</i>	Australia, España, Nueva Zelanda, EUA, Portugal, Sudáfrica
<i>Neofusicocum macroclavatum</i>	Nueva Zelanda
<i>Neofusicocum mediterraneum</i>	EUA
<i>Neofusicocum parvum</i>	Australia, Canadá, Nueva Zelanda, España, EUA, Portugal, Sudáfrica
<i>Neofusicocum ribis</i>	EUA, Australia, Taiwan
<i>Neofusicocum viticlavatum</i>	Nueva Zelanda
<i>Neofusicocum vitifusiforme</i>	España, México, EUA, Sudáfrica
<i>Phaeobotryosphaeria porosa</i>	Sudáfrica
<i>Spencermartinsia viticola</i>	Australia, España, EUA

La enfermedad del brazo muerto fue descrita por primera vez en Hungría en 1974, en donde se le asoció con *D. mutila* (Lehoczky, 1974a); posteriormente, en Francia, en el 2001, se reportó a *B. dothidea* y *D. seriata* (Larignon et al., 2001; Larignon y Dubos, 2001). Larignon et al. (2001), dividieron a la enfermedad en dos formas, una leve y una severa. La forma severa se caracteriza por la muerte regresiva de uno o mas brazos de la planta, síntoma por el cual se le atribuyó el nombre a la enfermedad. En casos extremos los brazos enfermos mueren totalmente. Además las plantas pierden las hojas, inflorescencias y frutos. La forma leve, se caracteriza por el desarrollo de manchas rojo-oscuro en las hojas de los cultivares rojos, y manchas amarillo-naranja en las de los cultivares blancos. Las manchas se presentan en el margen y en el centro de las hojas, después se extienden gradualmente y se forman grandes zonas de necrosis entre las venas y los margenes. Finalmente, todas las hojas se marchitan y el tejido muere. En las dos formas de la enfermedad, las plantas presentan bajo la corteza líneas café claro que se extienden desde la base del brazo dañado hasta la unión con el portainjertos.

El cancro causado por *Botryosphaeria* spp. se describió por primera vez en California por Leavit (1990) y se asoció con *L. theobromae*. El síntoma característico de esta enfermedad es una lesión necrótica en forma de cuña en cordones, troncos o brazos de la planta, el cual es muy similar al ocasionado por *E. lata*. Sin embargo, el cancro causado por *Botryosphaeria* spp. no presenta los síntomas foliares de la eutipiosis, los cuales son: hojas cloróticas, pequeñas y en forma de copa, internudos cortos y retraso en el crecimiento. Las plantas con cancro por *Botryosphaeria* spp. pueden presentar brotes bien desarrollados o carecer completamente de estos. También se puede observar la falta de crecimiento en algunas ramas y un crecimiento normal en otras de la misma planta (Leavitt, 1990). Varios trabajos en EUA han demostrado que un gran número de especies de la familia Botryosphaeriaceae se encuentran involucradas con este padecimiento (Van Niekerk et al., 2004; Taylor et al., 2005; Úrbez-Torres et al., 2009; Úrbez-Torres et al., 2012).

2.3.1. Muerte regresiva de vid por *Botryosphaeria* spp. en México

La muerte regresiva de vid en México se registró por primera vez en 1979 y se consideró a *E. lata* como el agente causal (Téliz y Valle, 1979). No fue hasta 1990 que este padecimiento se relacionó con *Botryosphaeria* spp. en plantas de uva de mesa de Hermosillo, Sonora. Estas plantas no mostraron los síntomas foliares característicos de la eutipiosis, y de las lesiones se aisló a *L. theobromae* (Leavitt, 1990).

En un estudio realizado en la región vitícola de Baja California y Sonora se determinó que *L. theobromae* y *D. seriata* como los principales agentes causales de la muerte regresiva de vid en el norte de México (Úrbez-Torres et al., 2008). En ese trabajo, se realizó un análisis filogenético donde se encontró alta similitud entre los aislados de *L. theobromae* mexicanos y los de California, resultados que fundamentaron la hipótesis de que este patógeno fue transmitido de California a México o viceversa.

Candolfi-Arballo (2009), aislaron las especies *D. seriata*, *D. corticola*, *N. australe* y *N. vitifusiforme*, de vides con síntomas de deterioro progresivo en Baja California. En este estudio, las pruebas de patogenicidad mostraron que todas las especies tuvieron la capacidad de producir lesiones en tejido verde de vid, excepto *D. corticola*, quien semejante al testigo, no produjo lesiones necróticas visibles. La especie aislada con mayor frecuencia fue *D. seriata*, obtenida principalmente de sectores necróticos en forma de cuña.

2.4. *Botryosphaeria* spp.

Las especies de la familia Botryosphaeriaceae pertenecen al orden Dothideales. Estos hongos se encuentran en una gran variedad de ambientes y pueden ocupar diferentes nichos ecológicos. Así, existen especies endófitas, parásitas y saprófitas en un gran número de plantas anuales y perennes (Slippers y Wingfield, 2007). Las especies patógenas pueden causar canchales, pudriciones en fruto, deterioro progresivo y otras enfermedades en un amplio rango de hospederos de importancia económica (Farr y Rossman, 2006). En algunos

casos, estos hongos permanecen latentes sin causar enfermedad, pero cuando la planta se encuentra bajo estrés, ocasionan daño rápidamente. Bajo el panorama del cambio climático, que incrementa el estrés en las comunidades vegetales, las especies de *Botryosphaeria* se consideran una amenaza para los cultivos agrícolas y los ecosistemas nativos (Slippers y Wingfield, 2007).

En vid, *Botryosphaeria* spp. pueden entrar a la planta a través de las uniones entre el portainjerto y el injerto (Lehoczky, 1974b), mediante heridas de poda y aberturas naturales (Leavitt, 1990; Epstein et al., 2008). La principal fuente de infección son los cuerpos fructíferos, generalmente asexuales (picnidios), los cuales se desarrollan en el exterior de los tejidos infectados o en los restos de madera muerta en el suelo. Se cree que los picnidios liberan las esporas con el viento y la humedad, durante el invierno y la primavera. Las posibles vías de transmisión son, el viento, la lluvia, la propagación vegetativa, tijeras de poda e insectos (Epstein et al., 2008).

La especie más virulenta de la familia Botryosphaeriaceae en vid en California, es *L. theobromae* (telomorfo *B. rhodina*). Esto fue demostrado en un trabajo realizado por Úrbez-Torres y Gubler (2009), realizando ensayos de patogenicidad. Estos resultados concordaron con los estudios realizados anteriormente en México (Úrbez-Torres et al., 2008), Italia (Burruano et al., 2008) y España (Aroca et al., 2008).

L. theobromae es un ascomiceto pleomorfo y plurívoro, generalmente se encuentra en regiones de climas tropicales y subtropicales (Punithalingam, 1976). Además de ser patógeno de vid, este hongo presenta un amplio rango de hospederos, alrededor de 500, dentro de los cuales se encuentran: árboles frutales, hortalizas y plantas ornamentales. En estas plantas puede causar canchales, deterioro regresivo, escobas de bruja, pudrición de frutos y raíces (Punithalingam, 1980). También es endófito en ciertas especies vegetales (Mohali et al., 2005; Rubini et al., 2005) y es considerado como un oportunista en humanos, en donde causa queratomicosis y feohifomicosis (Rebell y Forster, 1976; Summerbell et al., 2004). *L. theobromae* se caracteriza por tener conidias hialinas y

pigmentadas, ovoides, con un ápice ampliamente redondeado y una base truncada (Figura 1). Las conidias pigmentadas presentan un septo y apariencia estriada debido a depósitos de melanina en la capa externa (Alves et al., 2008).

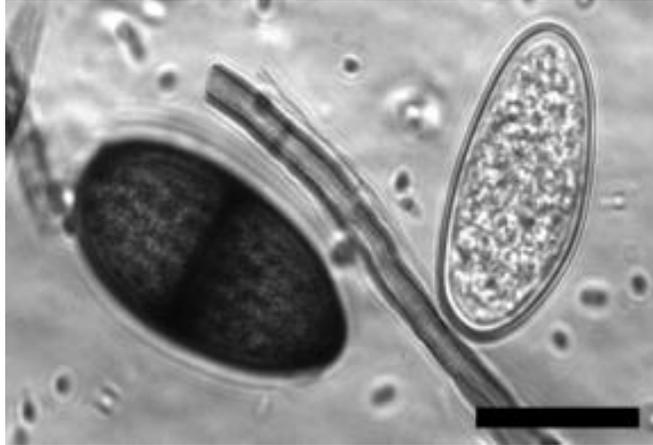


Figura 1. Conidias pigmentadas y hialinas de *L. theobromae*. Barra= 10 μ m

2.5. Control de la muerte regresiva de vid por *Botryosphaeria*

No existe un control efectivo para las afecciones de la vid causadas por especies de la familia Botryosphaeriaceae, éstas sólo se pueden prevenir o mitigar mediante medidas de saneamiento del viñedo, prácticas culturales, aplicación de fungicidas y con el uso de microorganismos antagonistas (control biológico). La falta de estrategias efectivas para el control de la muerte regresiva por *Botryosphaeria* spp. se debe al poco conocimiento epidemiológico de los patógenos involucrados (Úrbez-Torres, 2011).

2.5.1. Control químico

El uso de fungicidas para controlar la muerte regresiva por especies de la familia Botryosphaeriaceae ha sido reportada en muy pocos países (Van Niekerk et al., 2006). En Francia se utilizaba el arsenito de sodio para el control de esta enfermedad, de la misma manera que se aplicaba para la yesca (Lehoczky, 1974a). Sin embargo, este fungicida

presenta alta toxicidad en humanos y se acumula en el ambiente (Lyubun et al., 2002), por lo que fue retirado del mercado en 1999 (Surico et al., 2004).

Debido a que las especies de la familia Botryosphaeriaceae colonizan la planta de vid principalmente por heridas de poda (Leavitt, 1990; Epstein et al., 2008), existen varios trabajos dirigidos a la aplicación de fungicidas para proteger estos sitios (Leavitt, 1990; Rolshausen et al., 2006; Bester et al., 2007; Amponsah et al., 2012). A continuación se dan a conocer algunos de los antecedentes de tres fungicidas que han tenido resultados favorables para el control de la muerte regresiva por *Botryosphaeria*.

2.5.1.1. Benomilo

El efecto del benomilo sobre el crecimiento de especies de la familia Botryosphaeriaceae ha sido estudiado por diferentes autores tanto *in vitro* como en planta. En un estudio realizado por Leavitt (1990) se demostró que este fungicida reduce la incidencia de *L. theobromae* en las heridas de poda de plantas en invernadero. Otros fungicidas que tuvieron efectos similares al benomilo fueron captan, iprodine y penconazol.

Bester et al. (2007) realizaron ensayos *in vitro* y en plantas para determinar el efecto de diferentes fungicidas sobre *Botryosphaeria* spp. *In vitro*, el benomilo resultó ser altamente efectivo con un EC_{50} (concentración del fungicida a la cual se inhibió el 50% del crecimiento del patógeno comparado con el control) de 0.36-0.55 $\mu\text{g/ml}$ y un EC_{90} (concentración del fungicida a la cual se inhibió el 90% del crecimiento del patógeno comparado con el control) de 0.78-4.39 $\mu\text{g/ml}$. En los ensayos en plantas, los autores determinaron que los resultados fueron inconclusos por que la incidencia de los patógenos fue baja y muy variable.

El benomilo también ha sido probado para el control de otros hongos de la madera de vid, como *E. lata*. Sosnowski et al. (2008) determinaron que concentraciones menores de 2 g/L fueron suficientes para proteger heridas de poda contra este patógeno. Además, Halleen et

al. (2010) evaluando varios fungicidas *in vitro* sobre el crecimiento de *E. lata*, determinaron que el benomilo fue uno de los más efectivos con un EC₅₀ de 0.19 µg/ml. Estos autores, también observaron que el benomilo redujó considerablemente la incidencia del patógeno en heridas de poda.

Debido a su efectividad, el benomilo fue utilizado por muchos años para el control de *E. lata* (Gubler et al., 2005; Halleen et al., 2010), pero en el 2001 se prohibió en Estados Unidos y en el 2006 en la Unión Europea, debido a sus efectos negativos en la salud humana. El benomilo se encuentra restringido en Suecia y Bulgaria desde 1982. Los países latinoamericanos que todavía lo mantienen en uso son: México, Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Colombia (RAP-AL, 2008).

El benomilo es un fungicida sistémico de la familia de los benzimidazoles, el cual presenta una toxicidad aguda baja y no existen evidencias de su acumulación en tejidos. Este fungicida se degrada rápidamente en carbendazim y su modo de acción, al igual que el carbendazim, es por la unión a los microtúbulos, lo que inhibe la división celular y el transporte intracelular, entre otras funciones. El benomilo presenta alta afinidad a los microtubulos fúngicos y baja a los de mamíferos. La ingesta diaria admisible (ADI, por sus siglas en inglés “Acceptable Daily Intake”) es de 0-0.02 mg/kg pc (peso corporal) (WHO, 1994). Los efectos asociados al benomilo y al carbendazim son: teratogenia, toxicidad hepática y daños en el sistema reproductivo masculino (U. S. EPA, 2001).

2.5.1.2. Tiofanato de metilo

El tiofanato de metilo es otro fungicida con efectividad para inhibir el crecimiento de especies de la familia Botryosphaeriaceae. En un estudio realizado por Rolshausen et al. (2010) se determinó que el Topsin M (70% tiofanato de metilo) a la concentración de 1%, fue el fungicida que presentó mayor control sobre *Botryosphaeria* spp. La incidencia de estos patógenos se disminuyó en alrededor del 80%. Además, el tiofanato de metilo tuvo

efecto considerable sobre los hongos: *E. lata*, *P. chlamyospora*, *Pleurostomophora richardsiae*, *Togninia mínima* y *Phaeoacremonium parasiticum*.

La susceptibilidad de *Botryosphaeria* spp. ante el tiofanato de metilo, también fue evaluada en un estudio realizado por Amponsah et al. (2012). Estos autores hicieron experimentos *in vitro* y en heridas de poda. En los ensayos *in vitro* el tiofanato de metilo presentó alta efectividad sobre *N. luteum*, *N. australe* y *D. mutila*, con una EC₅₀ promedio sobre las tres especies de 0.934 mg de ingrediente activo por litro (IA/L). Para los ensayos en planta, este fungicida se aplicó a la concentración de 40g IA/ L y se redujo significativamente la incidencia de *N. luteum* en un 83%.

El tiofanato de metilo es un fungicida sistémico de la familia de los bezimidazoles. Es estructuralmente diferente al benomilo, pero al igual que éste, en el ambiente se descompone en carbendazim. Por lo que su modo de acción también es por la unión a los microtúbulos celulares. En mamíferos, a diferencia del benomilo, la descomposición del tiofanato de metilo en carbendazim es muy limitada, debido a esto, no induce malformaciones fetales ni afecta los testículos (APVMA, 2010).

La ADI recomendada para el tiofanato de metilo es de 0-0.08 mg/kg pc (WHO, 1993). Los órganos diana de este fungicida son la tiroides y el hígado, y es clasificado como "posiblemente cancerígeno". Estudios con conejos han revelado que induce un peso bajo en las crías, así como variaciones en el esqueleto (U. S. EPA, 2004).

2.5.1.3. Ácido bórico

La utilización del ácido bórico como control químico, es otra posible alternativa para el control de especies de la familia Botryosphaeriaceae. Rolshausen et al. (2010), lo aplicaron en forma de pasta en heridas de poda a la concentración de 5% y tuvo un efecto inhibitorio sobre *Botryosphaeria* spp. entre 48 y 79%. También se ha visto, que otros hongos patógenos de la madera de vid, como *E. lata* presentan alta susceptibilidad al ácido bórico.

Rolshausen y Gubler (2005), obtuvieron en ensayos *in vitro*, una inhibición total de *E. lata* con dos productos a base de este fungicida y en planta observaron que el ácido bórico redujo entre el 72 y el 98% la incidencia del patógeno.

El ácido bórico además de tener efecto fungicida, también es insecticida y herbicida (U. S. EPA, 1993). La toxicidad de este compuesto se debe al boro. El boro es un elemento de la corteza terrestre distribuido considerablemente (ATSDR, 2010). Este elemento es un micronutriente en plantas y puede ser aplicado como suplemento para cubrir sus deficiencias (Blevins y Lukaszewski, 1998). En la dieta para el ser humano es considerado como un elemento traza "probablemente esencial", ya que no se conoce muy bien cuál es su función, pero su deficiencia se ha asociado con problemas en la asimilación de otros minerales como el calcio, el fósforo y el magnesio (WHO, 1996).

La acción fungicida del boro se debe a la inhibición de la glucólisis. Al parecer este elemento interfiere en la asimilación de las aldosas, lo cual hace que el hongo no tenga suficiente energía para continuar creciendo y reproduciéndose (Bowen y Gauch, 1966). En humanos la exposición breve a grandes cantidades de boro (alrededor de 30 g de ácido bórico) puede causar daños gastrointestinales, renales, hepáticos, cerebrales y eventualmente la muerte. La dosis de boro admisible en humanos sin riesgos a la salud es de 0.2 mg/kg-día (U. S. EPA, 2004).

2.5.2. Control biológico

El término "control biológico" ha sido utilizado en diferentes áreas de la biología, principalmente en entomología y fitopatología. En entomología, se refiere al empleo de insectos depredadores, nemátodos entomopatógenos, o patógenos microbianos para suprimir poblaciones de diferentes insectos. En fitopatología, alude al uso de microorganismos antagonistas para suprimir enfermedades o para el control de malezas. En ambos casos, el organismo que se utiliza para el control se denomina agente de control biológico (Pal y McSpadden-Gardener, 2006).

Una ventaja importante que presenta el uso de microorganismos antagonistas para el control de fitopatógenos, sobre el control químico, es que los agentes de control biológico pueden proliferar y permanecer activos. Un antagonista efectivo se establece en el ecosistema de los cultivos y brinda protección durante las temporadas críticas para la infección por los patógenos. La supervivencia de los agentes de control biológico depende principalmente, del tamaño poblacional, de su ciclo de vida y su distribución en los cultivos (Lo et al., 1998)

Para el control biológico de especies de la familia Botryosphaeriaceae y en general de hongos patógenos de la madera de vid, se ha estudiado el efecto protector en heridas de poda de microorganismos antagonistas como, *Bacillus subtilis* (Halleen et al., 2010; Kotze et al., 2011) y *Trichoderma* spp. (Fourie y Halleen, 2006; Halleen et al., 2010; Kotze et al., 2011; Mutawila et al., 2011). También se han analizado los efectos benéficos en raíces proporcionados por micorrizas que contrarrestan los daños en la parte aérea causados por *Botryosphaeria* spp. (Ming et al., 2000; Krishna et al., 2010).

El uso de micorrizas y *Trichoderma* spp. en el control de *Botryosphaeria* spp. es el enfoque principal de este trabajo, por lo que se ha destinado un apartado para estos dos agentes de control biológico, en donde se mencionan los aspectos más destacados.

2.6. *Trichoderma* spp.

Las especies del género *Trichoderma*, son la forma asexual (anamorfo) del género *Hypocrea* (telomorfo) y pertenecen a la familia Hypocreaceae (Chaverri y Samuels, 2003). Estos hongos son saprófitos cosmopolitas, habitantes de suelos (Samuels, 1996) y algunos son endófitos avirulentos de plantas, colonizadores de la raíz o de la planta completa (Bailey et al., 2008). También se han reportado *Trichoderma* spp. fitopatógenos (Bailey y Lumsden, 1998) y patógenos oportunistas en humanos inmunocomprometidos (Chouaki et al., 2002).

Las especies endofitas avirulentas de *Trichoderma* han sido utilizadas ampliamente para controlar patógenos que afectan a cultivos de gran importancia económica. Estas especies colonizan la rizosfera y son antagonistas de fitopatógenos. Pueden entrar a la planta mediante la producción de enzimas líticas de la pared celular (Harman et al., 2004) y el desarrollo de un apresorio (Yedidia et al., 1999; Bailey et al., 2009). En las raíces solo colonizan las capas celulares superficiales (Yedidia et al., 1999), pero en la parte aérea se ha visto que colonizan el sistema vascular, siendo, posiblemente, los tricomas el punto de entrada (Bailey et al., 2009).

2.6.1. Identificación de *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. presentan muy pocas características morfológicas con bajo grado de variación, por lo que es fácil confundir una especie con otra. Debido a esto, existe un número reducido de especies descritas dentro del género (Samuels, 2006). Las técnicas moleculares han permitido despejar este panorama, con el análisis de regiones conservadas como la región del espaciador interno transcrito (ITS por sus siglas en inglés) del RNA ribosomal, que es una de las secuencias más utilizadas para este fin (Kullnig-Gradinger et al., 2002). Sin embargo la región ITS no permite discernir entre especies muy cercanas, por lo cual, se utilizan secuencias con mayor variación, como porciones del gen *tefl* que codifica para el factor de elongación 1- α , abreviado como EF1 α , por sus siglas del inglés Elongation Factor 1- α (Samuels, 2006).

2.6.2. Mecanismos de biocontrol de *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. presentan diferentes mecanismos para inhibir directamente a los hongos fitopatógenos, y a su vez estimular indirectamente un estado fisiológico favorable en la planta. A continuación se describen estos mecanismos.

2.6.2.1. Competencia

Las especies del género *Trichoderma* se caracterizan por colonizar sustratos en corto tiempo, por ello son buenos competidores por espacio y excluyen a hongos fitopatógenos (Papavizas, 1985). *Trichoderma* spp. también son capaces de movilizar y tomar nutrientes del suelo de una forma más eficiente que muchos microorganismos, con lo cual acaparan el alimento del medio, generando la muerte de los patógenos de plantas por inanición. Esta capacidad se debe en gran medida a que pueden aprovechar numerosas fuentes de carbono (Chet et al., 1997).

2.6.2.2. Antibiosis y micoparasitismo

Una gran mayoría de *Trichoderma* spp. secretan enzimas hidrolíticas tales como: glucanasas, quitinasas y proteasas, que les permiten degradar las paredes celulares de otros hongos, parasitarlos y nutrirse de ellos (Elad et al., 1983; Flores et al., 1997). El micoparasitismo por *Trichoderma* spp. implica la destrucción del hospedero. Durante este mecanismo, además de la acción enzimática, *Trichoderma* spp., generalmente se enrolla sobre los fitopatógenos y produce un apresorio para penetrar al interior de estos y colonizarlos (Elad et al., 1983). También se ha visto que producen compuestos antibióticos volátiles, como el 6-pentil- α -pirona y no volátiles, como la alameticina, que inhiben el crecimiento de fitopatógenos (Vey et al., 2001).

2.6.2.3. Estimulación del sistema de defensa de la planta

Algunas especies de *Trichoderma* estimulan diferentes mecanismos de defensa de la planta. En plantas de pepino y en *Arabidopsis thaliana*, *Trichoderma* spp. activan la resistencia sistémica inducida (RSI) y la resistencia sistémica adquirida (RSA) (Yedidia et al., 1999; Yedidia et al., 2003; Shores et al., 2005; Salas-Marina et al., 2011). La RSI, es el principal mecanismo activado por bacterias avirulentas de la rizosfera y funciona mediante la ruta del ácido jasmónico y del etileno, sin la producción de proteínas relacionadas con patogénesis.

La RSA, es activada a través de la ruta de ácido salicílico, y a diferencia de la RSI, presenta la acumulación de proteínas relacionadas con patogénesis. Ambos mecanismos mantienen un estado de alerta en la planta, de tal forma que cuando se presenta un patógeno, la reacción es altamente eficiente (Van Loon et al., 1998; Vallad y Goodman, 2004).

También se ha visto que algunas especies de *Trichoderma* estimulan la resistencia localizada adquirida (RLA). Ésta consiste en el mejoramiento de la resistencia en tejidos donde ocurre la infección, a diferencia de la RSA y de la RSI, la RLA, no genera una protección sistémica (Van Loon et al., 1998). Howell et al. (2000), observaron que *Trichoderma virens* mediante la colonización de las raíces de plántulas de algodón, estimuló la producción de terpenoides, así como la actividad peroxidasa en presencia de *Rhizoctonia solani*. Este estímulo solamente se encontró en el sistema radical, no en el resto de la plántula, con lo cual se inhibió eficientemente al patógeno.

2.6.2.4. Estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal

Trichoderma spp. induce el desarrollo y crecimiento vegetal, tanto en la parte aérea como en raíces (Windham et al., 1986; Chacón et al., 2007; Mwangi et al., 2011; Salas-Marina et al., 2011), lo cual puede deberse a que estos endófitos pueden ser capaces de solubilizar y hacer disponibles una gran variedad de nutrientes para las plantas. Por ejemplo, se ha visto que *T. harzianum* Rifai solubiliza elementos, tales como: Cu, Fe, Zn, Mn y P, mediante la reducción y quelación de los mismos (Altamore et al., 1999). Además algunas *Trichoderma* spp. producen hormonas de crecimiento vegetal. En un estudio realizado en *A. thaliana*, se encontró que *Trichoderma atroviride* genera índoles relacionados con ácido indol acético, los cuales son promotores directos del crecimiento de las plantas (Salas-Marina et al., 2011).

2.6.2.5. Otros mecanismos

Además de los mecanismos mencionados anteriormente, *Trichoderma* spp. son capaces de inactivar enzimas producidas por los patógenos, con lo cual impiden el daño en la planta.

En un estudio realizado por Elad y Kapat (1999), se encontró que una proteasa de *T. harzianum* desactivó una celulasa de *Botrytis cinerea*. Por otro lado, estos hongos, en algunos casos, también favorecen la micorrización, posiblemente por la estimulación de ciertos exudados en las raíces (Fracchia et al., 1998; De Jaeger et al., 2011), o por la inducción de la expresión de proteínas en la planta requeridas en la interacción planta-micorriza (Al-Asbahi, 2012).

2.6.3. Control biológico de *Botryosphaeria* spp.

Los efectos de *Trichoderma* spp. sobre especies de *Botryosphaeria* se han estudiado *in vitro* y en planta. En un trabajo realizado por Fourie y Halleen (2006) se demostró el efecto positivo de un producto comercial a base de *T. harzianum*, para proteger material de propagación contra varios patógenos de la madera, incluyendo especies de la familia Botryosphaeriaceae. Los resultados mostraron que *T. harzianum*, a la concentración recomendada por el fabricante (200 g/100 l de agua), redujo en gran medida la incidencia de los patógenos totales.

Plata-Caudillo (2010), analizó *in vitro* el efecto antagonista de seis especies de *Trichoderma* spp. nativas de la región vitivinícola de Ensenada, sobre hongos patógenos de la madera de vid, incluyendo *Botryosphaeria* spp. En este trabajo se encontró que tres cepas, una de la especie *T. harzianum* y dos de *T. gamssi* tuvieron mayor efecto inhibitorio que una cepa comercial, sobre algunas de las *Botryosphaeria* spp. analizadas, entre ellas, *L. theobromae*.

