

TESIS DEFENDIDA POR
PLATA CAUDILLO JORGE ALEJANDRO
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Rufina Hernández Martínez
Codirector del Comité

César Valenzuela Solano
Codirector del Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Miembro del Comité

Dr. Stephen Holmes Bullock Runquist
Miembro del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias con orientación en
Microbiología*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

16 de marzo de 2010

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**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

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

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

JORGE ALEJANDRO PLATA CAUDILLO

Ensenada, Baja California, México, marzo de 2010.

RESUMEN de la tesis de **Jorge Alejandro Plata Caudillo** presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en MICROBIOLOGÍA. Ensenada, Baja California. Marzo 2010.

Aislamiento y evaluación *in vitro* del efecto de *Trichoderma* spp nativas sobre los hongos patógenos de la madera de vid aislados en la región vitivinícola de Ensenada, Baja California.

Resumen aprobado por:

Dra. Rufina Hernández Martínez
Codirectora

Dr. César Valenzuela Solano
Codirector

La vid es uno de los frutales más importantes en Baja California, tanto en superficie, como en volumen y valor de producción. Esta región produce el 95% de los vinos mexicanos. En Ensenada las enfermedades de la madera de la vid, causadas principalmente por hongos, son uno de los principales factores que limitan la longevidad y productividad de los viñedos. Los hongos asociados con estos problemas incluyen varias especies de *Botryosphaeriaceae* (*Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum vitifusiforme*, *Diplodia corticola* y *Neofusicoccum australe*, entre otros), así como *Cylindrocarpon* spp. *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeomoniella chlamydospora*. Dada la importancia de estos patógenos en todo el mundo, es una prioridad encontrar la manera de controlarlos. *Trichoderma* es un hongo saprófito que produce compuestos antibióticos volátiles y no volátiles, capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. En este trabajo se aislaron *Trichoderma* spp de plantas de vid en Ensenada, se evaluaron sus efectos *in vitro* sobre ocho hongos de la madera de vid obtenidos de viñedos de la región y se compararon con una cepa de *T. atroviride* y una cepa comercial de *T. harzianum*. Los fitopatógenos fueron: *D. seriata*, *F. australe*, *L. theobromae*, *N. luteum*, *D. mutila*, *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* y *Cylindrocarpon* sp. Dos aislados designados CCBM01-1 y SACH26-1, ejercieron mayores porcentajes de inhibición sobre todos los patógenos probados (excepto *Cylindrocarpon* sp), que la cepa comercial y *T. atroviride*. Por otra parte, un tercer aislado nombrado SACH21-3, logró mayor control sobre *D. seriata* y *L. theobromae* que la cepa comercial y *T. atroviride*. Tomando como base sus características morfológicas y el análisis de la región del espaciador transcrito interno (ITS1-5.8S-ITS2), los aislados CCBM01-1 y SACH26-1 fueron ubicados dentro de la especie *T. gamsii*, mientras que SACH21-3 fue identificado como *T. harzianum*. Los resultados obtenidos, abren la posibilidad de utilizar los tres aislados mencionados, como agentes de control biológico de los hongos que dañan la madera de las plantas de vid en Ensenada.

Palabras Clave: Enfermedades de la madera, brazo muerto, yesca, enfermedad del pie negro, *Trichoderma*.

ABSTRACT of the thesis presented by **Jorge Alejandro Plata Caudillo** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation on MICROBIOLOGY. Ensenada, Baja California, México. March, 2010.

Isolation and *in vitro* evaluation of the effect of native *Trichoderma* spp on trunk disease fungi isolated from grapevine wood in the wine region of Ensenada, Baja California.

Grapevine used for wine production is one of the most important fruit crops in Baja California. This region produces the 95% of Mexican wine. In Ensenada grapevine trunk diseases, caused mainly by fungi, are among the main factors limiting vineyard longevity and productivity. Fungi associated with trunk diseases, include several species of Botryosphaeriaceae (*Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum vitifusiforme*, *Diplodia corticola* and *Neofusicoccum australe*, among others), *Cylindrocarpon* spp. *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. Due to the importance of these pathogens worldwide, research on disease control strategies is a priority. *Trichoderma* are one option for biological control. These are a saprophyte fungus able to produce volatile and nonvolatile compounds that suppress plant pathogens. Here, we isolated *Trichoderma* spp from field-grown grapevines, evaluated their potential to control fungi associated with trunk diseases. We also compared them with a well characterized isolate of *T. atroviride* and a commercial strain of *T. harzianum*. Pathogens tested were: *L. theobromae*, *D. seriata*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola*, *N. australe*, *Cylindrocarpon* sp, *P. aleophilum* and *P. chlamydospora*. Two isolates named CCMT01-1 and SACH26-1, inhibited all the pathogens tested except *Cylindrocarpon*, showed higher percent of inhibition than the commercial and *T. atroviride* strains through the production of volatile and nonvolatile compounds. A third isolate, SACH21-3 showed greater effect than the commercial strain and *T. atroviride* toward *D. seriata* and *L. theobromae* through the production of nonvolatile compounds. Based on their morphological characteristics and the analysis of their internal transcribed spacer region (ITS-5.8S-ITS2), CCMT01-1 and SACH26-1 were identified as members of *T. gamsii*, while SACH21-3 as *T. harzianum*. These results open the possibility of using these *Trichoderma* spp to control fungi affecting grapevine in Ensenada area.

Keywords: Trunk diseases, bot canker, black foot disease, grapevine, esca, *Trichoderma*.

Dedicatorias

A Reyna y José, mis padres.

A José Alberto, mi hermano.

Agradecimientos

A mis padres, Reyna y José, por darme la vida, por hacerme la persona que ahora soy. Por su gran ejemplo, por su amor, por hacerme sentir que no estoy solo, muchas gracias por su apoyo durante todos estos años que llevo en este mundo. Gracias por darme las alas, prepararme para usarlas, y dejarme volar cuando llego el momento.

A mi hermano, José Alberto, por saber ser *el hermano mayor*, gracias por tu ayuda, tus regaños, tus palabras de aliento; gracias por soplar cuando parecía que ya no había viento para volar. Gracias por ser mi hermano y mi mejor amigo.

A la Dra. Rufina Hernández por su dirección y asesoría en este trabajo. Muchas gracias por aceptarme en el proyecto, por confiar en mí, por apoyarme, por compartir sus conocimientos, por siempre tener tiempo para escuchar y platicar, por ser asesora, directora y amiga, pero sobre todo ... gracias por aguantarme.

Al Dr. César Valenzuela por su codirección, por su gran apoyo y asesoría en el campo y durante la escritura de este trabajo.

Al comité que evaluó esta tesis, la Dra. Rosa Mouriño y el Dr. Stephen Bullock por sus sugerencias y comentarios.

A los integrantes del grupo de fitopatología, los que estuvieron y los que están, por su gran ayuda para que este trabajo pudiera ver la luz: Daniel, Francisco y Luis, cada página de este escrito lleva algo de ustedes. Un agradecimiento muy especial a la Ing. Liliana López por ser una pieza fundamental en este trabajo, Lilí, sin ti no sé que hubiera hecho. Muchas Gracias Amiga.

Al Tec. Guillermo González, por su gran apoyo dentro y fuera del laboratorio, Memo, gracias por estar siempre dispuesto a ayudar.

Al Departamento de Microbiología por haberme recibido, a las Dras. Meritxell Riquelme y Ernestina Castro, por sus clases, consejos y ayuda. A Ruth por su apoyo en todos los trámites habidos y por haber. A la Dra. Olga por gran ayuda en los momentos de las grandes dudas. A los compañeros que se convirtieron en amigos, y a los amigos y hermanos que reencontré ahí. Un agradecimiento a cada uno de ellos: Rosy, Rosita, Ariana, Isadora, Naydi, Dolores, Adriana, Roxy, Abraham, Ramon, Mario, Raúl, Jovanni, Lisandro. A todos por siempre tener un gesto amable, por hacer agradable la estancia en el laboratorio.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Salomón Bartnicki, por sus enseñanzas fuera y dentro del aula.

Al Dr. José Luis Stephano y todos los miembros de su laboratorio por tener siempre las puertas abiertas.