Halleen et al. (2010), determinaron que tres productos comerciales, a base de *T. harzianum*: Vinevax®, Trichoseal-Spray® y Eco77®, fueron efectivos para prevenir la infección de *Botryosphaeria* spp., entre otros hongos patógenos de la madera de vid. Eco77® a la concentración de 10^6 esporas/ ml, disminuyó la incidencia natural de los patógenos totales de un 24.8 (control) a un 17.3%.

En un trabajo realizado por Mutawila et al. (2011) se analizó el efecto preventivo de dos cepas locales de *T. atroviride* (USPP-T1 y USPP-T2), aplicadas cada una por separado o combinadas, sobre *Botryosphaeria* spp. y diferentes hongos patógenos de la madera de vid. En este trabajo también se probó el producto comercial Eco 77® a base de *T. harzianum*. Los tratamientos que disminuyeron en mayor grado la incidencia de los patógenos fueron USPP-T2 y USPP-T1+T2, con un 44.6% y 38.1%, respectivamente.

Kotze et al. (2011) realizaron un ensayo en campo donde aplicaron en heridas de poda diferentes cepas de *Trichoderma* spp. En este estudio, se observó que una cepa de *T. atroviride*, nativa del lugar donde se hizo el trabajo (provincia occidental del Cabo, Sudáfrica), disminuyó significativamente la incidencia de *N. australe*, *N. parvum*, *D. seriata* y *L. theobromae* en un 78, 80, 85 y 92%, respectivamente. Otros hongos patógenos que también fueron inhibidos fueron: *P. viticola*, *E. lata* y *P. chlamydospora*.

2.6.4. Control con *Trichoderma* spp. y fungicidas

El uso combinado de *Trichoderma* spp. con fungicidas, es una posible estrategia para controlar *Botryosphaeria* spp., ya que la combinación de control químico y biológico puede tener efectos sinérgicos o aditivos (Locke et al., 1985). El efecto químico reduce la viabilidad de los propágulos de los hongos patógenos y los hace más susceptibles al efecto antagonista de los microorganismos. Además esto disminuye la dosis y frecuencia de plaguicidas químicos (Hjeljord y Tronsmo, 1998), los cuales tienen efecto nocivo para el medio ambiente y los seres humanos.

Las especies de *Trichoderma* tienen alto potencial para ser utilizados en combinación con el control químico sobre hongos fitopatógenos, ya que son resistentes a una gran variedad de compuestos tóxicos, incluyendo fungicidas. Esto se debe a que expresan permeasas dependientes de ATP, con las cuales eliminan las sustancias nocivas de su interior (Ruocco et al., 2009). La efectividad de la combinación de *Trichoderma* spp. y control químico sobre hongos fitopatógenos ya ha sido demostrada en algunos trabajos. Por ejemplo, Cole y

Zvenyika (1988) determinaron que la integración del fungicida triadimenol con *T. harzianum* mejora el control de *R. solani* y *Fusarium solani* en tabaco. Elad y Zimand (1993), demostraron que la combinación de *T. harzianum* con iprodiona o vinclozolina incrementa el control de *B. cinerea* en plantas de pepino. Mientras que, en un trabajo realizado por Malathi et al. (2002), observaron que la actividad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum falcatum* en caña de azúcar, se mejoró con la adición de tiofanato de metilo.

2.7. Micorrizas arbusculares

Las micorrizas arbusculares (MA) son hongos endosimbiontes obligados que colonizan las raíces de más del 80% de las plantas vasculares (Brudrett, 2002). Las MA pertenecen al phylum Glomeromycota y se distribuyen ampliamente en todos los ecosistemas (Redecker et al., 2000). En esta relación mutualista, el hongo suministra agua y minerales del suelo a la planta y la planta le confiere al hongo una fuente de carbono (Siddiqui et al., 1999).

Las MA entran a las raíces mediante la formación de un apresorio y por la producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular vegetal (Bonfante y Perotto, 1995). Estos hongos colonizan las células del cortex y forman estructuras ampliamente ramificadas, denominadas arbusculos, sitio en donde ocurre la mayor parte del intercambio de nutrientes con el hospedero (Sawers et al., 2008). Las hifas intracelulares no penetran al citoplasma de las células corticales, por lo cual los arbusculos permanecen rodeados por la membrana de estas. El espacio intermedio entre la membrana vegetal y los arbusculos, se conoce como compartimiento apoplástico. Estos hongos también producen micelio extraradicular que se extiende más allá de las raíces e incrementa el área de absorción de la planta. La mayoría de las MA desarrollan vesículas donde almacenan lípidos (Smith y Read, 2008). Las MA brindan grandes beneficios a las plantas hospederas por lo que tienen alto potencial como control biológico (Akhtar y Siddiqui, 2008).

2.7.1. Mecanismos de biocontrol de MA

Los mecanismos de biocontrol de las MA son principalmente indirectos, ya que generalmente inducen un estado fisiológico favorable para la planta que le da la capacidad de resistir infecciones, sin embargo también actúan directamente sobre los fitopatógenos al competir por espacio y nutrientes (Smith, 1988).

2.7.1.1. Competencia

Algunos estudios han demostrado que las raíces colonizadas por MA no son invadidas por patógenos, por lo cual disminuyen su incidencia por la competencia por espacio. Davies y Menge (1980) hallaron una competencia localizada entre *Phytophthora* y MA, donde la colonización de las células de las raíces por los simbiontes no permitió la invasión del patógeno, debido a la falta de espacio disponible. Resultados similares fueron obtenidos por Vigo et al. (2000) en tomate con el mismo patógeno. Además de la competencia por espacio, posiblemente las MA también compiten con los fitopatógenos por nutrientes como los fotosintatos (Akhtar y Siddiqui, 2008).

2.7.1.2. Estimulación del sistema de defensa de la planta

Las MA inducen diferentes vías de señalización involucradas en el sistema de defensa de las plantas. Sundaresan et al. (1993) encontraron que *Fusarium oxysporum* fue inhibido por la presencia de *Glomus fasciculatum* en plantas de frijol, lo cual fue atribuido a que las plantas micorrizadas produjeron mayor cantidad de fitoalexinas que las no micorrizadas. Esto se debe a que las fitoalexinas son sustancias antimicrobianas producidas por las plantas (Agrios, 2005). En un estudio realizado en tomate se observó que la inoculación de *Glomus mosseae* y *G. intraradices* estimuló la producción de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los hongos patógenos, como quitinasas y glucanasas, con lo cual se produjo una resistencia localizada y sistémica sobre *Phytophthora parasitica* (Pozo et al., 2002). Además, la activación por micorrizas de la ruta del ácido jasmónico que es

parte de la resistencia inducida de las plantas (Van Loon et al., 1998; Vallad y Goodman, 2004) ha sido observada en plantas de cebada (Hause et al., 2002).

2.7.1.3. Estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal

Las MA inducen el desarrollo aéreo y radical de las plantas, posiblemente por la producción de hormonas vegetales, como auxinas, citoquinas y giberelinas (Barea y Azcón-Aguilar, 1982). Sin embargo, el principal mecanismo de estos simbiontes atribuido al crecimiento vegetal, es la capacidad que tienen de incrementar la disponibilidad de nutrientes, especialmente el fósforo (Smith, 1988) y otros elementos como el Zn, Ca, Cu, Mn y S (Pacovsky et al., 1986). Esto se debe a que aumentan la superficie de absorción de las raíces (Smith, 1988) y por ello también inducen la resistencia al estrés hídrico (Augé, 2001).

2.7.2. Uso de micorrizas arbusculares en el control de *Botryosphaeria* spp.

No existen estudios del efecto de micorrizas en vid sobre especies de la familia Botryosphaeriaceae, sin embargo, se han hecho trabajos en otras plantas leñosas hospederas de este tipo de patógenos. El efecto de *G. mosseae* sobre el patógeno *Dothiorella gregaria* en álamo (*Populus beiningensis*), fue analizado por Ming et al. (2000). Estos autores encontraron que la micorriza inoculada incrementó la resistencia de la planta, lo cual se adjudicó al incremento de absorción de agua y nutrientes, principalmente el fósforo. La micorriza también aumentó la actividad peroxidasa y polifenol oxidasa, enzimas que están directamente relacionadas con el mecanismo de defensa en álamo.

Krishna et al. (2010) determinaron el efecto de nueve especies de micorrizas por separado y mezcladas sobre el cancro producido por *Botryosphaeria ribis* en manzano. Los resultados mostraron que las plantas micorrizadas presentaron un cancro entre 50 a 90% de menor tamaño que las no micorrizadas

2.8. Control con *Trichoderma* spp. y MA

La combinación de especies de *Trichoderma* y micorrizas arbusculares para el control de fitopatógenos de la rizosfera, ha sido evaluado por algunos autores (Martínez-Medina et al., 2011; Mwangi et al., 2011). Por ejemplo, Mwangi et al. (2011) observaron que la combinación de *T. harzianum* y micorrizas en raíces de plántulas de tomate, tiende a reducir la incidencia de *F. oxysporum*, comparada con los tratamientos en donde se usaron los controles biológicos por separado, además presentaron un efecto sinérgico incrementando la altura y el peso seco de raíces y brotes. Resultados similares fueron obtenidos por Martínez-Medina et al. (2011), quienes también observaron un efecto sinérgico general con la combinación de *T. harzianum* y micorrizas sobre *F. oxysporum* en melón. El efecto positivo entre ambos controles biológicos, puede deberse a la estimulación de exudados en las raíces, por parte de la micorriza o de la *Trichoderma*, que favorecen un mutuo establecimiento (Fracchia et al., 1998; De Jaeger et al., 2011).

En la revisión bibliográfica, no se encontraron trabajos en donde se haya evaluado el efecto de *Trichoderma* spp. inoculada en la parte aérea en combinación con micorrizas, en el control de fitopatógenos que afectan la parte aérea de la planta.

2.9. Justificación

La muerte regresiva de vid causada por especies de la familia Botryosphaeriaceae genera grandes pérdidas económicas en la producción de uva, alrededor del mundo. Aunque se han probado diferentes fungicidas y han tenido resultados prometedores, para esta enfermedad aún no se tiene un control efectivo. Como la utilización de fungicidas en la agricultura trae consecuencias de contaminación ambiental y afectación a los seres humanos, el uso de cepas nativas de *Trichoderma* spp. y micorrizas arbusculares, pueden ser estrategias alternativas para controlar la muerte regresiva en vid. La combinación de estos agentes de control biológico podría tener mejores resultados en el control de *Botryosphaeria* spp., que su uso por separado. Otra estrategia que podría disminuir el uso de control químico y

potenciar el efecto inhibitorio sobre los hongos patógenos de la madera de vid, es la aplicación de fungicidas en combinación con *Trichoderma* spp. Por estas razones, en el presente trabajo se analizó el efecto *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* sobre *L. theobromae*, una especie de *Botryosphaeria* altamente virulenta en vid; en invernadero se evaluó el efecto de *Trichoderma* sp., micorrizas arbusculares y la combinación de ambas, sobre el patógeno, y finalmente se analizó *in vitro* la tolerancia de *Trichoderma* spp. a fungicidas, como un análisis preliminar para su uso combinado en el control de *L. theobromae*.

2.10. Objetivos

2.10.1. General

Evaluar *in vitro* y en invernadero los efectos de *Trichoderma* spp. y *Glomus intraradices* en el control del patógeno de vid *L. theobromae*.

2.10.2. Particulares

1. Evaluar *in vitro* el efecto de cepas de *Trichoderma* spp. nativas de Ensenada, Baja California, sobre *L. theobromae*, como un análisis exploratorio preliminar para su uso como biocontrol de este patógeno.
2. Caracterizar molecular y morfológicamente cepas de *Trichoderma* spp. nativas de Ensenada, Baja California.
3. Evaluar la tolerancia de *Trichoderma* spp. a los fungicidas benomilo, tiofanato de metilo y ácido bórico usados para el control químico de *Botryosphaeria* spp.
4. Evaluar el efecto de las interacciones: *Trichoderma-L. theobromae*, *G. intraradices-L. theobromae* y *G. intraradices-Trichoderma-L. theobromae* en vid.

2.11. Hipótesis

1. Las cepas de *Trichoderma* spp. nativas de la región vitícola de Ensenada, muestran *in vitro* un efecto antagonista, sobre *L. theobromae*
2. Las cepas de *Trichoderma* spp. nativas de la región vitícola de Ensenada, son tolerantes a diferentes fungicidas efectivos en el control de *Botryosphaeria* spp.
3. La aplicación de *Trichoderma* sp. y micorrizas arbusculares mejora el crecimiento de plantas de vid infectadas con *L. theobromae*.
4. La aplicación de *Trichoderma* sp. y micorrizas arbusculares disminuye la incidencia de *L. theobromae* en plantas de vid.
5. La aplicación combinada de *Trichoderma* sp. y micorrizas permite un mejor control de *L. theobromae* en plantas de vid que el uso individual de cada uno de estos hongos.

3. Metodología

3.1. Evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *L. theobromae*

Para evaluar el efecto antagonista de cepas nativas de *Trichoderma* spp. de la región vitícola de Ensenada, Baja California sobre *L. theobromae*, se realizaron ensayos de competencia *in vitro*. Las cepas de *L. theobromae* usadas fueron tres: UCD256Ma, UCD1814Md y MXA. Las primeras dos proceden de California y la última del Valle de Guadalupe, Baja California. Las cepas de *Trichoderma* spp., T3, T5, T6, I6, T. TORO, L508 y T. TWINS usadas, son nativas de Baja California y fueron previamente caracterizadas a nivel de género. Adicionalmente se usó una cepa identificada como *T. atroviride*. Para los ensayos de competencia, los micelios de los aislados conservados en glicerol al 20% a -20°C, fueron reactivados creciéndolos en papa dextrosa agar (PDA, Difco®) a 28°C en oscuridad por 4 días. Las cepas utilizadas en este estudio, forman parte del cepario del laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Los ensayos de competencia consistieron en cultivos duales de *Trichoderma* spp. y *L. theobromae* entre las ocho cepas de *Trichoderma* spp. y las tres del patógeno, mencionadas anteriormente. Estos se realizaron en cajas de Petri de plástico de 85 mm de diámetro conteniendo PDA. Como inóculos, se utilizaron discos miceliales de 5 mm de diámetro obtenidos con un sacabocados estéril del margen de cada colonia previamente reactivada. El inóculo de *L. theobromae* se colocó en un borde de la caja de Petri y el de *Trichoderma* spp. en el lado opuesto, a 80 mm de distancia. Se hicieron cuatro réplicas por cada combinación de *Trichoderma*-*L. theobromae*, y como controles positivos se cultivaron las cepas de *L. theobromae* sin el antagonista putativo. Los cultivos se incubaron por siete días a 28°C en oscuridad.

Al final del periodo de incubación, el porcentaje de inhibición fue estimado usando la ecuación propuesta por Royse & Ries (1978):

$$\text{Porcentaje de inhibición} = [100 \times (r1-r2)/r1] \quad (1)$$

Donde:

r1, es la distancia mayor alcanzada por el patógeno (mm), después de siete días de la inoculación.

r2, es la distancia menor alcanzada por el patógeno (mm), después de siete días de la inoculación.

En la Figura 2 se indica cómo se determinó la distancia mayor y menor alcanzada por el patógeno

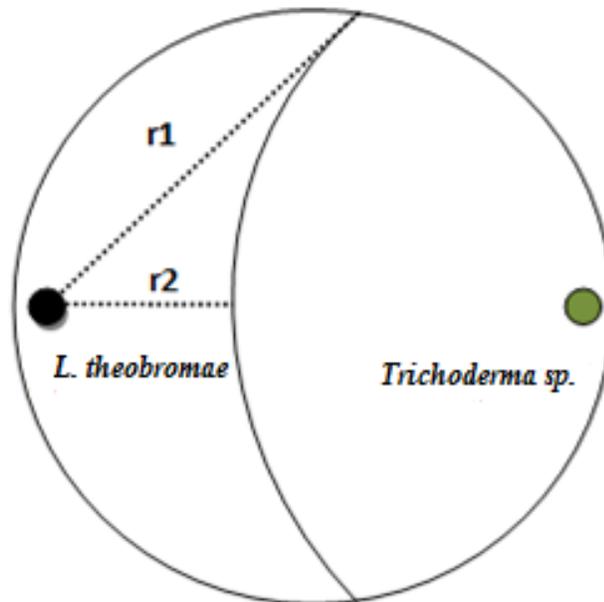


Figura 2. Determinación de la distancia mayor (r1) y la distancia menor (r2) alcanzada por el patógeno en un cultivo dual con *Trichoderma sp.*

3.2. Análisis microscópico de las interacciones de *Trichoderma* spp. y *L. theobromae*

Para el análisis de las interacciones microscópicas entre cinco cepas de *Trichoderma* spp. (T3, T5, T6, I6, T. TORO) y una cepa de *L. Theobromae* (UCD256Ma), se realizaron cultivos duales en medio de agar al 1.5% en agua, usando las mismas condiciones mencionadas para los ensayos de competencia. Transcurrido el tiempo de incubación, se hicieron cortes rectangulares en la zona de interacción, con los cuales se realizaron preparaciones temporales mediante la técnica del bloque invertido. La técnica consiste en colocar los cortes de tal manera que la superficie del cultivo fúngico quede en contacto con el portaobjetos. Las preparaciones se analizaron con un microscopio invertido modelo Axiovert 200 (Zeiss®), utilizando las técnicas microscópicas de campo claro y contraste de fases. Las imágenes fueron capturadas con una cámara AxioCam (Carl Zeiss®) y se procesaron usando el software Axiovision versión 4.8 (Zeiss®).

3.3. Caracterización morfológica de *Trichoderma* spp.

Para caracterizar morfológicamente las cepas de *Trichoderma* spp., se evaluaron las características macroscópicas y las tasas de crecimiento creciéndolas en dos medios de cultivo, PDA y SNA (Spezieller Nährstoffmarmmer), en cajas de Petri de plástico de 85 mm de diámetro. Los cultivos en ambos medios se iniciaron a partir de discos miceliales de 5 mm, obtenidos del margen de cultivos en PDA incubados a 28°C por 4 días. Todas las cajas se inocularon en el centro y se incubaron a 28°C por una semana en oscuridad. Para determinar la tasa de crecimiento, se marcó el crecimiento radial cada 24 horas hasta que el hongo llenó la caja y por cada día se midieron 5 radios al azar. Transcurrida la semana de incubación se analizaron las características de la colonia: coloración, olor, textura y forma. De cada cultivo, se hicieron 3 replicas.

Las conidias y conidióforos se analizaron en cultivos en agar al 1.5% en agua, los cuales se realizaron bajo las mismas condiciones utilizadas para los cultivos del análisis de las características macroscópicas y las tasas de crecimiento. Al final del periodo de incubación,

se cortaron fragmentos rectangulares en el margen de cada colonia y se prepararon y observaron como en el análisis microscópico de las interacciones. Se determinó la forma de las conidias y conidióforos. La determinación de las especies de *Trichoderma* se hizo utilizando las claves del sitio interactivo: <http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> (Samuels et al., 2012).

3.4. Identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* spp.

Las siete cepas de *Trichoderma* spp. caracterizadas a nivel de género, fueron analizadas molecularmente para su identificación a nivel de especie. Esto se basó en la amplificación y secuenciación de una porción del del gen *tefl* que codifica para el factor de elongación 1- α , como se detalla a continuación.

3.4.1. Extracción de ADN de las cepas de *Trichoderma* para su identificación molecular

Para la extracción de ADN, las cepas de *Trichoderma* spp. se crecieron en caldo de papa dextrosa (PDB, Difco®), en agitación continua a 180 rpm a 25°C por 3 días. El micelio fue recuperado, se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y fue congelado a -20°C toda la noche. El micelio congelado se trituró con una varilla de vidrio estéril y se extrajo el ADN genómico usando un Kit de extracción comercial (Kit DNeasy Plant Tissue, Quiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante. El resultado de la extracción fue comprobado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % a 60 voltios durante 60 min en Tris acetato- EDTA (TAE) 1X. Para determinar el tamaño del fragmento, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Labnet International, Inc.). Para revelar la presencia del ADN, a cada muestra, al ser colocada en el gel, se le agregó GelStar 1X (Cambrex Bio Science Rockland, Inc.). Al final de la electroforesis los fragmentos fueron visualizados bajo una lámpara de luz ultravioleta (UV). El ADN analizado, se conservó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml a -20°C hasta su utilización.

3.4.2. Amplificación de una porción del gen *tef1* de las cepas de *Trichoderma*

La amplificación de una porción del gen *tef1* se realizó con los oligonucleótidos EF1 (5' ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC) y EF2 (5' GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT) (O'Donnell et al., 1998). Los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente de 700 pb (O'Donnell et al., 1998). Para la mezcla de reacción de PCR, se utilizaron 2.5 µl de amortiguador MasterAmp™ 10X (Epicentre, Biotechnologies), 1.25 µl de cada oligonucleótido a 10 pM, 0.25 µl de dNTP's a 20mM, 2µl de MgCl₂ a 25mM (Fermentas International, Inc.), 1 µl de ADN genómico, 0.2 µl de Taq DNA polimerasa (5 U/ µl) (Fermentas International, Inc.) y agua destilada para completar un volumen de 25 µl. La reacción fue realizada en un termociclador BioRad® (MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler) usando las condiciones de, 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de alineamiento a 57 °C y 1 min de extensión a 72°C, finalizando con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. La presencia y el tamaño de los fragmentos se determinó realizando una electroforesis bajo las mismas condiciones que la realizada después de la extracción del ADN genómico.

3.4.3. Purificación y secuenciación

Los fragmentos del ADN se aislaron de los desoxinucleótidos trifosfato y de la polimerasa usando el kit de purificación QuiAquick® (Quiagen®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos purificados se enviaron al Instituto Genómico de la Universidad Clemson (Clemson University Genomics Institute) para su secuenciación en un sentido con el cebador EF1. Las secuencias obtenidas se compararon con las registradas en el banco de secuencias (GenkBank) de "The National Center for Biotechnology Information" (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Para realizar un análisis filogenético, primero se obtuvieron secuencias del gen *tefl* de distintas especies de *Trichoderma* del banco de genes del NCBI. Estas secuencias se alinearon con las obtenidas de las cepas de *Trichoderma* spp. analizadas, usando el programa BioEdit (versión 7.0.9.0) y el análisis se realizó con el programa MEGA 4 utilizando los algoritmos, vecino más cercano, máxima parsimonia y mínima evolución. La estabilidad de las ramificaciones se calculó con 500 repeticiones de bootstrap.

3.5. Evaluación *in vitro* de la sensibilidad a fungicidas de *Trichoderma* spp. y *L. theobromae*

Para la evaluación de sensibilidad a fungicidas se usaron tres productos químicos: el benomilo, el tiofanato de metilo y el ácido bórico. Como fuente de benomilo se usó el producto comercial, Califa® 50 PH (500 g de benomilo por Kg); del tiofanato de metilo, Cercobin®-M (700 g de tiofanato de metilo por Kg); y del ácido bórico, el reactivo analítico de Mallinckrodt®. El efecto inhibitorio *in vitro* sobre el crecimiento se evaluó en las cepas de *Trichoderma*: T3, T5, T6, I6 y T. TORO y en una cepa de *L. theobromae* (UCD256Ma). El benomilo se evaluó a 0.25, 0.5 y a 0.75 µg/ml; el ácido bórico a 2, 5 y 10 mg/ml; y el tiofanato de metilo a 0.07, 0.7 y 7 mg/ml. Primero se prepararon soluciones madre de todos los fungicidas de 100 mg/ml en agua destilada estéril. De estas se tomaron alícuotas en las cantidades necesarias para ajustar cada concentración en medio PDA previamente esterilizado pero sin solidificar. Cada mezcla fue agitada hasta que se obtuvo una suspensión homogénea. El medio, ya con la concentración adecuada de fungicida, se vertió en cajas de Petri de 85 mm de diámetro. Una vez solidificado, las cajas se inocularon en el centro con discos miceliales de 5 mm, obtenidos de la zona de crecimiento de cultivos incubados a 28°C por 4 días. Como controles positivos, se hicieron cultivos de los hongos en PDA sin fungicida. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento y se incubaron a 28°C en oscuridad hasta que los controles llenaron la caja. Se marcó el crecimiento cada 24 horas y se midieron 5 radios por día. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó con la siguiente fórmula (Sultana y Ghaffar, 2010):

$$\text{Porcentaje de inhibición} = (A-B)/A \times 100 \quad (2)$$

Donde:

A: media del crecimiento radial en mm del hongo control

B: media del crecimiento radial en mm del hongo en el medio con fungicida.

3.6. Obtención de la micorriza arbuscular

La micorriza arbuscular utilizada para los ensayos en planta, fue la especie *G. intraradices* obtenida a partir del producto comercial Micorriza INIFAP^{MR}, amablemente proporcionado por el Dr. Cesar Valenzuela Solano, Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Este sustrato presenta alrededor de 20 esporas de *G. intraradices* por gramo.

3.7. Ensayos en plantas

3.7.1. Tratamientos y diseño experimental

El efecto de *G. intraradices* y *Trichoderma* sp.(cepa T6) sobre *L. theobromae* (cepa UCD256Ma) en vid, fue evaluado bajo condiciones de invernadero mediante la aplicación de ocho tratamientos, cada uno con 5 repeticiones, donde la unidad experimental fue una planta. El diseño experimental consistió en dos bloques aleatorizados, uno integrado con plantas sin micorriza y otro con plantas con micorriza. En la Tabla 2 y la Figura 3, se muestran los tratamientos y su distribución en el invernadero.

Tabla 2. Tratamientos del ensayo en planta utilizados para evaluar el efecto de *G. intraradices* y *Trichoderma* sp. sobre *L. theobromae* en vid, y el número asignado a cada uno.

Número	Tratamientos
1	Plantas micorrizadas.
2	Plantas micorrizadas e inoculadas con <i>L. theobromae</i> .
3	Plantas micorrizadas e inoculadas con <i>Trichoderma</i> sp.
4	Plantas con <i>Trichoderma</i> sp.
5	Plantas inoculadas con <i>Trichoderma</i> sp. y <i>L. theobromae</i> .
6	Plantas inoculadas con <i>Trichoderma</i> sp., <i>L. theobromae</i> y micorrizas.
7	Plantas inoculadas con <i>L. theobromae</i> .
8	Plantas sin inóculo (controles).

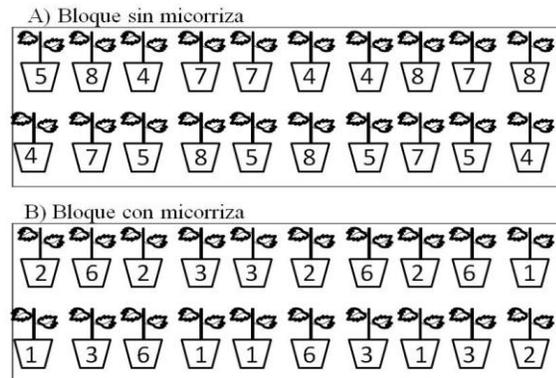


Figura 3. Diseño experimental en dos bloques aleatorizados usado para evaluar el efecto de *G. intraradices* y *Trichoderma* sp. sobre *L. theobromae* en vid.

El invernadero utilizado mide 9 m de ancho por 14 de largo. Es de estructura metálica, con cubierta de plástico en su parte superior y malla antiáfidos por los lados. No tiene control climático automatizado, y la humedad ambiental y temperaturas en el interior, se regulan subiendo y bajando de manera manual las cortinas laterales de plástico. En su interior el invernadero tiene bancales de estructura metálica cubiertos con malla de alambre de 15 x 15 cm. Para el presente estudio fue colocado un almacenador automatizado de datos (Spectrum, Watchdog, modelo 1650) con sensores de temperatura, humedad y un piranométrico de silicón externo (Spectrum, SP0367OI). El almacenador fue programado para tomar lecturas cada 30 minutos.

Las plantas utilizadas fueron de la variedad Cabernet Sauvignon injertadas en el patrón V-4 1003P, con una edad aproximada de 7 meses, y establecidas en macetas de 5 galones con sustrato musgo de turba y arena estériles en proporción 3:2. Las características químicas del sustrato utilizado para las plantas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características químicas del sustrato utilizado para las plantas de vid.

CE (dS/m)	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Fe (ppm)	Zn (ppm)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	Na (%)
3.2	0.27	0.07	0.60	1.10	1.31	3910	55.30	244.75	19.8	0.12

En cada maceta se colocó un tubo de policloruro de vinilo (PVC, del inglés poly vinyl choride) que fue utilizado para la medición del flujo de CO₂ del sustrato. El tubo era de color blanco de un espesor de 0.3 cm, con 10.8 cm de diámetro y 8.8 cm de altura, el cual se enterró a 3.3 cm de profundidad en el sustrato, quedando 5.5 cm de éste en la superficie, como se muestra en la Figura 4.

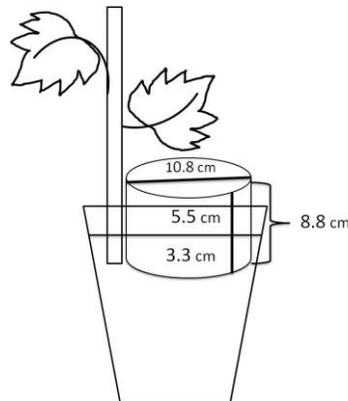


Figura 4. Tubo de PVC instalado en las plantas, que sirvió como base para la cámara del sistema utilizado para medir el CO₂ del suelo.

3.7.2. Inoculación de plantas de vid con *G. intraradices*

Las plantas seleccionadas fueron inoculadas con alrededor de 100 esporas de *G. Intraradices* cada una. Para esto, se retiró la capa superficial del sustrato hasta dejar expuestas las raíces y sobre ellas se agregaron 5 g de Micorriza INIFAP^{MR} suspendidas en 50 ml de agua destilada estéril. Posteriormente, la capa superficial del sustrato fue incorporada de nuevo hasta cubrir totalmente las raíces.

3.7.3. Inoculación de plantas de vid con *Trichoderma* sp.

Después de dos semanas de realizada la inoculación con micorrizas, las plantas correspondientes, se inocularon con la cepa de *Trichoderma* T6. Para ello, primeramente, con una navaja estéril, a la mitad del tallo se les realizó una herida de 2 cm de diámetro, dejando expuesto el sistema vascular y la herida se cubrió con papel Parafilm® para evitar su contaminación. Antes de inocular la trichoderma se dejaron transcurrir cuatro horas, para permitir la salida de la savia de las heridas realizadas. Con este procedimiento se buscaba reducir el riesgo de que el flujo de la savia evitara la permanencia del inóculo de la trichoderma en el tejido vascular. Después de transcurrido el tiempo señalado, se retiró el papel Parafilm® y las heridas fueron inoculadas con 10 µl de una suspensión de 2×10^7 conidias por ml de *Trichoderma*. La suspensión de conidias se preparó usando un cultivo crecido en PDA en una caja de Petri de 85 mm de diámetro, incubado por dos semanas a 28°C en oscuridad. Para extraer las conidias, se adicionó agua destilada estéril sobre la superficie del cultivo y se agitó suavemente hasta que las conidias se desprendieron con el agua. La solución de agua y conidias fue vertida en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se ajustó con un hematocitómetro. Las plantas de los tratamientos sin *Trichoderma* sp. se inocularon con 10 µl de agua destilada estéril. Después de la inoculación, las heridas se volvieron a cubrir con Parafilm®.

3.7.4. Inoculación de plantas de vid con el patógeno

El aislado de *L. theobromae* utilizado en los ensayos en planta fue el identificado como UCD256Ma, el cual fue inoculado en las plantas que lo requerían, una semana después de la *Trichodema* T6. Primeramente se indujo la producción de picnidios de *L. theobromae*, creciendo la cepa en agua con agar al 1.5% en presencia de palillos de madera estériles. El medio fue incubado a temperatura ambiente bajo un ciclo de 12 horas luz blanca/12 horas oscuridad por aproximadamente 3 semanas. Los picnidios se extrajeron con pinzas metálicas estériles y se colocaron en un tubo de 1.5 ml con agua destilada estéril. Posteriormente, se trituraron con una varilla de vidrio estéril y se dejaron reposar por aproximadamente 10 min, hasta que los restos de micelio más pesados se precipitaron. La primera fase de la suspensión, se colocó en otro tubo de 1.5 ml estéril y se ajustó a 5×10^4 conidias por ml, con un hematocitómetro. Para la inoculación, se retiró el papel Parafilm® de las heridas hechas en las plantas una semana antes, y en ellas se aplicaron 10 µl de la solución de conidias de *L. theobromae*. Por último, las heridas se volvieron a cubrir con papel Parafilm®.

3.7.5. Mantenimiento de las plantas

Durante los tres primeros meses del experimento las plantas fueron fertilizadas cada semana, y en el último mes cada tercer día con la solución de Hoagland modificada (Hoagland y Arnon 1938), debido a que el contenido de fósforo fue disminuido al 25% (Tabla 4).

Tabla 4. Composición de la mezcla fertilizante aplicada a las plantas de vid, basada en la solución de Hoagland (Hoagland y Arnon 1938), cuyo contenido de fósforo fue reducido al 25%.

Fertilizante	Fórmula	Dosis	Unidades	alícuota (ml/L)
Nitrato de calcio	Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	230	g	2.5
Nitrato de potasio	KNO ₃	185	g	2.5
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	30	g	1.0
Nitrato de magnesio	Mg (NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	300	g	1.0
Poliquelhierro®		10	ml	1.5
Ácidofósforico	H ₃ PO ₄	30	ml	0.5
Poliquelcinc®		5	ml	
brexilMn®		8	g	
Quelato de cobre		0.5	g	

3.7.6. Evaluación de los tratamientos

El experimento duró cuatro meses y medio, y cubrió el periodo comprendido del 6 de Diciembre de 2011 al 21 de Abril de 2012. El inicio del estudio fue establecido cuando se realizó la inoculación con la micorriza a la extracción de las plantas de las macetas. Las variables evaluadas durante el experimento y después de éste se describen a continuación.

3.7.6.1. Medición del flujo de CO₂ del sustrato

Mensualmente, se midió el flujo de CO₂ del sustrato de las plantas utilizando un equipo provisto de un analizador de gas infrarrojo (LI-8100A Soil CO₂ Flux System, LI-COR, Lincoln, NE, USA), a través de una cámara de 10 cm de diámetro (8100-102 Survey Chamber, LI-COR, Lincoln, NE, USA). Para ello, la cámara se colocó sobre el tubo de PVC de cada maceta, de tal forma que la entrada de la cámara embonó con la boca del tubo para formar un cilindro herméticamente cerrado (Figura 5). Este cilindro, tuvo como base el sustrato de cada planta y un volumen total de 1358 cm³, donde el flujo de CO₂ del sustrato

fue medido automáticamente por 1.5 min en $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. La temperatura y humedad del suelo se determinaron mediante sensores auxiliares conectados al mismo equipo. Las mediciones se tomaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los datos se capturaron mediante el programa LI-8100 versión 3.0.1 (LI-COR Biosciences) y se manipularon a través del software FV8-100 versión 3.0 (LI-COR Biosciences).



Figura 5. Cámara del equipo para medir el flujo de CO_2 del sustrato de las plantas (LI-8100A Soil CO_2 Flux System, LI-COR Lincoln, NE, USA), sobre el tubo de PVC previamente instalado en una maceta.

3.7.6.2. Incidencia de *Trichoderma* T6 y de *L. theobromae*

Cuatro meses después de la inoculación con el patógeno las plantas se extrajeron de las macetas. Las raíces se desprendieron minuciosamente del sustrato y se lavaron con agua corriente. Para determinar la presencia de la trichoderma T6 y *L. theobromae*, en el punto de inoculación, con una navaja previamente esterilizada, se obtuvo la zona de la herida hecha en cada planta, incluyendo aproximadamente 1 cm superior y 1 cm inferior de tallo circundante a ésta. Bajo condiciones asépticas, se retiró la corteza del fragmento, se sumergió rápidamente en alcohol y se flameó por pocos segundos con un mechero para su esterilización superficial. Enseguida, utilizando una navaja previamente esterilizada se obtuvieron de este fragmento, 8 trozos de 1mm de diámetro aproximadamente, los cuales

incluyeron tejido vascular. Estos, se distribuyeron de forma uniforme en dos cajas Petri conteniendo PDA y 15 μ g/ml de cloranfenicol para evitar el crecimiento bacteriano. Las cajas fueron incubadas por tres semanas a 28°C en oscuridad. El crecimiento fúngico de los ocho trozos se monitoreó diariamente y se resembró cuando fue necesario. En el caso de que se observara crecimiento en uno o más fragmentos, los otros fragmentos se removieron de la caja Petri y se colocaron en cajas con medio nuevo para evitar contaminación cruzada. Los hongos se identificaron según las características morfológicas de la colonia y sus estructuras microscópicas. La incidencia del patógeno y de T6 en las plantas, se determinó según el número de fragmentos que fue colonizado por cada hongo, considerando la colonización de los ocho fragmentos como el 100% de incidencia.

3.7.6.3. Determinación del peso seco de las plantas

Para la determinación del peso seco de las plantas, estas se dividieron en dos partes: tallo y raíces. Cada sección se colocó en bolsas de papel con perforaciones para secarse usando un horno de convección, a 65°C por dos días y se determinó el peso seco de cada muestra.

3.7.6.4. Porcentaje de micorrización

Para determinar el porcentaje de micorrización, se utilizó una muestra representativa de raíces por cada planta, la muestra fue tomada manualmente en el momento en que las plantas se extrajeron de las macetas. Las muestras se lavaron con agua corriente y se conservaron en etanol al 50% en oscuridad total hasta el proceso de la tinción. El protocolo de tinción utilizado fue el propuesto por Gemma (1989), con algunas modificaciones, como sigue. El etanol se retiró de las raíces, se enjuagaron con agua destilada y se aclararon en KOH al 1.5% por 30 min a 90°C. Posteriormente, el KOH se eliminó, las raíces se enjuagaron con tres cambios de agua de la llave. Para su blanqueamiento, se sumergieron en una solución alcalina de NH₄OH al 1.8% en 3% de H₂O₂, durante 5 min a 90°C. Después, se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en HCl al 1% a temperatura ambiente, durante toda la noche, para su acidificación. Al día siguiente, se retiró el HCl y se

sumergieron en una solución de tinción de azul tripano al 0.05% en glicerol ácido (50% glicerol, 5% ácido láctico y 0.05% HCl%) durante 30 min a 90°C. Posteriormente, la solución de tinción fue eliminada y se colocaron en glicerol ácido a temperatura ambiente, para eliminar el exceso de colorante. Las muestras se conservaron en glicerol ácido en oscuridad hasta su análisis.

El porcentaje de micorrización de cada planta se determinó mediante el método de las intersecciones magnificadas (McGonigle et al., 1990). Para ello, en un portaobjetos se colocaron raíces acomodadas horizontalmente. Se inspeccionaron 100 intersecciones entre raíces y un intersección vertical en el ocular de un microscopio óptico (Olympus CX2LED), a una magnificación de 400x. La presencia o ausencia de estructuras micorrícicas (vesículas, arbusculos, micelio y microesclerocios) fue determinada para cada intersección, de tal forma que el número de intersecciones con estructuras micorrícicas correspondió al porcentaje de micorrización por muestra. Con la técnica de campo claro, se tomaron imágenes de estas estructuras usando el microscopio invertido Axiovert 200, Zeiss® acoplado a una cámara AxioCam (Carl Zeiss®) y se procesaron usando el software Axiovision versión 4.8 (Zeiss®).

3.7.6.5. Análisis de suelo

Se tomó una muestra de suelo compuesta al inicio y una muestra representativa por planta al final del experimento. Para su análisis, las muestras se mandaron al laboratorio de análisis de suelos, aguas y plantas del INIFAP (Ciudad Obregón, Sonora). En la primera muestra se determinó el contenido de macro y micronutrientes, así como la conductividad eléctrica del sustrato. En las muestras finales, se determinó el contenido de fósforo, zinc, pH y la conductividad eléctrica.

3.8. Análisis estadísticos

Los valores obtenidos de los porcentajes de los ensayos *in vitro* y en planta se transformaron en arcoseno para normalizarlos. Los datos del ensayo de competencia se sometieron a un ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas del porcentaje de inhibición de las cepas de *Trichoderma* sobre las del patógeno, por cada cepa de *Trichoderma* spp. (factor cepa del patógeno). Además, con un ANOVA de una vía se determinó el efecto del factor cepa del patógeno y factor cepa de *Trichoderma* por separado en el porcentaje de inhibición de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre las del patógeno. Con los datos obtenidos por los ensayos con fungicidas, por cada concentración de los fungicidas, se realizó un ANOVA de una vía (factor cepa), para determinar la existencia de diferencias significativas del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial entre las cepas por cada concentración de los fungicidas. Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante una prueba a posteriori de Tukey con un nivel de significancia del 95.

Por cada variable evaluada en los tratamientos en plantas (el flujo de CO₂, la temperatura, la humedad, el fósforo, el zinc, pH y conductividad eléctrica del sustrato; la incidencia de *Trichoderma* T6 y de *L. theobromae*; el peso seco de la raíz y del tallo; el porcentaje de micorrización; y la temperatura ambiental del invernadero) se corrió un ANOVA de una vía, con un nivel de significancia del 0.05. En el caso de no encontrar diferencias significativas, el análisis se realizó al nivel del 0.1 para determinar la existencia de diferencias marginalmente significativas. Las diferencias entre las medias se analizaron con una prueba a posteriori de Fisher. Para descartar que la respiración del suelo estuviera influenciada por el efecto de la temperatura y no solamente por la presencia de los microorganismos y de las raíces de la planta, los valores de CO₂ del suelo, se normalizaron a la temperatura de 25°C, por cada tratamiento, con la siguiente ecuación (Vargas et al., 2010):

$$y = b_1 * \exp^{(b_2 * (25 - T_s))} \quad (3)$$

Donde:

y , es la temperatura normalizada a 25°C.

b_1 , es la respiración basal (respiración heterótrofa y autótrofa, que no depende de la temperatura).

b_2 , es una constante.

Por cada una de las siguientes variables: el peso seco de las raíces, el flujo de CO₂, el contenido de fosforo, el contenido de zinc, el pH y la conductividad eléctrica del sustrato; se realizaron pruebas *t*-Student con el 95% de confianza para la comparación entre: la media de la combinación de los tratamientos con micorriza y la media de la combinación de los tratamientos sin micorriza; la media de la combinación de los tratamientos con *Trichoderma* y la media de la combinación de los tratamientos sin *Trichoderma*; y la media de la combinación de los tratamientos con patógeno y la media de la combinación de los tratamientos sin patógeno. También se hicieron análisis de correlación lineal entre las posibles combinaciones de todas las variables con el nivel de confianza de 0.05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA versión 8 y las gráficas con Excel (Microsoft Office, 2007).

4. Resultados

4.1. Evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *L. theobromae*

En la Figura 6 se puede observar uno de los ensayos de competencia realizado, en este caso la trichoderma T6 sobre UCD256Ma. Los tres aislados de *L. theobromae* fueron inhibidos alrededor o arriba del 30% por las ocho cepas de *Trichoderma* spp (Figura 7). Las cepas *T. atroviride*, T6, L508 e I6 inhibieron por igual a las tres cepas del patógeno. La cepa T. TWINS afectó en mayor grado el crecimiento de UCD256Ma (43%) ($p<0.05$). La trichoderma T3 fue, significativamente ($p<0.05$) más efectiva inhibiendo a la cepa MXCA (40.3%) que a la UCD256Ma (31.4%). La cepa T5 inhibió en mayor grado a la cepa UCD256Ma (38.1%) que a la UCD1814Md (33.7%) ($p<0.05$). La cepa T. TORO fue más efectiva inhibiendo a la cepa MXCA (41.6%) que a la cepa UCD1814Md 35.9% ($p<0.05$).

Las trichodermas L508, y *T. atroviride*, aunque no presentaron diferencias significativas ($p<0.05$), en la inhibición del crecimiento de las tres cepas del patógeno, tuvieron una tendencia de inhibir más al aislado UCD256Ma. Algo similar se pudo observar con la trichoderma T6 sobre el patógeno MXCA y para la trichoderma I6 sobre las cepas UCD256Ma y MXCA.

La cepa de trichoderma que presentó un efecto ligeramente mayor sobre el patógeno fue la T6 (40.6%) (Figura 8), aunque solamente mostró diferencias significativas ($p<0.05$) cuando se comparó con las trichodermas L508 y *T. atroviride*. En general el aislado del patógeno que menos se inhibió por la presencia de las *Trichoderma* spp. fue la UCD1814Md (35.6%) ($p<0.05$) (Figura 9).

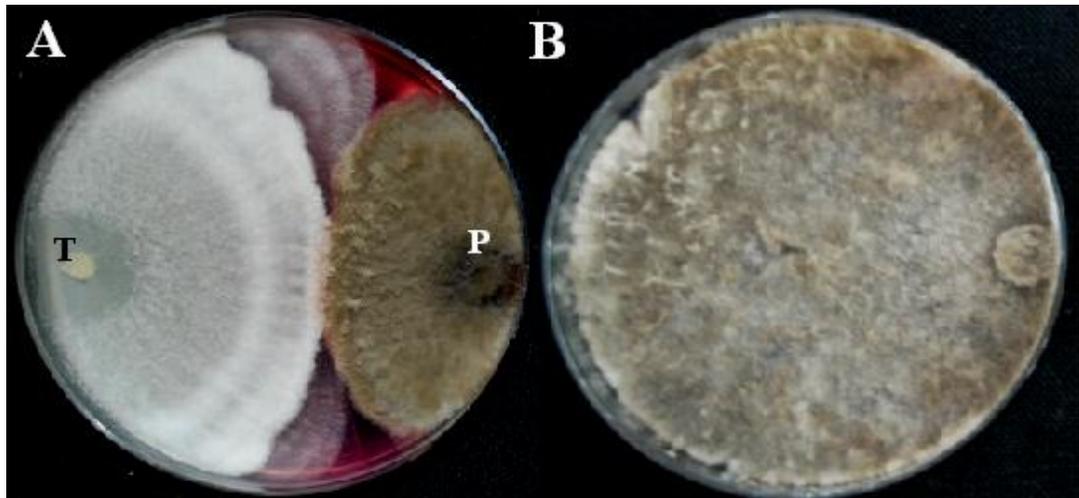


Figura 6. Ensayo de competencia entre *Trichoderma* sp. T6 y *L. theobromae* UCD256 Ma. A) cultivo dual de T6 y UCD256Ma. B) cultivo control de UCD256Ma. La letra T indica el sitio de inoculación de *Trichoderma* sp. y la letra P el del patógeno.

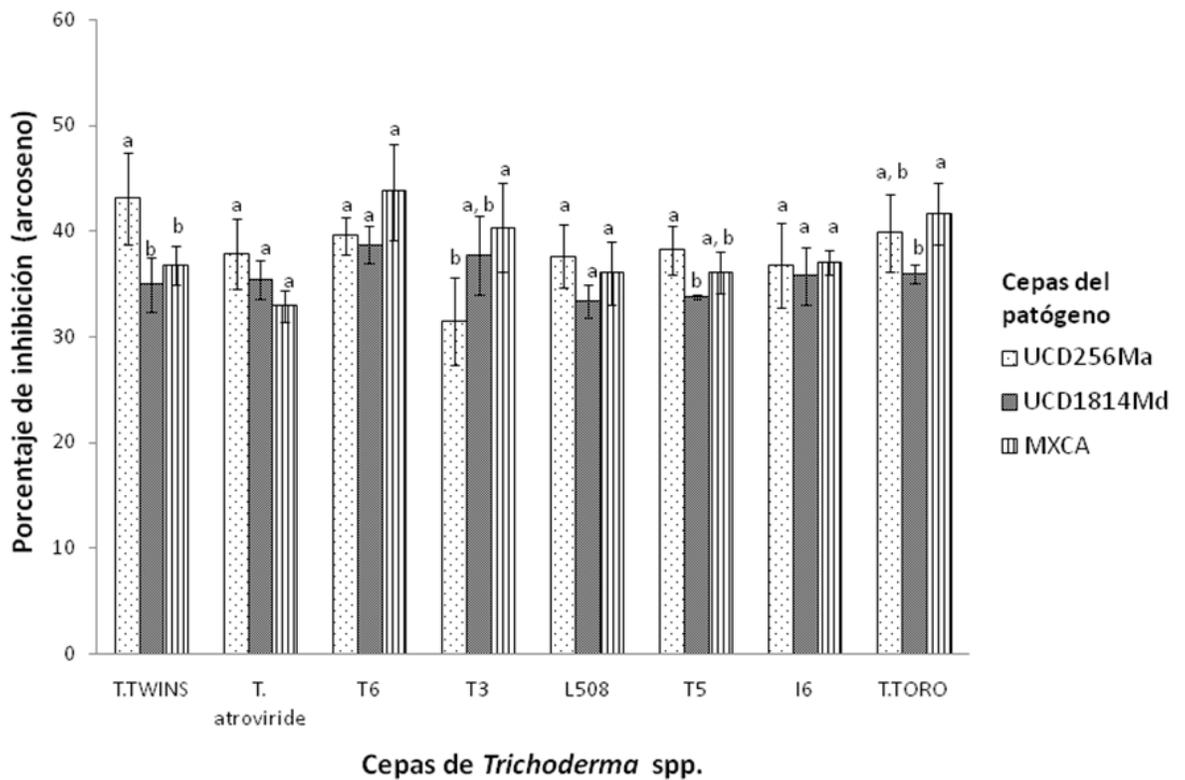


Figura 7. Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del porcentaje de inhibición por cada cepa de *Trichoderma* spp. sobre las tres cepas del patógeno. Las barras representan la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

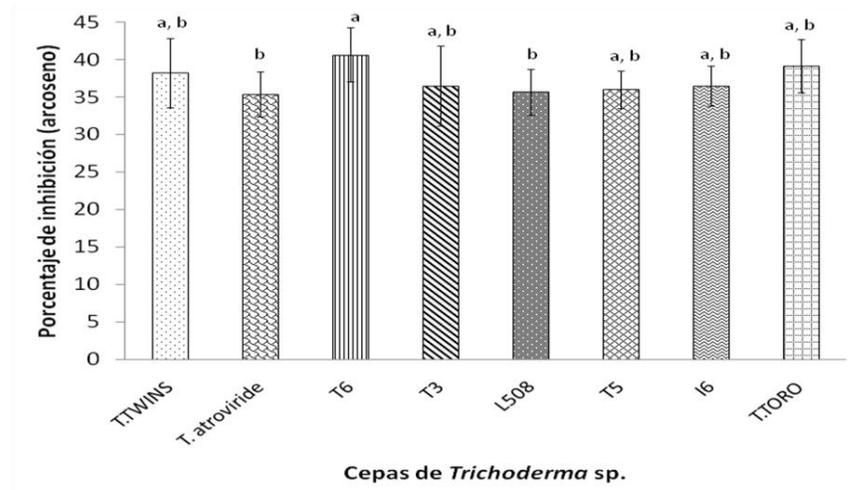


Figura 8. Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del efecto cepa de *Trichoderma* sobre el porcentaje de inhibición ejercido por las ocho cepas de *Trichoderma* en las tres cepas del patógeno. Las barras representan la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

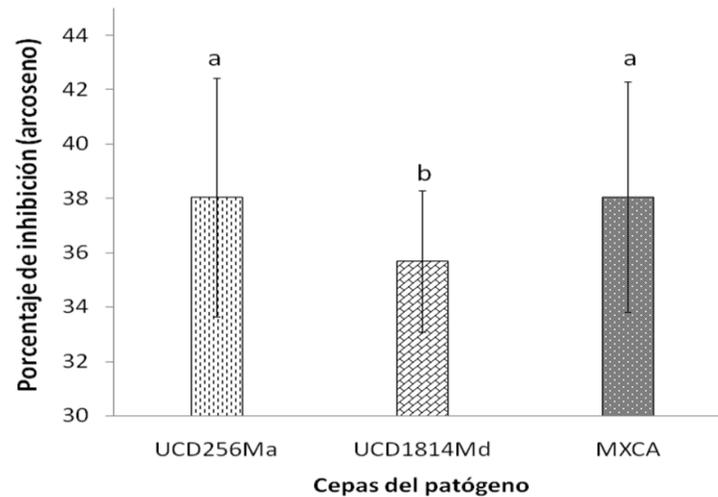


Figura 9. Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del efecto del factor cepa del patógeno sobre el porcentaje de inhibición ejercido por las ocho cepas de *Trichoderma* en las tres cepas del patógeno. Las barras representan la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

4.2. Microscopía de las interacciones de *Trichoderma* spp. y *L. theobromae*

Las cinco cepas de *Trichoderma* spp. analizadas presentaron interacciones microscópicas similares hacia el patógeno, las cuales fueron: deformación, lisis y enrollamiento en las hifas del patógeno (Figura 10).

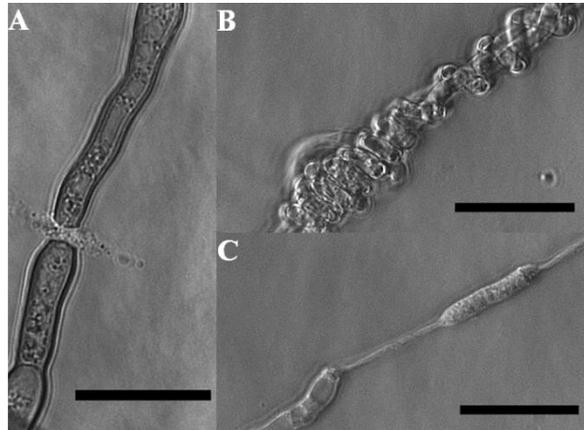


Figura 10. Interacciones microscópicas entre *Trichoderma* spp. y *L. theobromae*. A) Lisis de una hifa de *L. theobromae* cocultivada con *Trichoderma* T3. B) Enrollamiento de *Trichoderma* sp. T6 sobre el patógeno. C) Malformaciones en una hifa de *L. theobromae* en un cultivo dual con la *Trichoderma* sp. T6. Barras= 10µm.

4.3. Caracterización morfológica de *Trichoderma* spp.

Mediante el análisis morfológico se identificó a las trichodermas T6 y a T5 como pertenecientes a la especie *T. koningiopsis*; a las cepas I6 y T3 a la especie *T. harzianum*; y a la T.TORO como *T. atroviride*. Todas las cepas presentaron conidióforos similares, con un eje central, ramificaciones laterales, generalmente en pares y con fiálides verticiladas (Figura 11A-E). Además el crecimiento radial de las cinco cepas, después de 72 horas, fue muy similar en PDA a 28°C, en oscuridad (42-54 mm).

Las características que permitieron identificar a las cepas T5 y T6 como miembros de *T. koningiopsis*, además del tipo de conidióforo, fueron: la producción de conidias ovoidales y lisas (Figura 11A y 11C) y la coloración amarilla de la colonia (Figura 12A-D). La cepa T5

presentó clamidosporas unicelulares, terminales e intercalares (Figura 11F, y 11G), mientras que la cepa T6 careció de estas. Los aislados I6 y T3 se caracterizaron como *T. harzianum*, debido a que produjeron conidias lisas subglobosas a ovoidales (Figura 11B y 11D) y coloración verde (Figura 12E-H). La cepa I6 presentó muy pocas clamidosporas terminales (Figura 11H), mientras que en la cepa T3 no se observaron. La cepa T. TORO se identificó como *T. asperellum*, por la presencia de clamidosporas unicelulares, terminales o intercalares (Figura 11I), conidias ovoidales (Figura 11E) y pigmentación verde (Figura 12I, J).

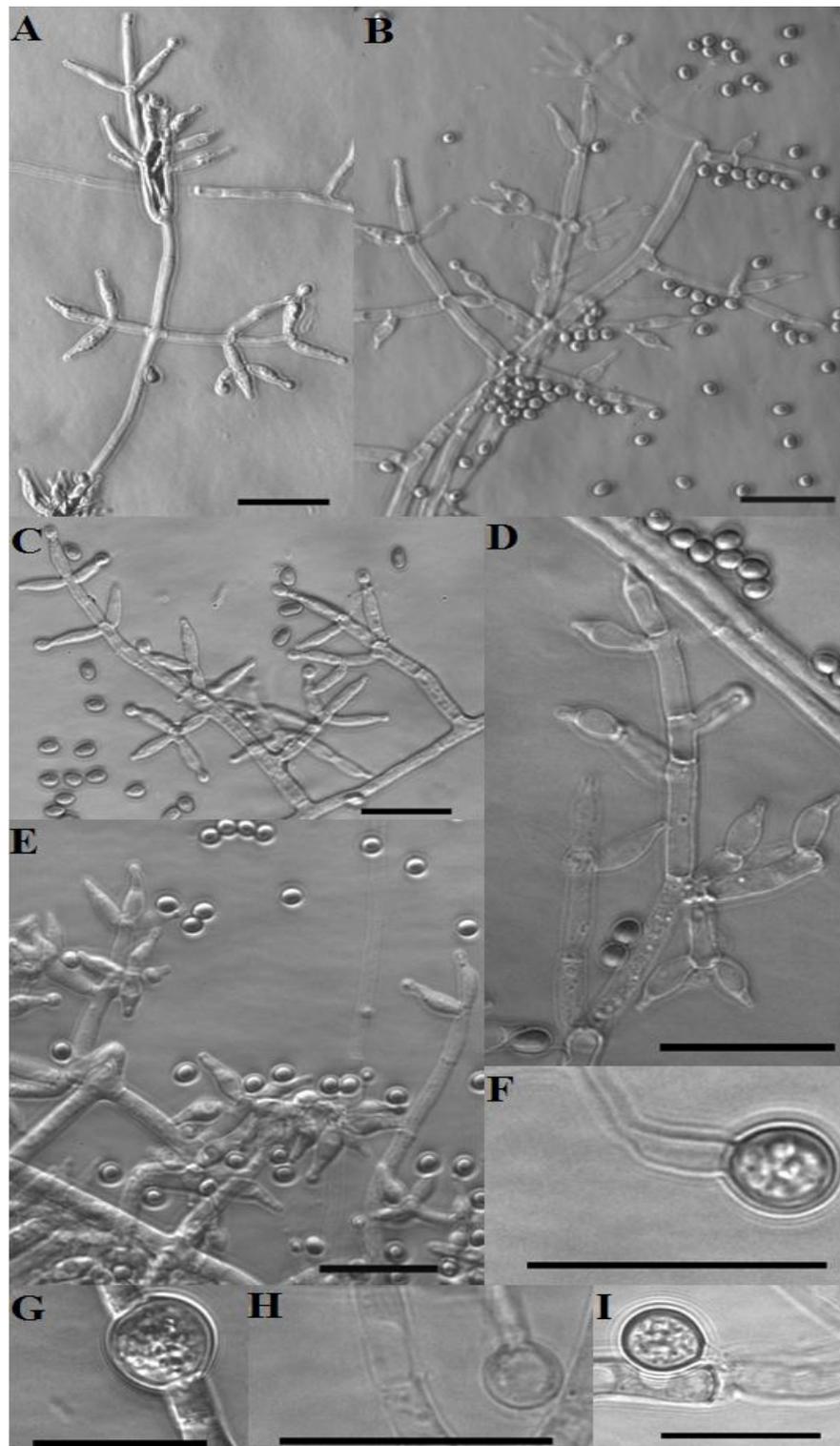


Figura 11. Características microscópicas observadas en las cepas de *Trichoderma* spp. A-E) conidias y codióforos de T5, I6, T6, T3 y T. TORO, respectivamente. F-H) clamidosporas terminales de T5 e I6. G- I) clamidosporas intercalares de T5 y T. TORO, respectivamente. Barra= 10 μ m.

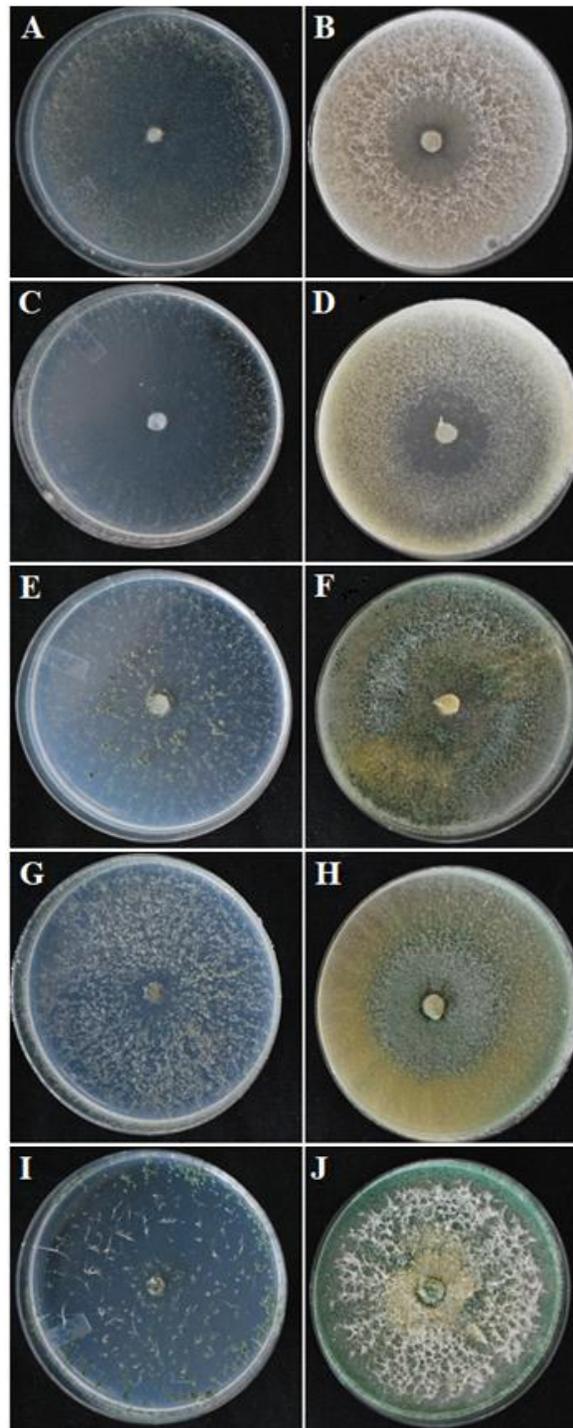


Figura 12. Características morfológicas de aislados de *Trichoderma* spp. A, C, E, G, I) Cepas T6, T5, T3, I6 y T. TORO respectivamente crecidas en medio SNA. B, D, F, H y J) Cepas T6, T5, T3, I6 y T.TORO respectivamente crecidas en medio PDA.

4.4. Identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* spp.

Los resultados del análisis filogenético con la porción del gen *tefl* utilizando el algoritmo del vecino más cercano, mínima evolución y máxima parsimonia arrojaron los mismos resultados. Las cepas T5 y T6 se identificaron como *T. gamsii*; los aislados I6, T3 y T. TWINS correspondieron a la especie *T. harzianum*; la cepa L508 fue identificada como *T. atroviride*; y la T. TORO como *T. asperellum*. En la Figura 13 se muestra el resultado del análisis con el algoritmo del vecino más cercano.

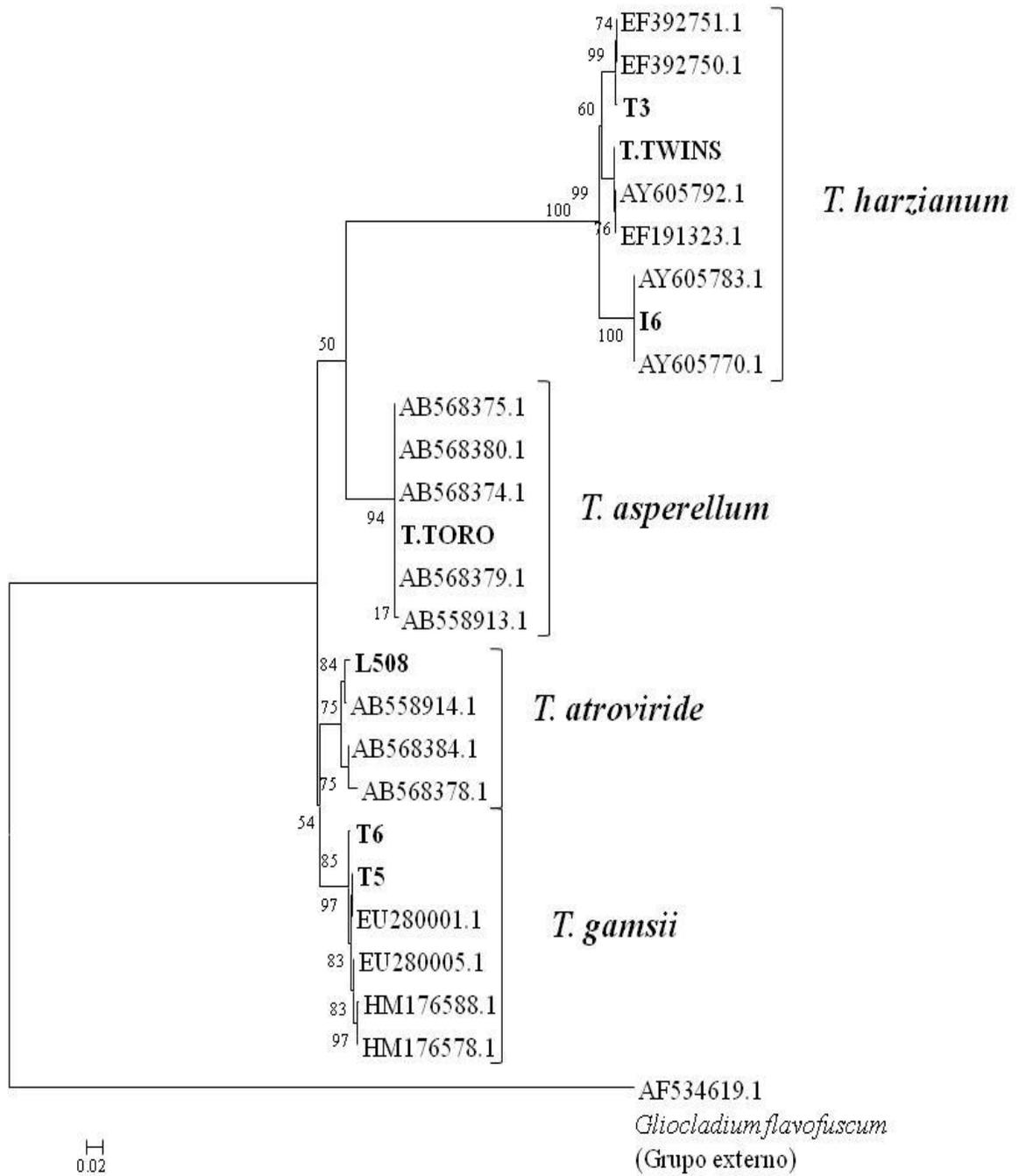


Figura 13. Árbol filogenético consenso del análisis de una porción del gen *tef1* de las cepas de *Trichoderma* spp. analizadas en el presente trabajo (en negritas) y de cepas registradas en el banco de secuencias de NCBI, utilizando el algoritmo del vecino más cercano y 500 réplicas en MEGA 4.0. Como grupo saliente se usó un fragmento de *G. flavofussum*.

4.5. Evaluación *in vitro* de la sensibilidad a fungicidas de *Trichoderma* spp. y *L. theobromae*

En los ensayos con fungicidas, el ácido bórico presentó mayor efecto inhibitorio sobre las *Trichoderma* spp. que sobre el patógeno (Figura 14). A las concentraciones de 5 y 10 mg/ml no hubo crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. y *L. theobromae* presentó una inhibición del 53.6 y 57.3%, respectivamente. La concentración de 2 mg/ml, afectó más a las *Trichoderma* spp., excepto a la cepa I6 (39%), la cual no presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a *L. theobromae* UCD256Ma (34%).

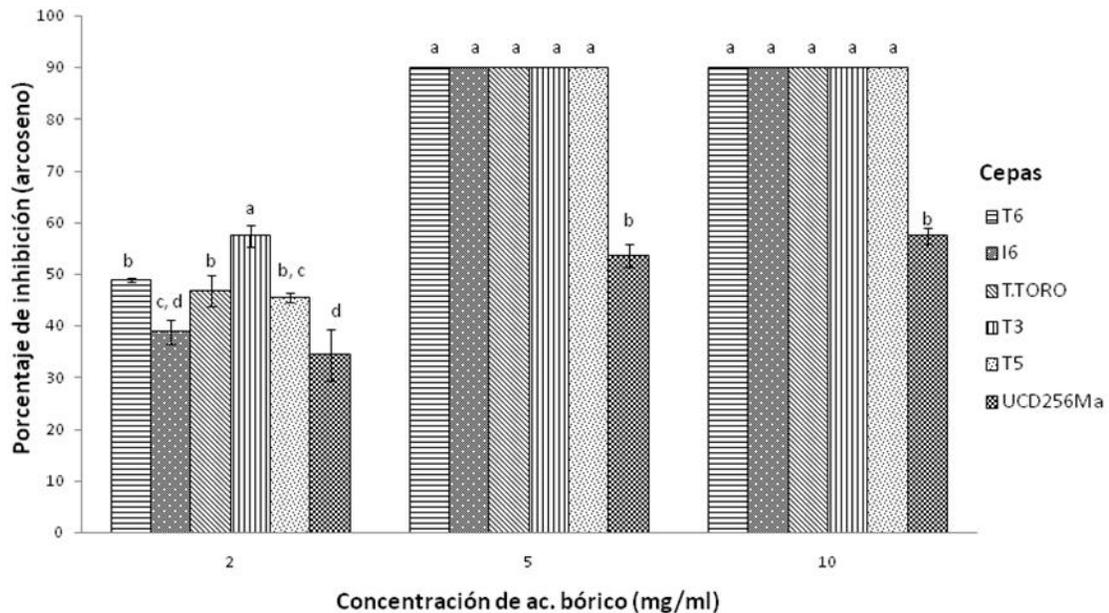


Figura 14 Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del porcentaje de inhibición del crecimiento de *Trichoderma* spp. y de *L. theobromae* UCD256Ma por cada concentración de ácido bórico. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes $p < 0.05$.

La inhibición del crecimiento por el tiofanato de metilo (Figura 15), fue mayor significativamente ($p < 0.05$) en *L. theobromae* que en las cepas de *Trichoderma* spp. La cepa UCD256Ma no creció bajo ninguna concentración de este fungicida y sólo a 7 mg/ml la mayoría de las trichodermas fueron inhibidas totalmente, excepto la cepa T5 (70%). A la concentración de 0.7 mg/ml, la T5 fue la menos inhibida (39.8%) ($p < 0.05$) y las cepas I6 y

T3 fueron las más afectadas ($p<0.05$) con un 69 y 70.8% de inhibición respectivamente; mientras que a la concentración de 0.07 mg/ml la trichoderma que presentó menor porcentaje de inhibición fue la I6 (25%) ($p<0.05$) y la de mayor afectación la T3 (68.3%) ($p<0.05$),

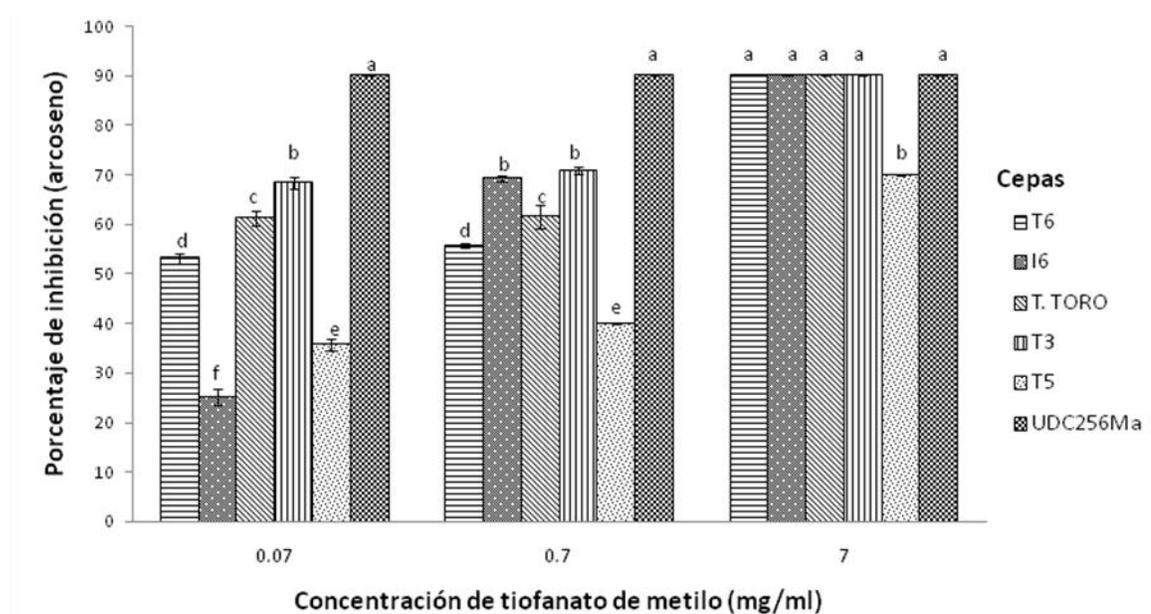


Figura 15. Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del porcentaje de inhibición del crecimiento de *Trichoderma* spp. y de *L. theobromae* UCD256Ma por cada concentración de tiofanato de metilo. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes $p<0.05$.

La inhibición de *L. theobromae* por las tres concentraciones de benomilo fue de alrededor del 70% (Figura 16). Con este fungicida, al igual que con el tiofanato de metilo, las *Trichoderma* spp. fueron menos afectadas que el patógeno. La trichoderma T5 creció de forma similar al control a 0.25 $\mu\text{g/ml}$ y fue la menos inhibida a la concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (30.6%) ($p<0.05$). La trichoderma T. TORO fue la que presentó el menor crecimiento a 0.25 $\mu\text{g/ml}$ con un 40.3% de inhibición ($p<0.05$); mientras que a la concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ la que más se inhibió fue la I6 (57.6%) ($p<0.05$). La trichoderma con menor crecimiento ($p<0.05$) a 0.75 $\mu\text{g/ml}$ fue la T3, con un porcentaje de inhibición del 69.8%, y la menos inhibida ($p<0.05$) fue la T5 con alrededor del 55%.

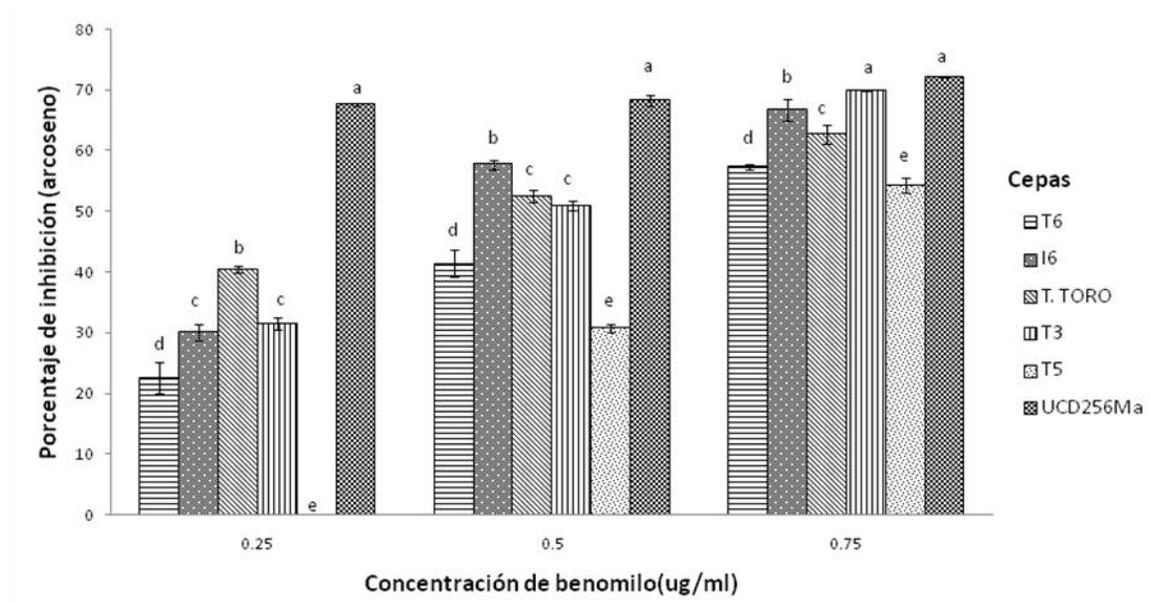


Figura 16. Resultados de la prueba a posteriori de Tukey del porcentaje de inhibición del crecimiento de *Trichoderma* spp. y de *L. theobromae* UCD256Ma por cada concentración de benomilo. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes $p < 0.05$.

4.6. Ensayo en plantas

En base a los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* de competencia ya descrito, para los ensayos en planta, se seleccionó la cepa de *Trichoderma* sp. T6, y el aislado del patógeno UCD256Ma de *L. theobromae*.

4.6.1. Incidencia de *Trichoderma* sp.

Los resultados de la incidencia de *Trichoderma* sp. en las plantas mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 17). La incidencia de T6 fue mayor en los tratamientos de plantas con micorriza-trichoderma (73.8%) y con micorriza-trichoderma-patógeno (72.3%), mientras que la incidencia más baja en los tratamientos inoculados con *Trichoderma* se observó en las plantas con solo trichoderma y trichoderma-patógeno, con porcentajes de 38.28% y 40.1%, respectivamente. No se observó presencia de trichoderma en los tratamientos donde no fue inoculada.

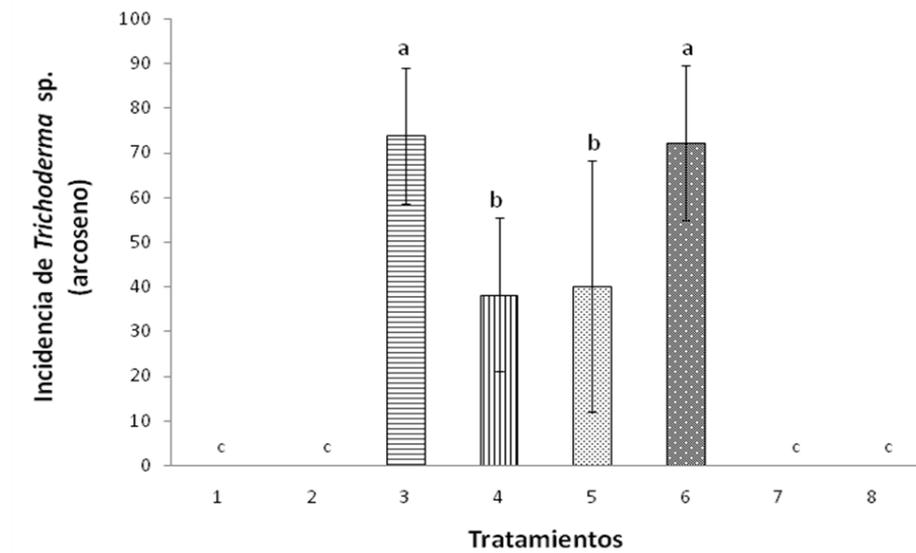


Figura 17. Comparación entre medias de la incidencia de *Trichoderma* sp. entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher. Los tratamientos fueron: 1) micorriza, 2) micorriza+patógeno, 3) micorriza+trichoderma, 4) trichoderma, 5) trichoderma+patógeno, 6) trichoderma+patógeno+micorriza, 7) patógeno y 8) control. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

4.6.2. Porcentaje de micorrización

El porcentaje de micorrización también mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 18). Las plantas que no fueron micorrizadas, estuvieron exentas de estructuras micorrícicas. Los tratamientos que se inocularon con *G. intraradices*, presentaron colonización muy variable entre las réplicas y en la mayoría de los casos esta fue escasa o nula. En las raíces micorrizadas se observaron vesículas, micelio y microesclerocios (Figura 19), pero no arbuscúlos. Las plantas con micorrizas, micorriza-patógeno y micorriza-trichoderma no fueron significativamente diferentes a los tratamientos sin micorrizas. La mayor colonización se observó en las plantas inoculadas con micorriza-trichoderma-patógeno con valores promedio de 30.3%.

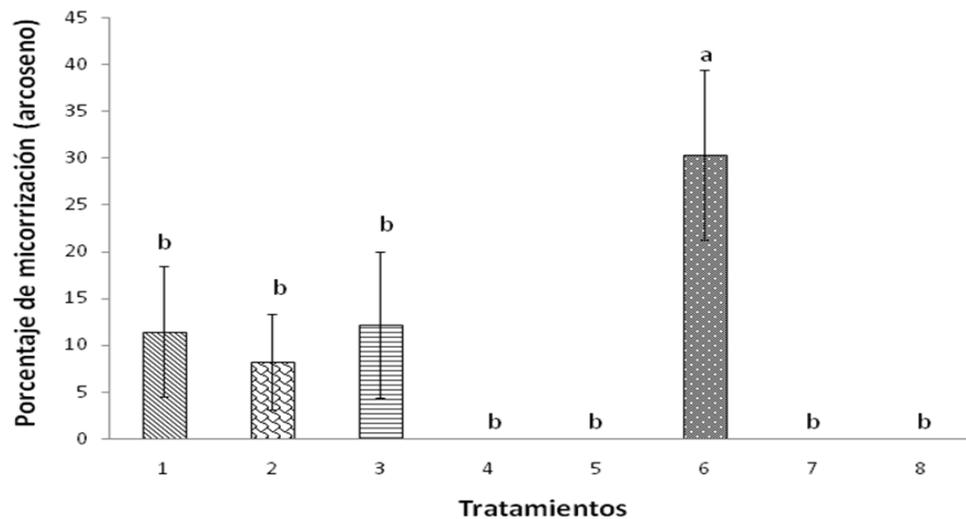


Figura 18. Comparación entre medias del porcentaje de micorrización entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher. Los tratamientos fueron: 1) micorriza, 2) micorriza+patógeno, 3) micorriza+trichoderma, 4) trichoderma, 5) trichoderma+patógeno, 6) trichoderma+patógeno+micorriza, 7) patógeno y 8) control. Las barras indican el error estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

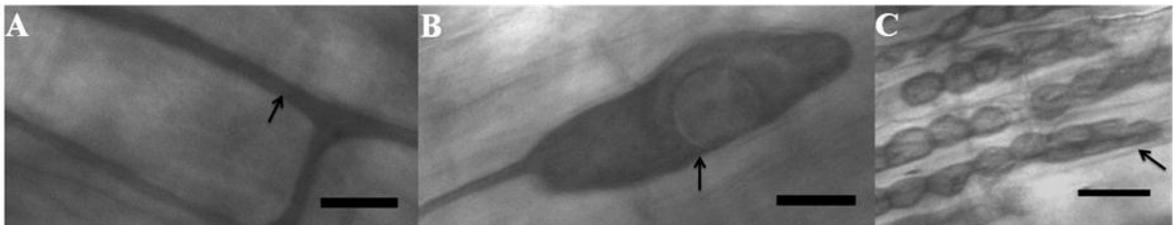


Figura 19. Estructuras micorrícicas observadas en las raíces de las plantas inoculadas con *G. intraradices*. A) Micelio intracelular. B) Vesícula. C) Microesclerocios. Las flechas indican las estructuras micorrícicas. Barras= 20µm.

4.6.3. Incidencia del patógeno

Al analizar los datos de la incidencia del patógeno, el ANOVA arrojó diferencias significativas (Figura 20). El tratamiento con sólo patógeno tuvo el porcentaje más alto de recuperación (57.4%), pero sólo fue significativamente diferente a las plantas sin patógeno (0%) y al tratamiento con micorriza-trichoderma-patógeno, con una incidencia del 23.6%. El tratamiento con micorriza-trichoderma-patógeno, no mostró diferencias con los valores de cero incidencia presentados por las plantas que no fueron inoculadas con el patógeno, ni

con las plantas con trichoderma-patógeno y micorriza-patógeno. No se recuperó a *L. theobromae* de las plantas que no fueron inoculadas.

En un ANOVA donde sólo se incluyeron los tratamientos con patógeno, se encontraron diferencias marginalmente significativas ($p < 0.1$) en la incidencia de *L. theobromae* (Figura 21). Este análisis sólo se corrió con cuatro réplicas, ya que cada tratamiento que fue inoculado con patógeno presentó una réplica con cero incidencia y ésta fue excluida, para disminuir la variabilidad de los datos. En este análisis, el tratamiento con patógeno fue marginalmente diferente al de las plantas con trichoderma-patógeno, obteniéndose 71.7% de incidencia en el primero contra 42.6% del segundo. También se pudo observar una incidencia mayor (61.9%) de *L. theobromae* en el tratamiento micorriza-patógeno, que en las plantas con micorriza-trichoderma-patógeno (29.6%).

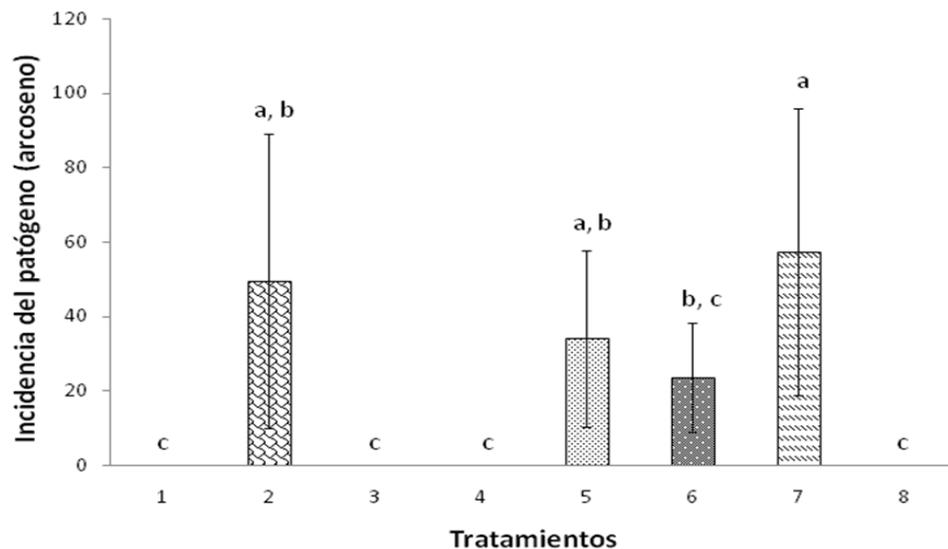


Figura 20. Comparación entre medias de la incidencia del patógeno entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher. Los tratamientos fueron: 1) micorriza, 2) micorriza+patógeno, 3) micorriza+trichoderma, 4) trichoderma, 5) trichoderma+patógeno, 6) trichoderma+patógeno+micorriza, 7) patógeno y 8) control. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

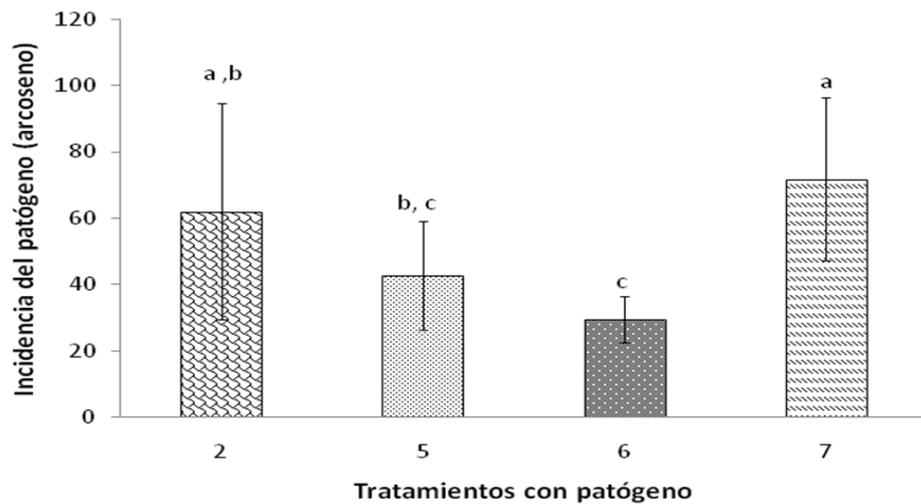


Figura 21. Comparación de la incidencia del patógeno, sólo evaluando los tratamientos con patógeno, con $n=4$, utilizando la prueba a posteriori de Fisher. Los tratamientos fueron: 2) micorriza+patógeno, 5) trichoderma+patógeno, 6) trichoderma+patógeno+micorriza, 7) patógeno. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con distintas letras presentan diferencias marginalmente significativas ($p<0.1$).

4.6.4. Peso seco del tallo y raíces

El peso seco del tallo de las plantas no fue significativamente diferente entre los tratamientos ($p<0.05$), con un promedio general de 24.17 g y una desviación estándar de 4.2. Sin embargo hubo una tendencia en el tratamiento con patógeno de presentar valores más bajos.

Con respecto al peso seco de las raíces, tampoco se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$), pero si hubo diferencias marginalmente significativas ($p<0.1$) en un caso (Figura 22). El tratamiento de plantas con patógeno presentó el valor más bajo (14.5 g), sin embargo no fue marginalmente significativo ($p<0.1$) al de las plantas con sólo micorrizas y micorriza-trichoderma. El mayor peso seco de raíces se observó en el tratamiento con trichoderma-patógeno (22.9 g), pero no fue diferente ($p<0.1$) al de las plantas control, a las plantas con micorriza-patógeno, con solo trichoderma o con micorriza-trichoderma-patógeno. Sólo el tratamiento de las plantas con patógeno, presentó diferencias marginalmente significativas ($p<0.1$) respecto al control (19.5 g).

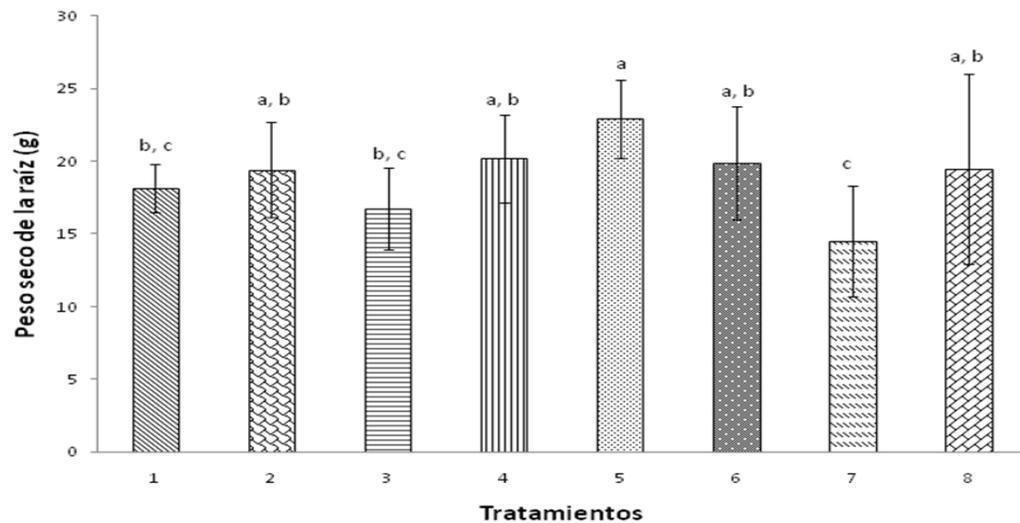


Figura 22. Comparación entre medias del peso seco de la raíz entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher. Los tratamientos fueron: 1) micorriza, 2) micorriza+patógeno, 3) micorriza+trichoderma, 4) trichoderma, 5) trichoderma+patógeno, 6) trichoderma+patógeno+micorriza, 7) patógeno y 8) control. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con distintas letras presentan diferencias marginalmente significativas ($p < 0.1$).

4.6.5. Evaluación del flujo de CO₂, temperatura y humedad del sustrato

En relación a los resultados del flujo de CO₂, la temperatura y la humedad del sustrato, se encontró que la humedad no presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), ni marginalmente significativas ($p < 0.1$) entre los tratamientos. En cambio, la temperatura ($p < 0.05$), fue más alta en las plantas con micorrizas (Figura 23). Para descartar el efecto de la variación de la temperatura en el flujo de CO₂ del sustrato, éste se normalizó a 25°C (Figura 24). Así, los tratamientos que presentaron mayor flujo de CO₂ ($p < 0.05$) fueron las plantas con micorriza-trichoderma ($2.6 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) y de micorriza-trichoderma-patógeno ($2.7 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$); mientras que el tratamiento con menor flujo ($p < 0.05$) fue el de plantas con sólo el patógeno. Por otro lado, al comparar el flujo de CO₂ en las plantas con micorrizas y sin micorrizas (Figura 25), con trichoderma y sin trichoderma (Figura 26), con patógeno y sin patógeno (Figura 27), se observó un flujo mayor ($p < 0.05$) en las plantas micorrizadas y con trichoderma ($p < 0.05$) en relación a las plantas inoculadas con el patógeno.

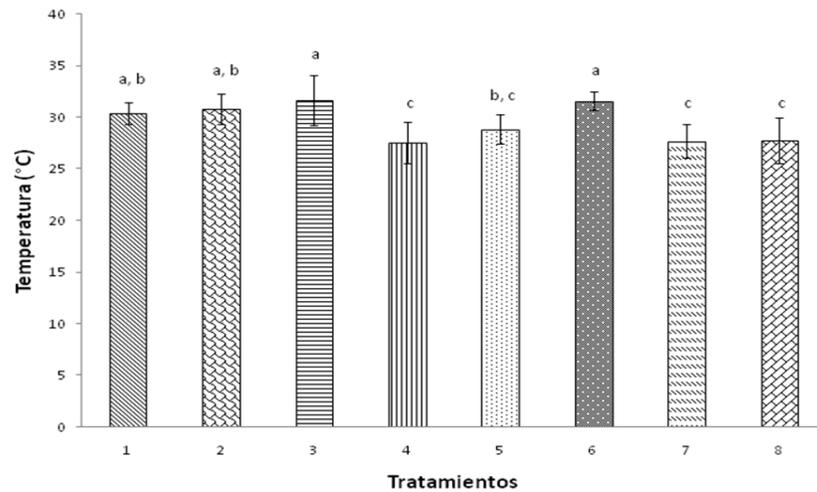


Figura 23. Comparación entre medias de la la temperatura del sustrato. entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher. Los tratamientos fueron: 1) micorriza, 2) micorriza+patógeno, 3) micorriza+trichoderma, 4) trichoderma, 5) trichoderma+patógeno, 6) trichoderma+patógeno+micorriza, 7) patógeno y 8) control. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

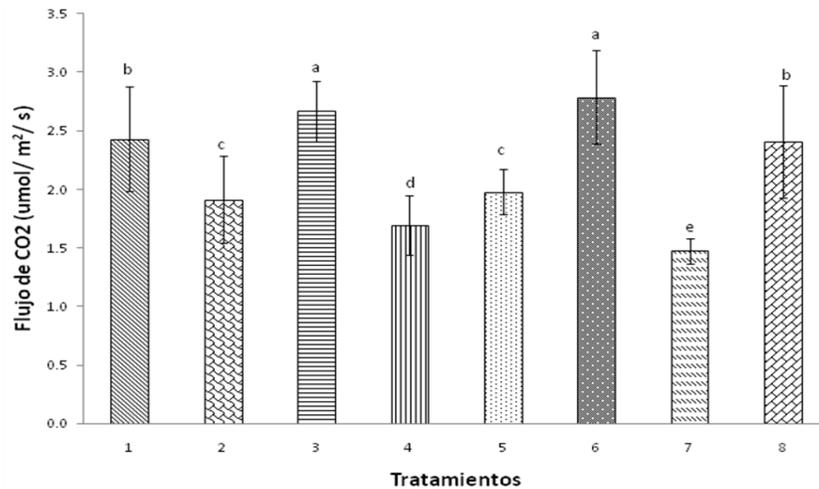


Figura 24. Comparación entre medias del flujo de CO₂ del sustrato. entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher. Los tratamientos fueron: 1) micorriza, 2) micorriza+patógeno, 3) micorriza+trichoderma, 4) trichoderma, 5) trichoderma+patógeno, 6) trichoderma+patógeno+micorriza, 7) patógeno y 8) control. Los datos de la temperatura fueron normalizados a 25°C. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

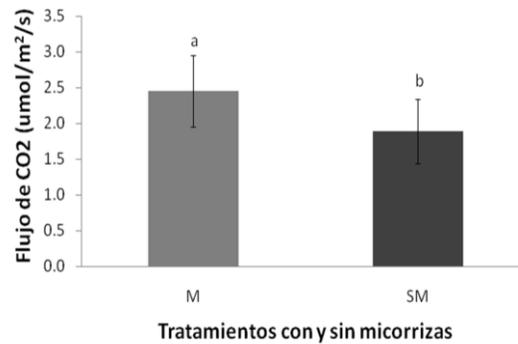


Figura 25. Comparación entre medias del flujo de CO₂ del sustrato en plantas micorrizadas (M) y no micorrizadas (SM) con *G. intraradices*, utilizando la prueba *t*-Student. La temperatura fue normalizada a 25°C. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

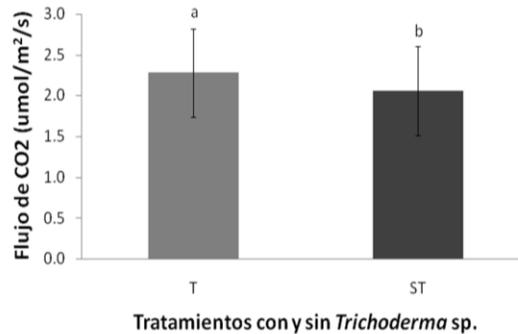


Figura 26. Comparación entre medias del flujo de CO₂ del sustrato en plantas inoculadas (T) y sin inocular (ST) con *T. gamsii* cepa T6, utilizando la prueba *t*-Student. Las barras indican la desviación estándar. Los datos de temperatura fueron normalizados a 25°C. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

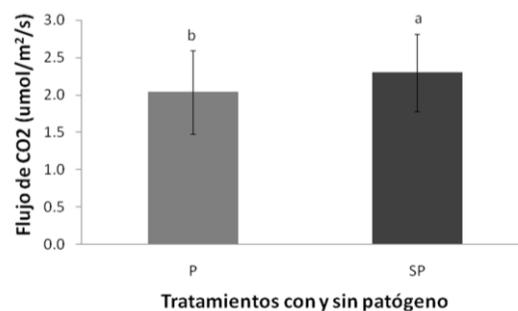


Figura 27 Comparación entre medias del flujo de CO₂ del sustrato en plantas con patógeno (P) y sin él (SP), utilizando la prueba *t*-Student. Las barras indican la desviación estándar. Los datos de temperatura fueron normalizados a 25°C. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

4.6.6. Evaluación de la temperatura ambiental

La temperatura ambiental registrada durante la medición de las variables del sustrato evaluadas cada mes, por tratamiento, no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) (Figura 24). La temperatura promedio fue de 39.5 con una desviación estándar de 5.

4.6.7. Análisis de suelo

Respecto al análisis de suelo al final del experimento y por tratamiento, los datos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de fósforo (Figura 28). El tratamiento con patógeno presentó la mayor concentración (173.7 ppm), pero esta no fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a la de las plantas con trichoderma-patógeno. Los tratamientos más bajos en fósforo fueron los de las plantas con micorrizas (123.3 ppm) y con micorriza-trichoderma (124.4 ppm), sin embargo no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con las plantas inoculadas con micorriza-patógeno, trichoderma, micorriza-trichoderma-patógeno y las plantas control.

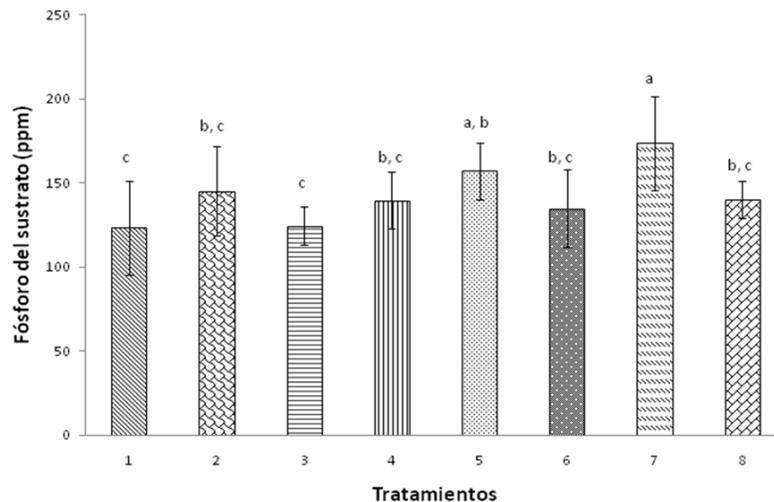


Figura 28. Comparación entre medias del contenido de fósforo en el sustrato entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher. Las barras indican la desviación estándar. Los tratamientos fueron: 1) micorriza, 2) micorriza+patógeno, 3) micorriza+trichoderma, 4) trichoderma, 5) trichoderma+patógeno, 6) trichoderma+patógeno+micorriza, 7) patógeno y 8) control. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El contenido de fósforo también fue diferente ($p < 0.05$) entre plantas con micorrizas y sin micorrizas (Figura 29), de tal manera que las plantas micorrizadas presentaron la concentración más baja de este nutriente (131.98 ppm). Además, el análisis entre plantas con y sin patógeno reveló diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de fósforo (Figura 30), El promedio del contenido de este elemento en todos los tratamientos con patógeno fue mayor (152.7 ppm) que en todos los tratamientos sin patógeno (131.92 ppm) ($p < 0.05$).

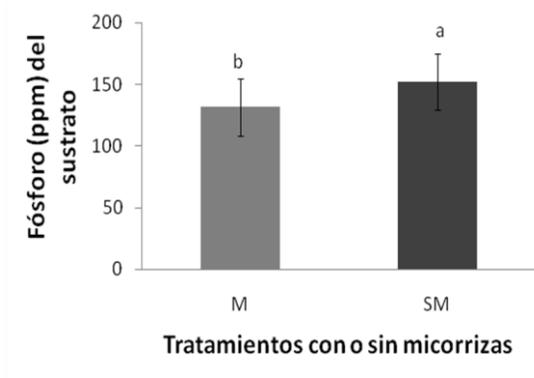


Figura 29. Comparación entre medias del contenido de fósforo en el sustrato de plantas micorrizadas (M) y no micorrizadas (SM) con *G. intraradices*, utilizando la prueba *t*-Student. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

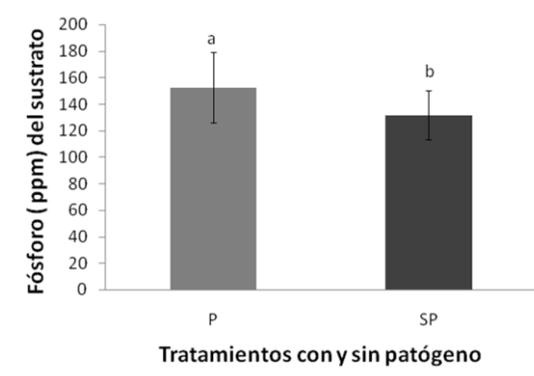


Figura 30. Comparación entre medias del contenido de fósforo en el sustrato de plantas con el patógeno (P) y sin el mismo (SP), utilizando la prueba *t*-Student. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Por otro lado, el contenido más alto de zinc en el sustrato se encontró en las plantas inoculadas con trichoderma-patógeno (7.04 ppm) (Figura 31), pero este no fue

significativamente diferente ($p < 0.05$) al contenido de zinc en los tratamientos con trichoderma, micorriza-trichoderma-patógeno y patógeno. El sustrato que tuvo la concentración más baja fue el de las plantas con micorriza-trichoderma, sin embargo este sólo presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con los tratamientos con trichoderma-patógeno y micorriza-trichoderma-patógeno.

Cuando se compararon las plantas micorrizadas y no micorrizadas (Figura 32), se encontró una menor concentración de zinc en el sustrato en las plantas inoculadas con *G. intraradices* (4.3 ppm) ($p < 0.05$), mientras que las plantas con *L. theobromae* tuvieron una mayor concentración de este nutriente (5.51 ppm) ($p < 0.05$) que las plantas sin patógeno (Figura 33).

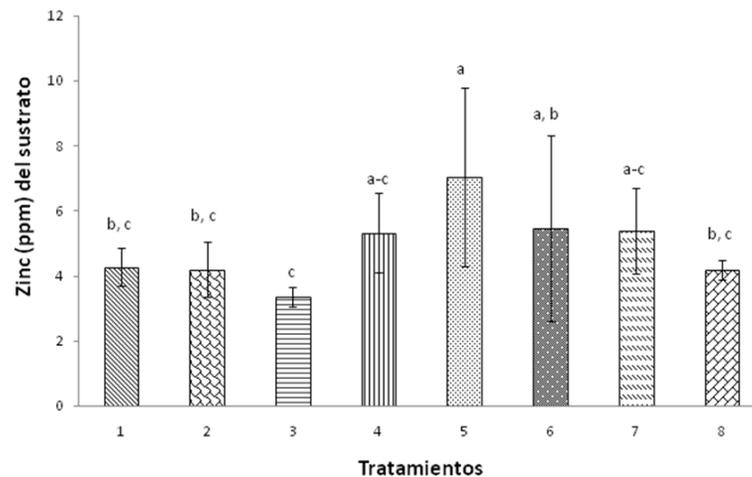


Figura 31. Comparación entre medias del contenido de zinc en el sustrato entre 8 tratamiento en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher. Los tratamientos fueron: 1) micorriza, 2) micorriza+patógeno, 3) micorriza+trichoderma, 4) trichoderma, 5) trichoderma+patógeno, 6) trichoderma+patógeno+micorriza, 7) patógeno y 8) control. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

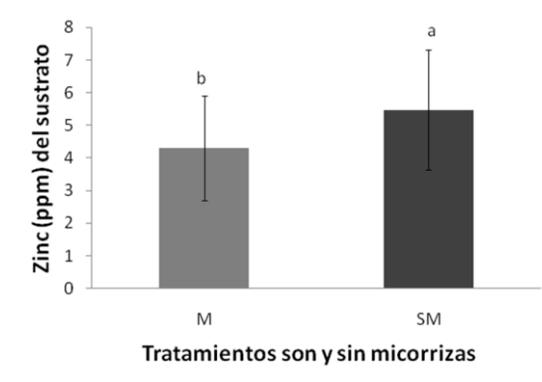


Figura 32. Comparación entre medias del contenido de zinc en el sustrato de plantas micorrizadas (M) y no micorrizadas (SM) con *G. intraradices*, utilizando la prueba *t*-Student. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

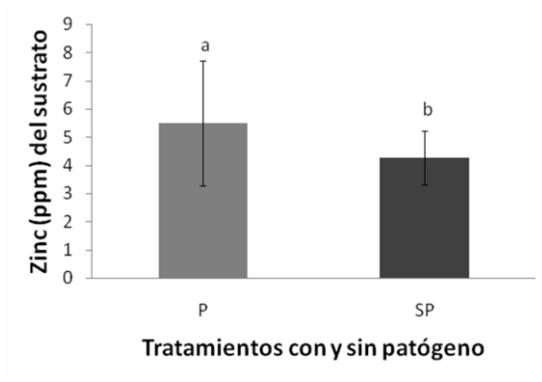


Figura 33. Comparación entre medias del contenido de zinc en el sustrato de plantas con el patógeno (P) y sin el mismo (SP), utilizando la prueba *t*-Student. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la conductividad eléctrica del sustrato de los tratamientos, también se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Figura 34). El sustrato de las plantas inoculadas con trichoderma-patógeno, tuvo la conductividad más alta (6.2 dS/ m), pero no fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a la del control o a la de los tratamientos con patógeno y con trichoderma. Los sustratos con menor conductividad eléctrica fueron los de las plantas inoculadas con micorriza-patógeno, micorriza-trichoderma-patógeno y micorriza-trichoderma con alrededor de 4 dS/m. Estos no fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) al control, ni a las plantas inoculadas con micorrizas.

Los valores de conductividad eléctrica mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la comparación entre plantas con micorrizas y sin micorrizas (Figura 35). La media de esta variable en todos los tratamientos inoculados con *G. intraradices* fue menor (4.1 dS/m) que la media de la misma en todas las plantas sin micorriza (5.6 dS/m).

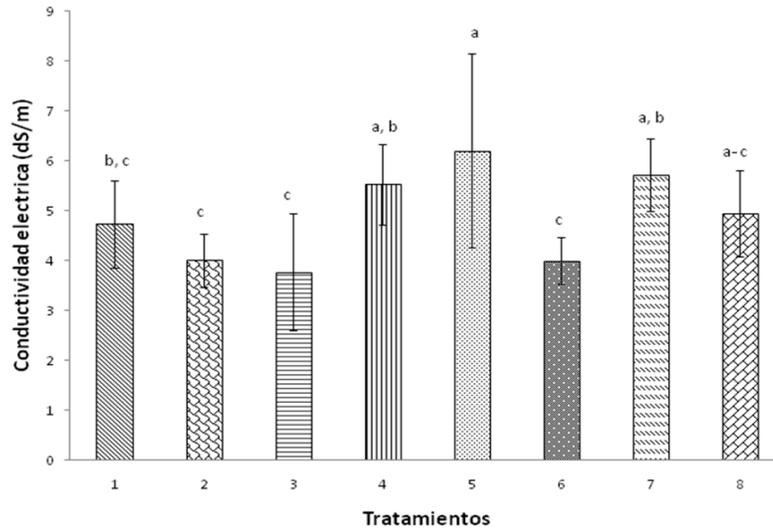


Figura 34. Comparación entre medias de la conductividad eléctrica del sustrato entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher. Los tratamientos fueron: 1) micorriza, 2) micorriza+patógeno, 3) micorriza+trichoderma, 4) trichoderma, 5) trichoderma+patógeno, 6) trichoderma+patógeno+micorriza, 7) patógeno y 8) control. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

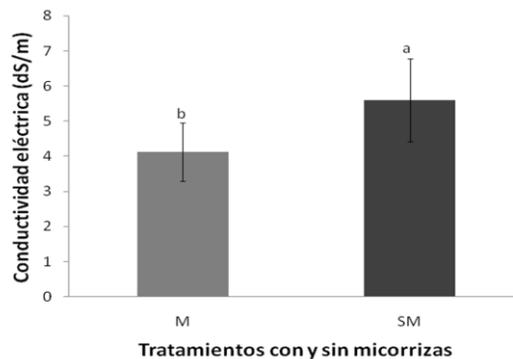


Figura 35. Comparación entre medias de la conductividad eléctrica del suelo de plantas micorrizadas (M) y no micorrizadas (SM) con *G. intraradices*, utilizando la prueba *t*-Student. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Respecto al pH del sustrato de los tratamientos, el valor más alto se encontró en el de las plantas con micorriza-trichoderma (6.5), pero este no fue diferente significativamente ($p < 0.05$) al de los tratamientos micorriza-patógeno, micorriza y micorriza-trichoderma-patógeno (Figura 36). El pH más bajo se encontró en las plantas control y en las inoculadas con el patógeno, con valores de 6.1 y 6 respectivamente. Sin embargo, estas no fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) a los tratamientos con trichoderma y trichoderma-patógeno. Además, al analizar los tratamientos con y sin micorrizas, se obtuvo que las plantas micorrizadas presentaron un pH más alto (6.4) ($p < 0.05$) que las no micorrizadas (6.1) (Figura 37).

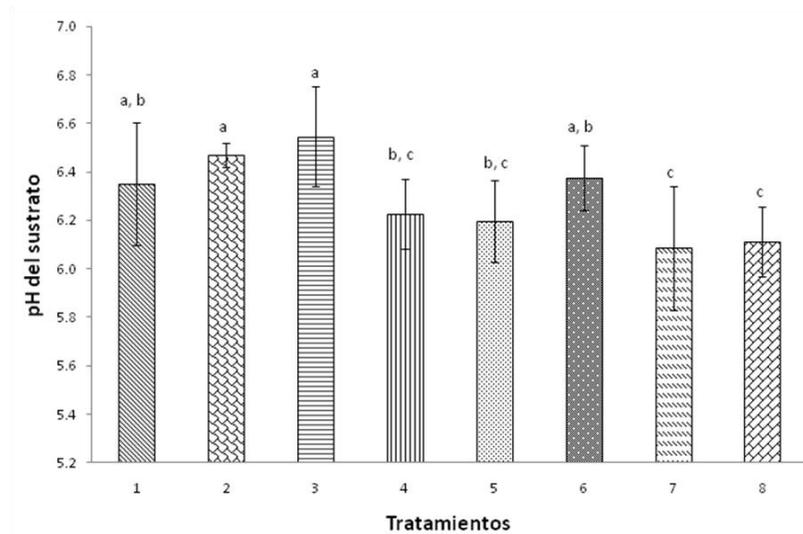


Figura 36. Comparación entre medias del pH del sustrato entre 8 tratamientos en plantas de vid, utilizando la prueba a posteriori de Fisher. Los tratamientos fueron: 1) micorriza, 2) micorriza+patógeno, 3) micorriza+trichoderma, 4) trichoderma, 5) trichoderma+patógeno, 6) trichoderma+patógeno+micorriza, 7) patógeno y 8) control. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

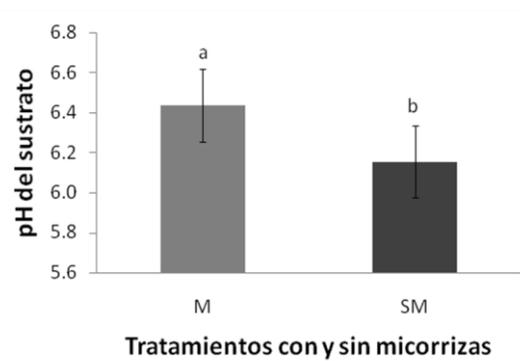


Figura 37. Comparación entre medias del pH del sustrato en plantas micorrizadas (M) y no micorrizadas (SM) con *G. intraradices*, utilizando la prueba *t*-Student. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

4.6.8. Correlación lineal entre las variables

La incidencia de *Trichoderma* sp., el peso seco del tallo y de la raíz no presentaron correlación lineal entre sí, ni con las otras variables analizadas (Tabla 5). El coeficiente de correlación mayor se encontró en la interacción entre temperatura y pH del sustrato, ya que conforme aumentó la temperatura, también se incrementó el valor de pH (Figura 42).

Tabla 5. Matriz de correlación^a entre las variables medidas en los tratamientos en planta.

Variables ^b	Tallo	Raíz	CO ₂	Mico	Tricho	Pat	Temp	P	Zn	Cond	pH
Tallo	1.00	0.27	-0.19	0.00	-0.37	0.28	0.24	-0.09	-0.21	-0.33	0.40
Raíz	0.27	1.00	0.12	-0.01	0.21	-0.16	-0.03	-0.12	0.53	0.24	-0.03
CO ₂	-0.19	0.12	1.00	0.73	0.51	-0.56	0.70	-0.78	-0.41	-0.68	0.54
Mico	0.00	-0.01	0.73	1.00	0.56	-0.09	0.82	-0.51	-0.18	-0.72	0.61
Tricho	-0.37	0.21	0.51	0.56	1.00	-0.28	0.50	-0.36	0.11	-0.31	0.47
Pat	0.28	-0.16	-0.56	-0.09	-0.28	1.00	-0.06	0.80	0.41	0.21	-0.18

^a Sólo los coeficientes en negritas son significativos ($p < 0.05$).

^b Tallo: peso seco del tallo; raíz: peso seco de la raíz; CO₂= flujo de CO₂ ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) del sustrato; Mico: porcentaje de micorrización; Tricho: incidencia de *Trichoderma* sp.; Pat: incidencia de *L. theobromae*; Temp: temperatura ($^{\circ}\text{C}$) del sustrato ; P= contenido de fósforo (ppm) del sustrato; Zn: contenido de zinc (ppm) del sustrato; Cond: conductividad eléctrica (dS/m) del suelo; pH: pH del sustrato del patógeno.

El análisis de correlación entre la incidencia del *Trichoderma* sp. y las demás variables, analizando sólo los datos de los tratamientos con *Trichoderma* sp., dió como resultado una correlación significativamente ($p < 0.05$) positiva con el flujo de CO_2 , (Figura 38).

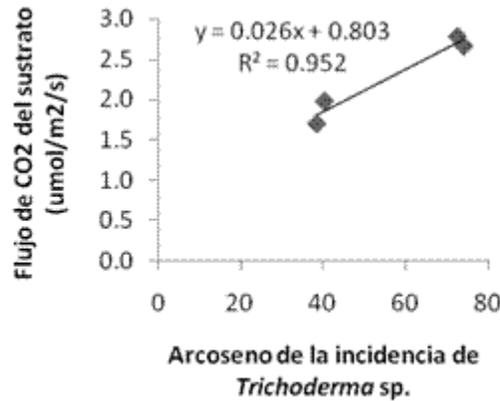


Figura 38. Correlación entre la incidencia de *Trichoderma* sp. y el flujo de CO_2 del sustrato, de los tratamientos inoculados éste antagonista ($p < 0.05$).

Por otro lado, con el análisis de correlación con los datos de los tratamientos inoculados con *G. intraradices*, no se obtuvo ningún resultado significativo ($p < 0.05$) entre el porcentaje de micorrización y las demás variables. En cambio, en el análisis de correlación realizado solamente con los tratamientos con patógeno, la incidencia de *L. theobromae* tuvo una correlación significativamente ($p < 0.05$) negativa con la incidencia de *Trichoderma* sp. (Figura 39).

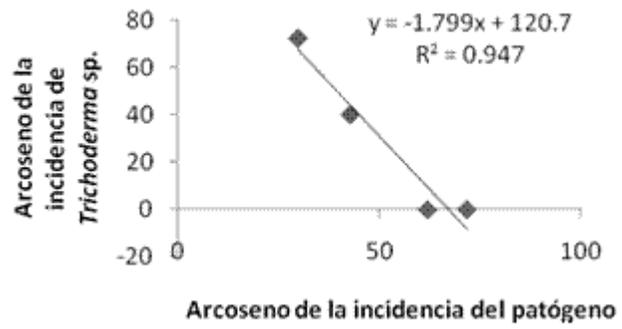


Figura 39. Correlación entre la incidencia del patógeno y la de *Trichoderma* sp., de los tratamientos inoculados con *L. theobromae* ($p < 0.05$).

5. Discusión

En el presente trabajo, las ocho cepas nativas de *Trichoderma* spp. analizadas presentaron antagonismo sobre las tres cepas de *L. theobromae*. Se encontraron algunas diferencias significativas ($p < 0.05$) del porcentaje de inhibición de cada cepa de *Trichoderma* spp. sobre las cepas del patógeno (Figura 7). Las diferencias encontradas, pueden deberse al distinto grado de compatibilidad de las cepas de *Trichoderma* sp. con el patógeno y a la producción y cantidad de enzimas hidrolíticas u otros compuestos producidos por ellas. Existen evidencias de que la especificidad de *Trichoderma* spp. puede variar de un hospedero a otro, debido a la presencia de carbohidratos en la pared del antagonista y al reconocimiento de los mismos por lectinas en los patógenos (Barak et al., 1985; Chet y Inbar, 1994). También se ha visto, que la variación del efecto antagonista de *Trichoderma* spp. sobre fitopatógenos, depende de la capacidad de producir compuestos volátiles y no volátiles entre distintas cepas de los antagonistas. Por ejemplo, Mishra (2010), evaluó en ensayos *in vitro* la producción de enzimas líticas (proteasas, glucanasas y celulasas), en diez cepas de *Trichoderma* spp. y su capacidad antagonista sobre el fitopatógeno, *Pythium aphanidermatum* y observó que una cepa de *T. viride* fue la que presentó el mayor efecto inhibitorio, lo cual fue atribuido a que este aislado expresó mayor cantidad enzimas líticas.

Dado que se observaron pocas diferencias en las interacciones a nivel microscópico entre las cepas de *Trichoderma* y *L. theobromae* (Figura 10), es muy probable que las cepas de *Trichoderma* spp. actúen de forma parecida sobre el patógeno. Las interacciones observadas fueron muy similares a las reportadas por Kotze et al. (2011), quienes analizaron el efecto antagonista de *Trichoderma* spp. en hongos patógenos de la madera de vid. El enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno se ha reportado como una evidencia de micoparasitismo (Elad et al., 1983); mientras que la deformación y lisis del patógeno puede deberse a la producción de enzimas líticas (Elad et al., 1983; Flores et al., 1997) y antibióticos (Vey et al., 2001).

Los resultados de la identificación morfológica de las cepas de *Trichoderma* spp. concordaron, en su mayoría con la identificación molecular, excepto para las cepas T6 y T5. Estas cepas fueron identificadas morfológicamente como *T. koningiopsis*, debido a la coloración amarillo pálido de la colonia (Samuels et al., 2012), pero el análisis molecular las identificó como *T. gamsii* (Figura 13). La discrepancia en los resultados de los análisis, se debe a que existen muy pocas características morfológicas para distinguir entre el gran número de especies dentro del género, y este tipo de identificación suele ser algo confuso, por lo cual es importante complementarlo con la identificación molecular (Samuels, 2006). *T. gamsii* es una especie relativamente nueva, se encuentra filogenéticamente relacionada a *T. viride* (Jaklitsch et al., 2006) y ha mostrado ser efectiva para controlar al hongo *R. solani* (Anees et al., 2010). El único reporte que existe de su uso, es el de Plata-Caudillo (2010) quién evaluó en ensayos *in vitro* el efecto inhibitorio de cepas de *T. gamsii* sobre agentes causales de enfermedades fúngicas de la madera de vid, entre ellos *L. theobromae*. Las cepas que usó fueron las mismas utilizadas en este trabajo. *T. gamsii* T6, se ha reportado que produce compuestos volátiles y no volátiles con efecto inhibitorio sobre diferentes hongos patógenos de la madera de vid (Plata-Caudillo, 2010).

Además de *T. gamsii*, también se identificaron las especies: *T. asperellum* (T. TORO), *T. harzianum* (I6, T3 y T. TWINS) y *T. atroviride* (L508). Varias cepas de *T. harzianum* y *T. atroviride*, ya se han evaluado para el control de hongos patógenos de la madera de vid, (Fourie y Halleen, 2006; Halleen et al., 2010; Plata-Caudillo, 2010; Kotze et al., 2011; Mutawila et al., 2011), mientras que de *T. asperellum*, no se encontraron reportes, sin embargo, se ha evaluado su efectividad contra patógenos de la rizosfera, tales como *F. oxysporum* (Cotxarrera et al., 2002) y *R. solani* (Trillas et al., 2006). Aunque para los ensayos en planta sólo se utilizó la cepa *T. gamsii* T6, sería importante evaluar las otras cepas de trichoderma; ya que se ha visto que la inducción del sistema de defensa de la planta puede ser un mecanismo más importante que el micoparasitismo o la producción de antibiosis, para combatir a los fitopatógenos (Howell et al., 2000).

La obtención de cepas mutantes de *Trichoderma* spp. para ser utilizadas en combinación con fungicidas en el control de fitopatógenos, ha sido reportado en algunos trabajos (Papaviza et al., 1982; Fahmi et al., 2012); sin embargo, la evaluación de la tolerancia a fungicidas de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sin modificaciones genéticas es necesaria, para seleccionar agentes químicos con menor impacto en la microflora indígena benéfica de los cultivos (Malathi et al., 2002). Los ensayos con fungicidas mostraron que las cepas de *Trichoderma* spp. fueron más susceptibles al ácido bórico que *L. theobromae* (Figura 14). Rolshausen et al. (2010), lo aplicaron en forma de pasta en heridas de poda a la concentración de 5% y observaron un efecto inhibitorio sobre *Botryosphaeria* spp. entre 48 y 79%, aunque esto, puede no ser válido para los ensayos *in vitro*, las concentraciones usadas aquí fueron mucho más bajas e inhibieron a las trichodermas. Respecto al efecto de la combinación del ácido bórico y *Trichoderma*, sobre hongos patógenos de la madera de vid, no se encontraron trabajos previos, sin embargo; existen reportes que sugieren el uso de dicha combinación es adecuado para el control de fitopatógenos de la rizosfera. Por ejemplo, Khandaker et al. (2010) mediante el análisis de resultados de ensayos *in vitro*, propusieron que el uso del ácido bórico a una concentración de 100 ppm a la par con *T. harzianum*, podría ser efectiva para el control de *R. solani* en plantas de papa. Esta concentración es más baja que la evaluada en el presente trabajo, por lo que es probable que no funcione para inhibir a *L. theobromae*. Por todo lo anterior, se descarta el uso combinado de las cepas de *Trichoderma* spp. analizadas aquí y el ácido bórico para el control de *L. theobromae*.

En cuanto al efecto inhibitorio del tiofanato de metilo y benomilo, en las concentraciones más bajas, fue mayor sobre las cepas del patógeno que para las *Trichoderma* spp. (Figuras 15 y 16). Los efectos similares observados de estos fungicidas, pueden deberse a que ambos se descomponen en carbendazim, cuya forma de acción es por la unión a los microtúbulos celulares (WHO, 1994). Amponsah et al. (2012) observaron que, una concentración aproximada de 1 mg/L de tiofanato de metilo, inhibió el 50% del crecimiento de especies de la familia Botryosphaeriaceae. Además, se ha visto que la aplicación del tiofanato de metilo a bajas concentraciones combinado con *Trichoderma* spp. ayuda a reducir la

incidencia de fitopatógenos. Por ejemplo, Malathi et al. (2002), observaron en ensayos *in vitro*, que la aplicación de 1 ppm de tiofanato de metilo en conjunto con cepas de *Trichoderma* spp., aumentó la supresión de *C. falcatum*, un hongo patógeno que afecta a la caña de azúcar. Se recomienda hacer ensayos a concentraciones menores de este fungicida para obtener la mínima dosis necesaria que inhiba el crecimiento de *L. theobromae*. El efecto inhibitorio del benomilo sobre *L. theobromae*, fue evaluado anteriormente, Bester et al. (2007), observaron en ensayos *in vitro* que el 90% del crecimiento del patógeno se inhibió con 1.4 µg/ml de benomilo. En el presente trabajo, usando condiciones similares, se obtuvo la misma inhibición usando menor cantidad del fungicida (0.25 µg IA/ml). Las discrepancias encontradas pueden deberse a las diferentes cepas utilizadas en el presente trabajo. Debido a que la cepa T5, correspondiente a la especie *T. gamsii*, fue la que presentó menor susceptibilidad tanto al tiofanato de metilo como al benomilo; ésta se considera un buen candidato para el uso combinado de control biológico con estos fungicidas.

En trabajos previos, se ha observado un efecto sinérgico al combinar *Trichoderma* spp. con micorrizas (Martínez-Medina et al., 2011; Mwangi et al., 2011). Este efecto, se ha atribuido a la estimulación de exudados en el sistema radical, por parte de la *Trichoderma*, que favorecen el establecimiento de la micorriza o viceversa (Fracchia et al., 1998; De Jaeger et al., 2011). Por otro lado también se han reportado efectos antagonistas; lo cual puede ser generado por diferentes tipos de interacciones, ya sea porque la *Trichoderma* sp. micoparasite a la micorriza (Rousseau et al., 1996), que exista una competencia por nutrientes entre los dos hongos (Green et al., 1999), o que los exudados en las raíces estimulados por uno hongo inhiban al otro (McAllister et al., 1994; Martínez et al., 2004). En este trabajo, la incidencia de T6 se vió favorecida por la presencia de *G. intraradices* (Figura 17); por lo cual parece haber un sinergismo entre ambos hongos, además; los tratamientos que tuvieron mayor flujo de CO₂ en el sustrato fueron los de las plantas inoculadas con micorriza-T6 y micorriza-T6-patógeno (Figura 24), y la incidencia del patógeno fue menor en las plantas inoculadas con micorriza-T6, comparadas con las de sólo patógeno (Figura 20). El aumento del flujo de CO₂ en el sustrato de las plantas inoculadas con *Trichoderma*, pudo haber estimulado la micorrización y por lo tanto, incrementado la

respiración en el suelo, como se observó en los tratamientos con *G. intraradices*-T6 (Figura 24). El CO₂ constituye una fuente de carbono para estos hongos y por lo tanto estimula la micorrización (Bécard y Piché, 1989), lo cual pudo contribuir al efecto sinérgico.

El efecto sinérgico no fue apoyado con los resultados del porcentaje de micorrización, debido a la alta desviación estándar presente en la mayoría de los tratamientos, ya que se encontró una incidencia de *G. intraradices* muy variable y no fue significativa ($p < 0.05$) a la de los tratamientos sin micorrizas (Figura 18). La poca incidencia de *G. intraradices* en las plantas inoculadas, probablemente fue ocasionada por la pérdida de las hojas de las plantas y la gran cantidad de fósforo encontrada en todos los tratamientos (Figura 28). Aunque, se utilizó una fórmula de fertilización con el contenido de fósforo reducido al 25%, la frecuencia de fertilización fue muy alta, ya que los primeros tres meses del experimento se fertilizó cada semana y después se incrementó a cada tercer día. Se sabe que el fósforo a concentraciones altas puede impedir o reducir la micorrización, lo cual se debe, a que este nutriente disminuye la permeabilidad de las células de las raíces y por lo tanto la fuente de alimento de las micorrizas (Graham et al., 1981).

Los flujos de CO₂ del sustrato obtenidos en los ensayos en planta, aumentaron en presencia de *G. intraradices* (Figura 25) y T6 (Figura 26), y disminuyeron en presencia de *L. theobromae* (Figura 27). Además hubo una correlación positiva entre el porcentaje de micorrización y la incidencia de la cepa T6 con el flujo de CO₂ (Tabla 5 y Figura 38). Peng et al. (1993), reportaron una mayor respiración en el sustrato de árboles de limón inoculados con *G. intraradices*, y sugirieron que este aumento se debe al costo energético de la acumulación de lípidos en las raíces micorrizadas y al incremento de masa radical de las mismas. El incremento de CO₂ en plantas inoculadas con T6, pudo ser resultado de la estimulación del crecimiento de las raíces por trichoderma (Windham et al., 1986; Lo y Lin, 2002; Chacón et al., 2007; Mwangi et al., 2011; Salas-Marina et al., 2011). Por otro lado, la disminución del flujo de CO₂ en las plantas inoculadas con el patógeno, pudo deberse al poco desarrollo del sistema radicular debido al estrés inducido por *L.*

theobromae en la parte aérea, que se reflejó en una tendencia de valores de peso seco de las raíces más bajos en este tratamiento (Figura 22).

Debido a los resultados del flujo de CO₂ y la disminución de la incidencia del patógeno en las plantas de los tratamientos con micorrizas, puede que las raíces estuvieran micorrizadas los primeros tres meses del experimento, cuando la fertilización no fue tan frecuente y que al final del experimento, después de que las plantas se quedaron sin hojas, las raíces perdieron casi todas las estructuras micorrícicas. La temperatura del sustrato también pudo haber influenciado los resultados del porcentaje de micorrización, Heinemeyer y Fitter (2004), observaron que el aumento de la temperatura estimula la micorrización y en el presente trabajo, esta variable presentó correlación positiva con la incidencia de *G. intraradices* (Tabla 5).

La micorrización por sí sola no disminuyó la incidencia del patógeno (Figura 20); debido a que *G. intraradices* y *L. theobromae* no compartieron el mismo espacio en la planta, no pudo haber competencia por espacio y nutrientes, mecanismo reportado como importante para el control biológico por micorrizas (Davies y Menge, 1980; Akhtar y Siddiqui, 2008). Adicionalmente, el lapso de tres semanas entre la inoculación de *G. intraradices* y la de *L. theobromae*, posiblemente no fue suficiente para que la micorriza se estableciera en las raíces, ya que se ha observado un mayor efecto biocontrolador de las micorrizas hacia los patógenos, cuando estas ya están bien establecidas en las plantas (Krishna et al., 2010).

En cuanto al efecto inhibitorio sobre el patógeno por *T. gamsii* T6, éste no fue significativo ($p < 0.05$) (Figura 20), lo cual pudo deberse a que la trichoderma fue inoculada siete días antes que *L. theobromae*. Se ha observado un mejor control biológico por cepas de *Trichoderma* cuando son inoculadas 14 días antes del patógeno (John et al., 2005), a pesar de esto, se obtuvo una disminución marginalmente significativa ($p < 0.1$) de *L. theobromae* en presencia T6 (Figura 21) y se observó una correlación negativa (Figura 39) entre ellos.

La incidencia de *T. gamsii* T6 en plantas (entre 38 a 73.8%), fue más alta a la reportada anteriormente para otras cepas de *Trichoderma* spp., por ejemplo Kotze et al. (2011) obtuvieron una incidencia entre 6.4 a 33.4%. Estas diferencias pueden deberse al distinto tiempo incubación de los tratamientos con las trichodermas; ya que se ha visto que la incidencia de *Trichoderma* spp. disminuye con el tiempo (Di Marco et al., 2004). Kotze et al. (2011) utilizaron un periodo de ocho meses, mientras que en el presente trabajo el experimento tuvo una duración de cuatro meses. Por otro lado, estos autores no transformaron la incidencia en arcoseno, inocularon a las *Trichoderma* spp. en cultivares diferentes y el ensayo fue en campo y no en invernadero como fue nuestro caso. En otros trabajos se ha visto que la incidencia de las *Trichoderma* spp. puede variar de un cultivar a otro (Mutawila et al., 2011), por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio parecen sugerir que existe compatibilidad entre el cultivar de vid utilizado (Cabernet Sauvignon), con la cepa nativa T6 de *T. gamsii*.

Se ha observado que las micorrizas y *Trichoderma* spp. estimulan el desarrollo vegetal, debido al incremento de la absorción de nutrientes y, en algunos casos a la producción de hormonas de crecimiento vegetal (Barea y Azcón-Aguilar, 1982; Smith, 1988; Altamore et al., 1999; Augé, 2001; Salas-Marina et al., 2011). En el presente trabajo, no se observaron diferencias significativas en el peso seco del tallo y sólo, en las plantas inoculadas con *L. theobromae* se registraron valores más bajos, no significativos ($p < 0.05$). En el caso del peso seco de las raíces, sólo se observaron diferencias marginalmente significativas ($p < 0.1$), en donde el tratamiento con patógeno fue el que mostró menor valor respecto al control (Figura 22). Esto, podría atribuirse a un efecto negativo ocasionado por el patógeno.

Aunque los tratamientos con micorriza-T6-patógeno, T6-patógeno y micorriza-patógeno, no presentaron diferencias en el peso seco, respecto al control, si mostraron una tendencia a disminuir el efecto dañino del patógeno reflejado en el peso seco de las plantas. Debido a que las plantas perdieron las hojas un mes antes de ser analizadas, seguramente se afectaron los resultados. La carencia de hojas pudo haber disminuido el aporte de carbono a las micorrizas en las raíces y posiblemente con esto se redujo su biomasa, por lo que al final

del experimento no se pudo apreciar el incremento de raíces generado por las micorrizas. Además, si hubieran habido hojas, probablemente los resultados del peso seco de la parte aérea, mostrarían diferencias significativas.

El sustrato de las plantas sin micorrizas (Figuras 29 y 32) mostró un mayor contenido de fósforo y zinc, lo cual podría deberse a que las plantas micorrizadas tienen mayor capacidad de asimilarlos (Smith, 1988; Pacovsky et al., 1986). El aumento del fósforo y zinc en plantas con patógeno (Figura 30 y 33), la correlación positiva entre el contenido de fósforo y la incidencia de *L. theobromae* (Tabla 5), puede deberse a la disminución de la capacidad de absorción de las raíces ocasionada indirectamente por *L. theobromae*, lo que a su vez pudo haber disminuido el peso seco de las raíces.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de fósforo ($p < 0.05$) entre las plantas con micorriza y el control (Figura 28), por lo cual, la presencia de *G. intraradices* no parece haber provocado un aumento de la capacidad de absorción de fósforo por las raíces. Por otro lado, las plantas con *G. intraradices-L. theobromae* y *G. intraradices-T6-L.theobromae* presentaron menor concentración de fósforo en el sustrato que las de sólo patógeno, lo que indica que las plantas con patógeno no fueron tan eficientes en absorber el fósforo. Por último, plantas inoculadas con micorrizas pudieron mitigar los posibles efectos dañinos ocasionado por *L. theobromae* al aumentar su capacidad de absorción del fósforo.

En cuanto al contenido de zinc en el sustrato de las plantas con los diferentes tratamientos, se observaron menores concentraciones, aunque no significativas, en el tratamiento con *G. intraradices-L. theobromae*, a diferencia del tratamiento inoculado con *L. theobromae* (Figura 31), lo cual podría deberse a que las micorrizas no mitigaron la disminución de la absorción de zinc ocasionada por el patógeno.

En las plantas inoculadas con *T. gamsii* T6, no se encontraron menores concentraciones de zinc ni de fósforo, por lo que puede inferirse que T6 no aumentó la capacidad de las plantas

para absorberlos. Además, el tratamiento con *T. gamsii* T6-*L. theobromae* no fue significativo ($p < 0.05$) en relación a las plantas inoculadas solamente con *L. theobromae* (Figuras 28 y 31). Por lo que, T6 no disminuyó la absorción de estos nutrientes. Estos resultados contrastan con Altamore et al. (1999), quienes observaron que *Trichoderma* spp. favorece la absorción de fósforo y zinc en las plantas hospedadas.

La conductividad eléctrica, fue menor ($p < 0.05$), en presencia de la micorriza (Figura 35) y se observó una correlación negativa entre estas variables (Tabla 5). Existen trabajos donde se ha observado una disminución de la micorrización con el aumento de la salinidad. Debido a esto, se puede especular que el aumento de la conductividad eléctrica afectó a la micorrización (Levy et al., 1983; Pfeiffer y Bloss, 1988).

En las plantas micorrizadas se encontraron mayores valores de pH que en las no micorrizadas (Figura 37), estos resultados pueden deberse a que la fuente de nitrógeno suplementada fue principalmente en forma de nitrato. Bago et al. (1996), observaron un incremento de pH utilizado nitrato como fuente de nitrógeno en plantas inoculadas con *G. intraradices*, por lo cual sugieren que el micelio de la micorriza obtiene el nitrato del medio, mediante un mecanismo de membrana simporte NO_3^-/H^+ o uno $\text{NO}_3^-/\text{OH}^-$ antiporte. Además, el aumento del pH del sustrato estimulado por la micorriza baja el suministro de nitrato y favorece la absorción del fósforo (Zepeda-Guzman et al., 2010).

En el presente trabajo, las plantas utilizadas tenían alrededor de siete meses de edad, por lo que es probable que la masa radicular, al inicio del experimento, ya hubiera ocupado toda la maceta. Una de las recomendaciones para mejorar este trabajo es que la inoculación de las micorrizas sea haga en la etapa de enraizamiento, debido a que se ha visto que la fase de la producción del material de propagación es la más propicia para la micorrización (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999). Esto permitiría obtener valores de peso seco de raíces mas representativos por cada tratamiento.

Otra recomendación es que como en este trabajo no se observaron lesiones ocasionadas por *L. theobromae* se sugiere extender la duración del experimento al menos a ocho meses, como se ha hecho en trabajos previos (Halleen et al., 2010; Kotze et al., 2011). También se propone que la inoculación del patógeno sea con discos miceliales ó utilizando una concentración de conidias mayor (5×10^4 conidias/ml). Úrbez-Tórres y Gubler (2009) aplicaron como inóculos discos miceliales o una suspensión de 1×10^5 conidias/ml en ensayos para analizar la patogenicidad y virulencia de *Botryosphaeria* spp., con lo cual obtuvieron lesiones tanto en tejido verde como en leñoso.

Finalmente, se sugiere que el experimento se realice durante la etapa vegetativa de la planta, evitando la fase de dormancia, para que al final se pueda analizar el peso seco de tallo y hojas. También se proponen evaluaciones mensuales del porcentaje de micorrización y de todas las variables evaluadas del sustrato, incluyendo pH, conductividad eléctrica y concentración de nutrientes, para determinar su evolución a lo largo del experimento. También se sugiere que al final del experimento, se realice un análisis de la concentración de fósforo y zinc, en los tejidos de la planta y que la fertilización sea menos frecuente.

6. Conclusiones

Las ocho cepas de *Trichoderma* nativas analizadas en el presente trabajo mostraron capacidad antagonista similar hacia los tres aislados del patógeno evaluados, por lo que tienen potencial para usarse en el control biológico de *L. theobromae*. Los análisis morfológico y molecular, revelaron que las cepas de *Trichoderma* son miembros de las especies *T. atroviride* (L508), *T. harzianum* (T3, I6 y T. TWINS), *T. asperellum* (T. TORO) y *T. gamsii* (T5 y T6). Este es el primer reporte donde se ha evaluado el efecto inhibitorio de *T. asperellum*, sobre *L. theobromae*. Estos resultados dan pauta a futuras investigaciones en ensayos en planta para determinar si las ocho cepas de *Trichoderma* analizadas pueden ser utilizadas en el control de la muerte regresiva de vid por Botriosferia. Debido a esto se aceptó la primera hipótesis del trabajo y fue cumplido el primer y segundo objetivo.

La segunda hipótesis también se aceptó, ya que mediante los ensayos de sensibilidad a fungicidas se encontró que tanto el benomilo como el tiofanato de metilo podrían usarse junto con las cepas de *Trichoderma* evaluadas en un programa de manejo de *L. theobromae*, ya que el patógeno fue más susceptible a estos fungicidas que las trichodermas. La cepa T5 perteneciente a la especie *T. gamsii*, presentó el mayor potencial para ser utilizada en combinación con estos fungicidas, debido a su alta tolerancia. Por otro lado, el ácido bórico no podría ser utilizado en combinación con las *Trichodermas* ya que éstas fueron más susceptibles que el patógeno. Debido a esto el tercer objetivo del trabajo fue logrado.

La tercera hipótesis fue apoyada parcialmente, ya que aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos respecto al peso seco de la planta, hubo una tendencia a aumentar con la presencia de *G. intraradices* y *T. gamsii* T6 a diferencia del tratamiento inoculado solamente con el patógeno.

La cuarta hipótesis fue parcialmente aceptada, ya que la incidencia del patógeno no se disminuyó por la presencia de la micorriza, pero sí por la combinación con *T. gamsii* T6. Además la incidencia del patógeno en presencia de *T. gamsii* T6, fue disminuida marginalmente ($p < 0.1$) y se encontró una correlación negativa entre los dos hongos. Adicionalmente *T. gamsii* T6 logró mantenerse y mostró alta incidencia en el cultivar Cabernet Sauvignon.

Con los resultados de la incidencia del patógeno se aceptó la quinta hipótesis, ya que la combinación de *G. intraradices* y *T. gamsii* T6 tuvo un efecto mayor en la disminución de la incidencia del patógeno que por separado. Con estos resultados se concluyó que la micorriza arbuscular *G. intraradices* y la cepa T6 de *T. gamsii* mostraron cierto sinergismo, lo cual se apoya con el hecho de que la cepa T6 se vio favorecida por la micorrización y el flujo de CO₂ del sustrato fue mayor en los tratamientos donde se inocularon los dos hongos.

El patógeno *L. theobromae*, disminuyó la biomasa de las raíces y probablemente la capacidad de absorción de nutrientes de la planta; ya que, el tratamiento inoculado sólo con *L. theobromae* presentó peso seco de raíces menor y el sustrato en donde crecieron las plantas tuvo mayor concentración de fósforo y zinc que el de los tratamientos sin patógeno.

La micorriza *G. intraradices* posiblemente mitigó la disminución de la absorción de fósforo ocasionada por el patógeno y aumentó la absorción de zinc en la planta. Mientras, que en el sustrato de las plantas inoculadas con y sin la cepa *T. gamsii* T6 no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$), por lo que esta trichoderma no fue capaz de aumentar la capacidad de absorción de la planta.

En resumen, este es el primer estudio donde se ha evaluado el efecto de la especie *T. gamsii* y de *G. intraradices* en vid sobre *L. theobromae*, con lo cual se encontró que la cepa *T. gamsii* T6 y su combinación con *G. intraradices*, tienen potencial para ser utilizadas en el control biológico de *L. theobromae*, debido a esto se logró el cuarto objetivo del trabajo.

Sin embargo, se sugiere realizar nuevamente los ensayos en planta corrigiendo algunos aspectos experimentales y realizar experimentos similares en campo.

Referencias bibliográficas

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. 5th ed. San Diego, Elsevier Academic Press.

Akhtar, M., Siddiqui, Z. A. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens. In: Z. A. Siddiqui, M. S. Akhtar, & K. Futai (ed.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Aligarh, Springer.

Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R. (1999). Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra*, 17 (3), 179-191.

Al-Asbahi, A. A. (2012). Arbuscular mycorrhizal protein mRNA over-expression in bread wheat seedlings by *Trichoderma harzianum* Raifi (KRL-AG2) elicitation. *Gene*, 494(2), 209–213. doi:10.1016/j.gene.2011.12.030

Altamore, C., Norvell, W. A., Björkman, T., & Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7), 2926–2933.

Alves, A., Crous, P., Correia, A., & Phillips, A. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, 28 (1), 1-13.

Amponsah, N. T., Jones, E., & Ridgway, H. J. (2012). Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* dieback diseases of grapevines. *Pest Management Science*, 68 (5), 676–683. doi: 10.1002/ps.2309

Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Gordon- Hjeljord, L., Héraud, C., & Steinberg, C. (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, 114 (9), 691-701. doi: 10.1016/j.funbio.2010.05.007

APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority). (2010). *Thiophanate-methyl Final Review Report and regulatory decision*. Kingston: Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority.

Aroca, A., Raposo, R., Gramaje, D., Armengol, J., Martos, S., & Luque, J. (2008). First report of *Lasiodiplodia theobromae* associated with decline of grapevine rootstock mother plants in Spain. *Plant Disease*, 92 (5), 832. doi: 10.1094/PDIS-92-5-0832B

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2010, November). *Boron*. Retrieved July 29, 2012, from http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs26.html

Augé, R. (2001). Water relations, drought and vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, *11* (1), 3–42. doi: 10.1007/s005720100097

Bago, B., Vierheilig, H., Piché, Y., & Azcón-Aguilar, C. (1996). Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytologist*, *133* (2), 273-280. doi: 10.1111/j.1469-8137.1996.tb01894.x

Bailey, B. A, Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S., Samuels, G., et al. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, *46* (1), 24–35. doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.01.003

Bailey, B. A., Lumsden, R. D. (1998). Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: C. P. Kubicek, & G. E. Harman (ed.), *Trichoderma and Gliocladium, volumen 2: Enzymes, Biological Control and comercial applications*. London, Taylor and Francis.

Bailey, B. A., Stream, M. D., & Wood, D. (2009). *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycological Research*, *113*(12), 1365-1376. doi: 10.1016/j.mycres.2009.09.004

Barak, R., Elad, Y., Mirelman, D., & Chet, I. (1985). Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, *75* (4), 458-462. doi: 10.1094/Phyto-75-458

Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C. (1982). Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *43* (4), 810-813.

Bécard, G., Piché, Y. (1989). Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied And Environmental Microbiology*, *55* (9), 2320-2325.

Bester, W., Crous, P., & Fourie, P. H. (2007). Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology*, *36* (1), 73–77. doi: 10.1071/AP06086

- Blevins, D. G., Lukaszewski, K. M. (1998). Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49 (1), 481-500. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.481
- Bonfante, P., Perotto, S. (1995). Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi infecting host plants. *New Phytologist*, 130 (1), 3-21.
- Bowen, J. E., Gauch, H. G. (1966). Nonessentiality of boron in fungi and the nature of its toxicity. *Plant Physiology*, 41(2), 319-324. doi: 10.1104/pp.41.2.319
- Brudrett, M. C. (2002). Arbuscular mycorrhizas in plant communities. In: K. Sivasithamparam, K. Dixon, & R. L. Barret (ed.), *Micro-organisms in plant conservation and biodiversity*. Dordrecht, Kluwer Academic.
- Burruano, S. V., Modello, V., Conigliaro, G., Alfonso, A., Spagnolo, A., & Mugnai, L. (2008). Grapevine decline in Italy caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytopathologia Mediterranea*, 47(2), 132–136.
- Candolfi Arballo, O. (2009). Caracterización de anamorfos de Botryosphaeriaceae asociados a deterioro progresivo en vid (*Vitis vinifera* L.) aislados de la región vitivinícola de Baja California. (Tesis de Maestría) Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Ensenada, México.
- Chacón, M. R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A., et al. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology*, 10 (1), 19–27. doi: 10.2436/20.1501.01.4
- Chaverri, P., Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycology*, 48 (1), 1-116.
- Chet, I., Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 48 (1), 37-43. doi: 10.1007/BF02825358
- Chet, I., Inbar, J., & Hadar, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In: D. T. Wicklow, & B. Söderström (ed.), *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Berlin, Springer.
- Chouaki, T., Lavarde, V., Lachaud, L., Raccurt, C. P., & Hennequin, C. (2002). Invasive infections due to *Trichoderma* species: report of 2 cases, findings of *in vitro* susceptibility

testing, and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 35 (11), 1360–1367. doi: 10.1086/344270

Cole, J. S., Zvenyika, Z. (1988). Integrated control of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* in tobacco transplants with *Trichoderma harzianum* and triadimenol. *Plant Pathology*, 37(2), 271-277. doi:10.1111/j.1365-3059.1988.tb02073.x

Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M. I., Steinberg, C., & Alabouvette, C. (2002). Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology & Biochemistry*, 34 (4), 467-476. doi: 10.1016/S0038-0717(01)00205-X

Creasy, G. L., Creasy, L. L. (2009). *Grapes*. Oxfordshire, CABI Wallingford.

Davis, R. M., Menge, J. A. (1980). Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of citrus. *Phytopathology*, 70 (5), 447-452. doi: 10.1094/Phyto-70-447

De Jaeger, N., de la Providencia, I., Rouhier, H., & Declerck, S. (2011). Co-entrapment of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* sp. within alginate beads: impact on the arbuscular mycorrhizal fungi life cycle. *Journal of Applied Microbiology*, 111(1), 125–135. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05035.x

Di Marco, S., Osti, F., & Cesari, A. (2004). Experiments on the control of Esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43 (1), 108–116.

Elad, Y., Kapat, A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105 (2), 177-189. doi: 10.1023/A:1008753629207

Elad, Y., Zimand, G. (1993). Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology*, 42 (3), 324-332. doi: 10.1111/j.1365-3059.1993.tb01508.x

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P., & Henis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73(1), 85-88. doi: 10.1094/Phyto-73-85

Epstein, L., Sukhwinder, K. & Vander Gheynst, J. S. (2008). *Botryosphaeria*-related dieback and control investigated in noncoastal California grapevines. *California Agriculture*, 62 (4), 161-166. doi: 10.3733/ca.v062n04p161

Fahmi, A. I., Al-Talhi, A. D., & Hassan, M. M. (2012). Protoplast fusion enhances antagonistic activity in *Trichoderma* sp. *Nature and Science*, 10 (5), 100-106.

Farr, D. F., Rossman, A. Y. (2006, September). *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Retrieved April 30, 2012, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost>.

Flores, A., Chet, I., & Herrera-Estrella, A. (1997). Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Current Genetics*, 31 (1), 30-37. doi: 10.1007/s002940050173

Fourie, P. H., Halleen, F. (2006). Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 116 (4), 225–265. doi: 10.1007/s10658-006-9057-9

Fracchia, S., Mujica, M., García-Garrido, J., Martín, J., Ocampo, J. A., & Godeas, A. (1998). Interactions between *Glomus mosseae* and arbuscular mycorrhizal sporocarp-associated saprophytic fungi. *Plant and Soil*, 200 (2), 131-137. doi: 10.1023/A:1004349426315

Fracchia, S., Sampedro, I., Scervino, J. M., García-Romera, I., Ocampo, J. A., & Godeas, A. (2004). Influence of saprobe fungi and their exudates on arbuscular mycorrhizal symbioses. *Symbiosis*, 36 (2), 169-182.

Graham, J. H., Robert, T. L., & Menge, J. A. (1981). Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiology*, 68 (3), 548-552.

Green, H., Larsen, J., Olsson, P. A., Jensen, D. F., & Jakobsen, I. (1999). Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in root-free soil. *Applied Environmental Microbiology*, 65 (4), 1428–1434.

Gubler, W. D., Rolshausen, P., Trouillas, F. P., Úrbez-Torres, J. R., Voegel, T., Leavitt, G. M., et al. (2005). Grapevine trunk diseases in California. *Practical Winery and Vineyard*, 6-25. Retrieved July 29, 2012, from <http://iv.ucdavis.edu/files/24397.pdf>

Halleen, F., Crous, P. W., & Petrini, O. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology*, 32 (1), 47-52. doi: 10.1071/AP02062

Halleen, F., Fourie, P. H., & Crous, P. W. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology*, 56(4), 637-645. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01613.x

Halleen, F., Fourie, P. H., & Lombard, P.J.(2010). Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South African Journal of Enology and Viticulture* , 31(2), 125– 132.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, 2 (1), 43–56. doi: 10.1038/nrmicro797

Hause, B., Maier, W., Miersch, O., Kramell, R., & Strack, D. (2002). Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology*, 130 (3), 1213-1220. doi: 10.1104/pp.006007

Heinemeyer, A., Fitter, A. H. (2004). Impact of temperature on the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis: growth responses of the host plant and its AM fungal partner. *Journal of Experimental Botany*, 55 (396), 525-534. doi: 10.1093/jxb/erh049

Hidalgo, L. (2002). *Tratado de viticultura general*. 3^{era} Ed. Madrid, Mundi-Prensa.

Hjeljord, L., Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: C. P. Kubicek, & G. E. Harman (ed.), *Trichoderma and Gliocladium, volumen 2: enzymes, biological control and comercial applications*. London, Taylor and Francis.

Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1938). The water culture method for growing plant without soil. *California Agricultural Experiment Station Bulletin*, 347 (1), 36-39

Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D., & Puckhaber, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90 (3), 248–252. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.3.248

- Jaklitsch, W. M., Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B., & Druzhinina, I. S. (2006). *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology*, 55 (1), 135–177. doi: 10.3114/sim.2006.56.04
- John, S., Wicks, T., Hunt, J., Lorimer, M., Oakey, H., & Scott, E. (2005). Protection of grapevine wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. *Australasian Plant Pathology*, 34 (4), 569-575. doi: 10.1071/AP05075
- Khandaker, M. M., Bhuiyan, M. K., & Khair, A. (2010). *In vitro* evaluation of fungicidal responses on the growth of pathogenic *Rhizoctonia solani* kuhn, antagonistic binucleate rhizoctonia and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Bangladesh Journal of Botany*, 39 (1), 107-110. doi: 10.3329/bjb.v39i1.5534
- Kotze, C., Van Niekerk, J. M., Mostert, L., Halleen, F., & Fourie, P. H. (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*, 50 (supplement), 247-263.
- Krishna, H., Das, B., Attri, B. L., Grover, M., & Ahmed, N. (2010). Suppression of Botryosphaeria canker of apple by arbuscular mycorrhizal fungi. *Crop Protection*, 29 (9), 1049-1054. doi: 10.1016/j.cropro.2010.05.005
- Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*, 106 (7), 757-767. doi: 10.1017/S0953756202006172
- Larignon, P., Dubos, B. (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (2), 147-157. doi: 10.1023/A:1008638409410
- Larignon, P., Dubos, B. (2001). The villainy of black dead arm. *Wines & Vines*, 82 (3), 86-89.
- Larignon, P., Fulchic, R., Laurent, C., & Dubos, B. (2001). Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (supplement), 336–342.
- Leavitt, G. (1990). The occurrence, distribution, effects and control of *Botryodiplodia theobromae* on *Vitis vinifera* in California, Arizona and northern Mexico. (Ph.D. Thesis), University of California, Riverside, California, USA.

- Lehoczky, J. (1974a). Black dead arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 9 (1), 319-327.
- Lehoczky, J. (1974b). Necrosis of nurseried grapevine grafts of *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 9 (1), 329-331.
- Levy, Y., Dodd, J., & Krikun, J. (1983). Effect of irrigation, water salinity and rootstock on the vertical distribution of vesicular-arbuscular mycorrhiza in citrus roots. *New Phytologist*, 95 (3), 397-403. doi: 10.1111/j.1469-8137.1983.tb03507.x
- Lo, C.-T., Lin, C.-Y. (2002). Screening Strains of *Trichoderma* spp. for plant growth enhancement in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*, 11 (4), 215-220.
- Lo, C.-T., Nelson, E., Hayes, C., & Harman, G. (1998). Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology*, 88 (2), 129-136. doi: 10.1094/PHTO.1998.88.2.129
- Locke, J., Marois, J., & Papavizas, G. (1985). Biological control of Fusarium wilt of greenhouse-grown Chrysanthemums. *Plant Disease*, 69 (2), 167-169. doi: 10.1094/PD-69-167
- Lyubun, Y. V., Kosterin, P. V., Zakharova, E. A., Shcherbakov, A. A., & Fedorov, E. E. (2002). Arsenic-contaminated soils phytotoxicity studies with sunflower and sorghum. *Journal of Soils and Sediments*, 2 (3), 143-147. doi: 10.1007/BF02988466
- Malathi, P., Viswanathan, R., Padmanaban, P., Mohanraj, D., & Ramesh, A. (2002). Compatibility of biocontrol agents with fungicides against red rot disease of sugarcane. *Sugar Tech*, 4 (3), 131-136. doi: 10.1007/BF02942694
- Martínez, A., Obertello, M., Pardo, A., Ocampo, J. A., & Godeas, A. (2004). Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza*, 14 (2), 79-84. doi: 10.1007/s00572-003-0240-y
- Martínez-Medina, A., Roldán, A., & Pascual, J. A. (2011). Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: growth response and Fusarium wilt biocontrol. *Applied Soil Ecology*, 47(2), 98-105. doi: 10.1016/j.apsoil.2010.11.010

McAllister, C., Garcia-Romera, I., Godeas, A., & Ocampo, J. A. (1994). Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. *Soil Biology and Biochemistry*, 26 (10), 1363–1367. doi: 10.1016/0038-0717(94)90218-6

McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115 (3), 495–501.

Ming, T., Hui, C., & HongSheng, S. (2000). Mechanism of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi enhanced resistance of poplar to canker. *Scientia Silvae Sinicae*, 36 (2), 87-92.

Mishra, V. K. (2010). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Phytology*, 2 (9), 28-35.

Mohali, S., Burges, T. I. & Wingfield, M. J. (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology*, 35 (6), 385-396. doi: 10.1111/j.1439-0329.2005.00418.x

Mugnai, L., Graniiti, A., & Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive disease of grapevine. *Plant Disease*, 83 (5), 404-418. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.5.404

Mutawila, C., Fourie, P. H., Halleen, F., & Mostert, L. (2011). Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 50 (Supplement) 264-276.

Mwangi, M. W., Monda, E. O., Okoth, S. A., & Jefwa, J. M. (2011). Inoculation of tomato seedlings with *Trichoderma harzianum* and Arbuscular mycorrhizal fungi and their effect on growth and control of wilt in tomato seedlings. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42 (2), 508-513. doi: 10.1590/S1517-83822011000200015

O'Donnell, K. H., Kistler, C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (5), 2044–2049.

OVI (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin). (2012). *Statistical report on world vitiviniculture*. Paris: OVI.

- Pacovsky, R. S., Bethelenfalvay, G. J., & Paul, E. A. (1986). Comparisons between P-fertilized and mycorrhizal plants. *Crop Science*, 26 (1), 151–156.
- Pal, K. K., McSpadden -Gardener, B. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23 (1), 23-54. doi: 10.1146/annurev.py.23.090185.000323
- Papavizas, G. C., Lewis, J. A., & Abd-El Moity, T. H. (1982). Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology*, 72 (1), 126-132. doi: 10.1094/Phyto-72-126.
- Pascoe, I. (1998). Trunk diseases of grapevines- perspectives from a tour of California. *The Australian Grapegrower & Winemaker*, 417 (1), 68-71.
- Peng, S., Eissensta, D. M., Graham, J. H., Williams, K., & Hodge, N. C. (1993). Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply, analysis of carbon costs. *Plant Physiology*, 101 (3), 1063-1071. doi: 10.1104/pp.101.3.1063
- Pfeiffer, C., Bloss, H. E. (1988). Growth and nutrition of guayule (*Parthenium argentatum*) in saline soil as influenced by vesicular–arbuscular mycorrhiza and phosphorus fertilization. *New Phytologist*, 108 (3), 315–321. doi: 10.1111/j.1469-8137.1988.tb04168.x
- Phillips, A. J. (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 41(1), 3-18.
- Plata-Caudillo, J. A. (2010). Aislamiento y evaluación *in vitro* del efecto de *Trichoderma* spp. nativas sobre hongos patógenos de la madera de vid aislados en la región vitivinícola de Ensenada, Baja California. (Tesis de Maestría, Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California). Recuperada de: <http://www.biblioteca.cicese.mx>
- Pozo, M., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J., & Azcón-Aguilar, C. (2002). Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, 53 (368), 525-534. doi:10.1093/jexbot/53.368.525

- Punithalingam, E. (1976). *Botryodiplodia theobromae*. In: Commonwealth Mycological Institute (ed.), *Description of Pathogenic Fungi and Bacteria*. London, Commonwealth Mycological Institute.
- Punithalingam, E. (1980). Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae*. Vaduz, Cramer.
- RAP-AL (Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina) (Abril de 2008). *Ficha técnica: Benomil*. Recuperado el 19 de Julio de 2012, de <http://www.rap-al.org/>
- Rebell, G., Forster, R. (1976). *Lasiodiplodia theobromae* as a cause of keratomycoses. *Sabouraudia*, 14 (2), 155-70. doi: 10.1080/0036217768519023
- Redecker, D., Morton, J., & Bruns, T. (2000). Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14 (2), 276-284. doi: 10.1006/mpev.1999.0713
- Rolshausen, P., Gubler, W. D. (2005). Use of boron for the control of *Eutypa* dieback of grapevines. *Plant Disease*, 89 (7), 734-738. doi: 10.1094/PD-89-0734
- Rolshausen, P., Mahoney, N. E., Molyneux, R., & Gubler, W. D. (2006). A reassessment of the species concept in *Eutypa lata*, the causal agent of eutypa dieback of grapevine. *Phytopathology*, 96 (4), 369-377. doi: 10.1094/PHYTO-96-0369
- Rolshausen, P., Úrbez-Torres, J.R., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R. J., & Gubler, W. D. (2010). Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61 (1), 113-119.
- Rousseau, A., Benhamou, N., Chet, I., & Piche, Y. (1996). Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 86 (5), 434-443. doi: 10.1094/Phyto-86-434
- Royse, D. J., Ries, S. M. (1978). The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, 68 (4), 603-607. doi: 10.1094/Phyto-68-603.
- Rubini, M., Silva-Ribeiro, R., Pomella, A., Maki, C., Araujo, W., dos Santos, D., et al. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and

biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1 (1), 24-33.

Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrá, D., Lois Woo, S., et al. (2009). Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 22 (3), 291-301. doi:10.1094/MPMI-22-3-0291

Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., & Casas-Flores, S. (2011). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology*, 131 (1), 15-26. doi: 10.1007/s10658-011-9782-6

Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100 (8), 923-935. doi: 10.1016/S0953-7562(96)80043-8

Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96 (2), 195-206. doi: 10.1094/PHYTO-96-0195

Samuels, G. J., Chaverri, P., Farr, D. F., & McCray, E. (2012). *Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Retrieved April 12, 2012, from <http://taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>

Sawers, R. J., Yang, S., Gutjahr, C., & Paszkowski, U. (2008). The molecular components of nutrient exchange in arbuscular mycorrhizal interactions. In: Z. A. Siddiqui, M. S. Akhtar, & K. Futai (ed.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Dordrecht, Springer.

Sepúlveda-Betancourt, J. I. (2009). *Aspectos geográficos y estadísticos de la vitivinicultura del estado de Baja California*. Ensenada: Sistema Producto Vid.

Serra, S., Mannoni, M. A., & Ligios, V. (2008). Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 47(3), 234–246.

Shoresh, M., Yedidia, I., & Chet, I. (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95 (1), 76-84. doi: 10.1094/PHYTO-95-0076

Siddiqui, Z. A., Mahmood, I., & Khan, M. L. (1999). VAM fungi as prospective biocontrol agents for plant parasitic nematodes. In: D. Bagyaraj, A. Varma, K. Khanna, & H. Kehri (ed.), *Modern Approaches and Innovations in Soil Management*. Meerut, Rastogi Publications.

Siebert, J. (2001). Eutypa: the economic toll on vineyards. *Wines & Vines*, 4 (1), 50-56.

Sistema Producto Vid. (2009). Recuperado el 20 Agosto de 2011, de <http://vidvino.org>

Slippers, B., Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21 (2), 90–106. doi: 10.1016/j.fbr.2007.06.002

Smith, G. S. (1988). The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi. *Phytopathology*, 78 (3), 371–374.

Smith, S. E., Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. 3th Ed. San Diego, Academic Press.

Sosnowski, M., Creaser, M., Wicks, T., Lardner, R., & Scott, E. (2008). Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14 (2), 134–142. doi:10.1111/j.1755-0238.2008.00015.x

Sultana, N., Ghaffar, A. (2010). Effect of fungicides, microbial antagonist and oilcakes in the control of *Fusarium solani*, the cause of seed rot seedling and root infection of bottle gourd, bitter gourd and cucumber. *Pakistan Journal of Botany*, 42(4), 2921-2934.

Summerbell, R., Kraiden, S., Levine, R., & Fuksa, M. (2004). Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. *Medical Micology*, 42 (6), 543-547. doi: doi:10.1080/13693780400005916

Sundaresan, P., Raja, N. U., & Gunasekaran, P. (1993). Induction and accumulation of phytoalexins in cowpea roots infected with a mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and their resistance to *Fusarium* wilt disease. *Journal of Biosciences*, 18 (2), 291–301. doi: 10.1007/BF02703126

Surico, G., Bandinelli, R., Braccini, P., Di Marco, S., Marchi, G., Mugnai, L., et al. (2004). On the factors that may have influenced the esca epidemic in Tuscany in the eighties. *Phytopathologia Mediterranea*, 43 (1), 136–143.

Taylor, A., Hardy, G., Wood, P., & Burguess, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 34 (2), 187-195. doi: 10.1071/AP05018

Téliz, D., Valle, P. (1979). Eutypa dieback in Mexican vineyards. *Plant Disease*, 63 (4), 312-314.

Trillas, M. I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C., & Avilés, M. (2006). Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biological Control*, 39 (1), 32–38. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.05.007

U. S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (1993, September). *Reregistration eligibility decision (RED): Boric acid and its sodium salts*. Retrieved July 29, 2012, from www.pesticide.gov/pesticides.

U. S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2001, November). *Benomyl*. Retrieved July 27, 2012, from http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/benomyl_fs.htm

U. S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2004, June). *Toxicological review of boron and compounds*. Retrieved July 30, 2012, from <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0410tr.pdf>

U. S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2004, November). *Thiophanate-Methyl*. Retrieved July 28, 2012, from http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/tm_red_fs.pdf

Úrbez-Torres, J. R. (2011). The status of Botriosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathology Mediterranea*, 50 (Supplement), 5-45.

Úrbez-Torres, J. R., Gubler, W. D. (2009). Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 93 (6), 584-592. doi: 10.1094/PDIS-93-6-0584

Úrbez-Torres, J. R., Gubler, W. D. (2011). Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology*, 60 (2), 261–270. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02381.x

Úrbez-Torres, J. R., Adams, P., Kamas, J., & Gubler W. D. (2009). Identification, incidence, and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60 (4), 497–507. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02381.x

Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G., Guerrero, J., Guevara, J., & Gubler, W. D. (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. doi:10.1094/PDIS-92-4-0519.

Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Striegler, R. K., Urrea-Romero, K. E., Rupe, J. C., Cartwright, R. D., & Gubler, W. D. (2012). Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity*, 52 (1), 169-189. doi: 10.1007/s13225-011-0110-4

Vallad, G. E., Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sciences*, 44 (6), 1920-1934. doi:10.2135/cropsci2004.1920

Van Loon, L. C., Bakker, P. A., & Pieterse, C. M. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36 (1), 453-483. doi: 10.1146/annurev.phyto.36.1.453

Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Furie, P. H., & Halleen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96 (4), 781-798.

Van Niekerk, J. M., Fourie, P. H., Halleen, F., & Crous, P. W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 (Supplement), 43–54.

Vargas, R., Baldocchi, D. D., Allen, M. F., Bahn, M., Black, T. A., Collins, S. L., et al. (2010). Looking deeper into the soil: biophysical controls and seasonal lags of soil CO₂ production and efflux. *Ecological Applications*, 20 (6), 1569-1582.

Vey, A., Hoagland, R. E., & Butt, T. M. (2001). Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan (ed.), *Fungi as biocontrol agents Progress, problems and potential*. Bristol: CAB International.

Vigo, C., Norman, J. R., & Hooker, J. E. (2000). Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathology*, 49 (4), 509–514. doi: 10.1046/j.1365-3059.2000.00473.x

WHO (World Health Organization). (1993). *Benomyl health and safety guide*. Retrieved July 30, 2012, from http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg81_e.htm

WHO (World Health Organization). (1994). *Data sheet on benomyl*. Geneva: WHO.

WHO (World Health Organization). (1996). Trace elements that are probably essential. In World Health Organization (ed.), *Trace elements in human nutrition and health*. Geneva, World Health Organization.

Windham, M., Elad, W., & Bakwer, R. (1886). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76 (5), 518-521. doi: 10.1094/Phyto-76-518

Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (3), 1061–1070.

Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12), 7343–7353. doi: 10.1128/AEM.69.12.7343-7353.2003

Zepeda-Guzmán, S., Ambriz-Parra, E., Dasgupta-Schuber, N., Villegas-Moreno, H. J. A. (2010). Efecto de la interacción *Glomus intraradices*-nitrógeno sobre el pH, acumulación de fósforo y desarrollo de *Tagetes erecta* L. bajo condiciones de agobio hídrico. *Biológicas*, 12 (1), 52-56.

Anexos

1. Resultados de ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición por cada cepa de *Trichoderma* spp. sobre las tres cepas del patógeno *in vitro*.

Tabla 1. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de T. TWINS sobre las tres cepas del patógeno con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	17561.75	1	17561.75	1759.114	0.000000
Cepa del patógeno	145.92	2	72.96	7.308	0.013021
Error	89.85	9	9.98		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 2. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de T. atroviride sobre las tres cepas del patógeno con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	15022.47	1	15022.47	2584.639	0.000000
Cepa del patógeno	49.07	2	24.53	4.221	0.050922
Error	52.31	9	5.81		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 3. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de T6 sobre las tres cepas del patógeno con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	19825.66	1	19825.66	2111.872	0.000000
Cepa del patógeno	58.17	2	29.09	3.098	0.094673
Error	84.49	9	9.39		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 4. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de T3 sobre las tres cepas del patógeno con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	15969.68	1	15969.68	945.9219	0.000000
Cepa del patógeno	165.39	2	82.70	4.8983	0.036369
Error	151.94	9	16.88		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 5. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de L508 sobre las tres cepas del patógeno con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	15269.67	1	15269.67	2159.314	0.000000
Cepa del patógeno	36.68	2	18.34	2.594	0.128973
Error	63.64	9	7.07		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 6. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de T5 sobre las tres cepas del patógeno con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	15571.02	1	15571.02	4701.175	0.000000
Cepa del patógeno	38.45	2	19.23	5.804	0.024036
Error	29.81	9	3.31		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 7. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de I6 sobre las tres cepas del patógeno con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	15997.02	1	15997.02	1877.265	0.000000
Cepa del patógeno	3.60	2	1.80	0.211	0.813493
Error	76.69	9	8.52		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 8. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de T. TORO sobre las tres cepas del patógeno con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	18384.98	1	18384.98	2311.911	0.000000
Cepa del patógeno	69.39	2	34.70	4.363	0.047350
Error	71.57	9	7.95		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

2. Resultados de ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición de cinco cepas de *Trichoderma* spp. (T6, I6, T. TORO, T3 y T5) y una de *L. theobromae* (UCD256Ma), por cada concentración del ácido bórico, el tiofanato de metilo y el benomilo.

Tabla 9. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. y una cepa de *L. theobromae* por 2 mg/ml de ácido bórico, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	36924.99	1	36924.99	4971.853	0.000000
Cepa	968.05	5	193.61	26.069	0.000005
Error	89.12	12	7.43		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 10. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. y una cepa de *L. theobromae* por 5 mg/ml de ácido bórico, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	126809.0	1	126809.0	150479.2	0.000000
Cepa	3311.5	5	662.3	785.9	0.000000
Error	10.1	12	0.8		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 11. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. y una cepa de *L. theobromae* por 10 mg/ml de ácido bórico, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	128727.1	1	128727.1	341614.6	0.000000
Cepa	2657.0	5	531.4	1410.2	0.000000
Error	4.5	12	0.4		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 12. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. y una cepa de *L. theobromae* por 0.07 mg/ml de tiofanato de metilo, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	55562.99	1	55562.99	37145.81	0.000000
Cepa	8133.68	5	1626.74	1087.53	0.000000
Error	17.95	12	1.50		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 13. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. y una cepa de *L. theobromae* por 0.7 mg/ml de tiofanato de metilo, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	74945.67	1	74945.67	71686.65	0.000000
Cepa	4216.76	5	843.35	806.68	0.000000
Error	12.55	12	1.05		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 14. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. y una cepa de *L. theobromae* por 7 mg/ml de tiofanato de metilo, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	135178.1	1	135178.1	13472913	0.00
Cepa	1004.2	5	200.8	20018	0.00
Error	0.1	12	0.0		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 15. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. y una cepa de *L. theobromae* por 0.25 µg/ml de benomilo, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	18443.33	1	18443.33	11666.46	0.000000
Cepa	7378.29	5	1475.66	933.44	0.000000
Error	18.97	12	1.58		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 16. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. y una cepa de *L. theobromae* por 0.5 µg/ml de benomilo, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	45407.73	1	45407.73	31816.75	0.000000
Cepa	2549.66	5	509.93	357.30	0.000000
Error	17.13	12	1.43		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 17. ANOVA de una vía del porcentaje de inhibición (arcoseno) de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. y una cepa de *L. theobromae* por 0.75 µg/ml de benomilo, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	73242.33	1	73242.33	64300.23	0.000000
Cepa	740.44	5	148.09	130.01	0.000000
Error	13.67	12	1.14		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

3. Resultados de ANOVA de una vía de la incidencia (arcoseno) de *T. gamsii* T6, el aislado de *L. theobromae* UCD256Ma y el porcentaje (arcoseno) de micorrización, en los ocho tratamientos en plantas de vid.

Tabla 18. ANOVA de una vía de la incidencia (arcoseno) de la cepa T6 en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	31525.06	1	31525.06	155.9816	0.000000
Tratamiento	37276.10	7	5325.16	26.3481	0.000000
Error	6467.44	32	202.11		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 19. ANOVA de una vía del porcentaje de micorrización (arcoseno) en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	2423.997	1	2423.997	17.75721	0.0001
Tratamiento	3931.706	7	561.672	4.11458	0.0025
Error	4368.249	32	136.508		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 20. ANOVA de la incidencia del patógeno (arceseno) en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	16973.93	1	16973.93	35.51341	0.000001
Tratamiento	20418.35	7	2916.91	6.10285	0.000141
Error	15294.66	32	477.96		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 21. ANOVA de la incidencia del patógeno (arceseno) en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	16973.93	1	16973.93	35.51341	0.000001
Tratamiento	20418.35	7	2916.91	6.10285	0.000141
Error	15294.66	32	477.96		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 22. ANOVA de la incidencia del patógeno (arceseno) en los tratamientos con patógeno en plantas de vid, con un nivel de significancia del 90% y n=4.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	42434.82	1	42434.82	85.63185	0.000001
Tratamiento	4305.52	3	1435.17	2.89613	0.079006
Error	5946.59	12	495.55		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

4. Resultados de ANOVA de una vía del peso seco del tallo y raíces, en los ocho tratamientos en plantas de vid.

Tabla 23. ANOVA del peso seco del tallo en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	23367.56	1	23367.56	1306.728	0.000
Tratamiento	118.42	7	16.92	0.946	0.485
Error	572.24	32	17.88		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 24. ANOVA del peso seco de las raíces en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 90%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	14307.31	1	14307.31	1038.794	0.000
Tratamiento	218.83	7	31.26	2.270	0.053
Error	440.74	32	13.77		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

5. Resultados de ANOVA de una vía del flujo de CO₂, humedad y temperatura del sustrato y temperatura ambiental en los ocho tratamientos en plantas de vid.

Tabla 25. ANOVA del porcentaje (arcoseno) de humedad del sustrato en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	144623.0	1	144623.0	10275.25	0.000
Tratamiento	107.4	7	15.3	1.09	0.392
Error	450.4	32	14.1		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 26. ANOVA de la temperatura (°C) del sustrato en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	34875.23	1	34875.23	11906.92	0.000000
Tratamiento	111.78	7	15.97	5.45	0.000345
Error	93.73	32	2.93		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 27. ANOVA de la temperatura ambiental (°C) en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	49961.19	1	49961.19	1893.973	0.000000
Tratamiento	98.10	7	14.01	0.531	0.802166
Error	633.10	24	26.38		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 28. ANOVA del flujo de CO₂ (μmol/m²/s) del sustrato normalizado a 25 °C, en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	188.3265	1	188.3265	11997.30	0.000000
Tratamiento	7.8080	7	1.1154	71.06	0.000000
Error	0.5023	32	0.0157		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

6. Resultados de las pruebas *t*-Student del flujo de CO₂ en plantas: con y sin micorrizas; con y sin trichoderma; con y sin patógeno.

Tabla 29. Prueba *t*-Student del flujo de CO₂ (μmol/m²/s) del sustrato normalizado a 25 °C, entre la media de plantas con y sin micorrizas, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (M)	^b Media (SM)	Valor de t	p	^c DE (M)	^d DE (SM).
2.44	1.89	4.79	0.00002	0.36	0.37

^aMedia de las plantas con micorrizas

^bMedia de las plantas sin micorrizas

^cDesviación estándar de las plantas con micorrizas

^dDesviación estándar de las plantas sin micorrizas

Tabla 30. Prueba *t*-Student del flujo de CO₂ (μmol/m²/s) del sustrato normalizado a 25 °C, entre la media de plantas con y sin *Trichoderma*, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (T)	^b Media (ST)	Valor de t	p	^c DE (T)	^d DE (ST).
2.28	2.05	2.61	0.009	0.53	0.54

^aMedia de las plantas con *Trichoderma*

^bMedia de las plantas sin *Trichoderma*

^cDesviación estándar de las plantas con *Trichoderma*

^dDesviación estándar de las plantas sin *Trichoderma*

Tabla 31. Prueba *t*-Student del flujo de CO₂ (μmol/m²/s) del sustrato normalizado a 25 °C, entre la media de plantas con y sin patógeno, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (P)	^b Media (SP)	Valor de t	p	^c DE (P)	^d DE (SP).
2.3	2.03	3.0	0.0023	0.53	0.54

^aMedia de las plantas con patógeno

^bMedia de las plantas sin patógeno

^cDesviación estándar de las plantas con patógeno

^dDesviación estándar de las plantas sin patógeno

7. Resultados de ANOVA de una vía de las variables del análisis del sustrato en los ocho tratamientos en plantas de vid.

Tabla 32. ANOVA del contenido de fósforo del sustrato en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	810328.7	1	810328.7	1799.181	0.000000
Tratamiento	9802.0	7	1400.3	3.109	0.012826
Error	14412.4	32	450.4		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 33. ANOVA del contenido de zinc del sustrato en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	959.2342	1	959.2342	379.8348	0.000000
Tratamiento	45.5387	7	6.5055	2.5760	0.031728
Error	80.8127	32	2.5254		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 34. ANOVA de la conductividad eléctrica del sustrato en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	947.5337	1	947.5337	911.7337	0.000000
Tratamiento	28.3329	7	4.0476	3.8946	0.003557
Error	33.2565	32	1.0393		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

Tabla 35. ANOVA del pH del sustrato en los ocho tratamientos en plantas de vid, con un nivel de significancia del 95%.

Fuente de variación	SS ^a	g.l ^b	MS ^c	F	p
Intercepto	1585.207	1	1585.207	48388.49	0.000000
Tratamiento	0.970	7	0.139	4.23	0.002104
Error	1.048	32	0.033		

^aSuma de cuadrados

^bGrados de libertad

^cPromedio de los cuadrados

8. Resultados de las pruebas *t*-Student de las variables del análisis del sustrato en plantas: con y sin micorrizas; con y sin trichoderma; con y sin patógeno.

Tabla 36. Prueba *t*-Student del contenido de fósforo en el sustrato, entre la media de plantas con y sin micorrizas, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (M)	^b Media (SM)	Valor de t	p	^c DE (M)	^d DE (SM).
131.9	152.6	-2.8	0.0068	23	22.7

^aMedia de las plantas con micorrizas

^bMedia de las plantas sin micorrizas

^cDesviación estándar de las plantas con micorrizas

^dDesviación estándar de las plantas sin micorrizas

Tabla 37. Prueba *t*-Student del contenido de zinc en el sustrato, entre la media de plantas con y sin micorrizas, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (M)	^b Media (SM)	Valor de t	p	^c DE (M)	^d DE (SM).
4.3	5.4	-2.1	0.03	1.5	1.8

^aMedia de las plantas con micorrizas

^bMedia de las plantas sin micorrizas

^cDesviación estándar de las plantas con micorrizas

^dDesviación estándar de las plantas sin micorrizas

Tabla 38. Prueba *t*-Student de la conductividad eléctrica del sustrato, entre la media de plantas con y sin micorrizas, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (M)	^b Media (SM)	Valor de t	p	^c DE (M)	^d DE (SM).
4.1	5.6	-4.5	0.00005	0.8	1.1

^aMedia de las plantas con micorrizas

^bMedia de las plantas sin micorrizas

^cDesviación estándar de las plantas con micorrizas

^dDesviación estándar de las plantas sin micorrizas

Tabla 39. Prueba *t*-Student del pH del sustrato, entre la media de plantas con y sin micorrizas, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (M)	^b Media (SM)	Valor de t	p	^c DE (M)	^d DE (SM).
6.4	6.1	4.8	0.000018	0.1	0.1

^aMedia de las plantas con micorrizas

^bMedia de las plantas sin micorrizas

^cDesviación estándar de las plantas con micorrizas

^dDesviación estándar de las plantas sin micorrizas

Tabla 40. Prueba *t*-Student del contenido de fósforo en el sustrato, entre la media de plantas con y sin *Trichoderma*, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (T)	^b Media (ST)	Valor de t	p	^c DE (T)	^d DE (ST).
139.01	145.6	-0.83	0.4	20.12	29.09

^aMedia de las plantas con *Trichoderma*

^bMedia de las plantas sin *Trichoderma*

^cDesviación estándar de las plantas con *Trichoderma*

^dDesviación estándar de las plantas sin *Trichoderma*

Tabla 41. Prueba *t*-Student del contenido de zinc en el sustrato, entre la media de plantas con y sin *Trichoderma*, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (T)	^b Media (ST)	Valor de t	p	^c DE (T)	^d DE (ST).
5.2	4.5	1.3	0.1	2.3	0.9

^aMedia de las plantas con *Trichoderma*

^bMedia de las plantas sin *Trichoderma*

^cDesviación estándar de las plantas con *Trichoderma*

^dDesviación estándar de las plantas sin *Trichoderma*

Tabla 42. Prueba *t*-Student de la conductividad eléctrica del sustrato, entre la media de plantas con y sin *Trichoderma*, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (T)	^b Media (ST)	Valor de t	p	^c DE (T)	^d DE (ST).
4.8	4.8	0.06	0.9	1.5	0.9

^aMedia de las plantas con *Trichoderma*

^bMedia de las plantas sin *Trichoderma*

^cDesviación estándar de las plantas con *Trichoderma*

^dDesviación estándar de las plantas sin *Trichoderma*

Tabla 43. Prueba *t*-Student del pH del sustrato, entre la media de plantas con y sin *Trichoderma*, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (T)	^b Media (ST)	Valor de t	p	^c DE (T)	^d DE (ST).
6.3	6.2	1.1	0.2	0.207	0.243

^aMedia de las plantas con *Trichoderma*

^bMedia de las plantas sin *Trichoderma*

^cDesviación estándar de las plantas con *Trichoderma*

^dDesviación estándar de las plantas sin *Trichoderma*

Tabla 44. Prueba *t*-Student del contenido de fósforo en el sustrato, entre la media de plantas con y sin patógeno, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (P)	^b Media (SP)	Valor de t	p	^c DE (P)	^d DE (SP).
152.7	131.9	2.8	0.0065	26.5	18.5

^aMedia de las plantas con patógeno

^bMedia de las plantas sin patógeno

^cDesviación estándar de las plantas con patógeno

^dDesviación estándar de las plantas sin patógeno

Tabla 45. Prueba *t*-Student del contenido de zinc en el sustrato, entre la media de plantas con y sin patógeno, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (P)	^b Media (SP)	Valor de t	p	^c DE (P)	^d DE (SP).
5.5	4.2	2.2	0.02	2.2	0.9

^aMedia de las plantas con patógeno

^bMedia de las plantas sin patógeno

^cDesviación estándar de las plantas con patógeno

^dDesviación estándar de las plantas sin patógeno

Tabla 46. Prueba *t*-Student de la conductividad eléctrica en el sustrato, entre la media de plantas con y sin patógeno, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (P)	^b Media (SP)	Valor de t	p	^c DE (P)	^d DE (SP).
4.9	4.7	0.5	0.5	1.43	1.07

^aMedia de las plantas con patógeno

^bMedia de las plantas sin patógeno

^cDesviación estándar de las plantas con patógeno

^dDesviación estándar de las plantas sin patógeno

Tabla 47. Prueba *t*-Student del pH en el sustrato, entre la media de plantas con y sin patógeno, con un nivel de significancia del 95%.

^a Media (P)	^b Media (SP)	Valor de <i>t</i>	<i>p</i>	^c DE (P)	^d DE (SP).
6.2	6.3	-0.3	0.7	0.2	0.2

^aMedia de las plantas con patógeno

^bMedia de las plantas sin patógeno

^cDesviación estándar de las plantas con patógeno

^dDesviación estándar de las plantas sin patógeno