A mi familia adoptiva, los oceanólogos: Gabriel, Geovanni, Steephen, Marina, a las que están lejos físicamente pero siempre están a mi lado: Gaby, Grisel y Ruth; los biólogos: Carolina, Liss, Alejandro, César y Oscar. Y por supuesto Andrea. A todos ellos muchas gracias por haber tenido siempre palabras de aliento en los momentos difíciles, por compartir los momentos alegres, por tener paciencia y por comprender que *lo urgente no deja tiempo para lo importante*. Amigos, gracias por siempre estar ahí.

A Ofelia, la otra *incipiente*, por su gran apoyo todo este tiempo, en especial durante la realización de este trabajo. Amiga, gracias por SER y ESTAR. A Cynthia, Aurora y Alex, por su gran ayuda, por esas platicas grupales *laborales*, por esos desayunos que podían durar horas. Pero sobre todo gracias por su amistad.

A Karla por escuchar a la distancia, por sus consejos. Por hacerme comprender que hay más ventanas en la pared. Gracias por llegar y dejar huella.

Al CONACYT por el apoyo económico mediante la beca para la realización de este trabajo.

Al CICESE, por el apoyo durante mi maestría.

A Fundación PRODUCE por confiar en nosotros y apoyar el proyecto.

A los productores de vid de Ensenada por abrirnos sus puertas.

Esto no es el acabóse, sino el continuóse del empezóse ...

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	ix
Introducción	1
Antecedentes	5
Enfermedades de la madera en vid	6
Enfermedad de cancro por Botriosferia	8
Enfermedad de Yesca	10
Enfermedad de Pie negro.....	12
Control de enfermedades de la madera	14
Control físico-cultural de las enfermedades de la madera.....	14
Control químico de las enfermedades de la madera	15
Control Biológico de las enfermedades de la madera	16
Las especies de <i>Trichoderma</i>	18
Antibiosis	20
Micoparasitismo.....	20
Hongos fitopatógenos asociados a enfermedades de la madera en vid en la costa de Ensenada	22
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivos	24
Objetivo General.....	24
Objetivos específicos.....	24
Materiales y métodos	26
Obtención de cepas de hongos patógenos	26
Obtención de aislados de <i>Trichoderma</i>	26
Identificación morfológica de los aislados	27
Evaluación de los mecanismos de inhibición de <i>Trichoderma</i> sobre hongos patógenos de la madera de vid	28
Inhibición del crecimiento de <i>Botryosphaeria</i> spp por <i>Trichoderma</i>	28
Evaluación de antagonismo de cepas de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Cylindrocarpon</i> sp, <i>P. aleophilum</i> y <i>P. chlamydospora</i>	30
Inhibición de hongos de la madera por compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> .	31
Inhibición de hongos de la madera por compuestos no volátiles.....	31

CONTENIDO (continuación)

	Página
Microscopía de las interacciones de las <i>Trichoderma</i> spp sobre patógenos de la madera de vid.....	32
Análisis estadístico	33
Caracterización de las cepas de <i>Trichoderma</i> con actividad antifúngica.	33
Extracción de DNA de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	33
Amplificación de los fragmento de ITS de los aislados de <i>Trichoderma</i>	34
Purificación y secuenciación.....	35
Resultados	36
Aislamiento e identificación de aislados <i>Trichoderma</i> spp.	36
Caracterización morfológica de los aislados de <i>Trichoderma</i>	36
Evaluación del antagonismo de los aislados de <i>Trichoderma</i> ante hongos patógenos de vid.	38
Evaluación del antagonismo de la cepa PHC®T-22®	38
Evaluación del antagonismo del aislado SASI109-1	39
Evaluación del antagonismo del aislado CCBM46-2	41
Evaluación del antagonismo del aislado SACH21-3.....	43
Evaluación del antagonismo del aislado CCMT01-2	45
Evaluación del antagonismo del aislado CCMT01-1	47
Evaluación del antagonismo del aislado SACH26-1.....	48
Evaluación del antagonismo de la cepa <i>T. atroviride</i>	50
Comparación entre los aislados de <i>Trichoderma</i> hacia las cepas de <i>Botryosphaeria</i>	52
Antagonismo de las cepas de SACH21-3, CCMT01-1 y SACH26-1 sobre los patógenos <i>P. aleophilum</i> , <i>P. chlamydospora</i> y <i>Cylindrocarpon</i> sp.....	60
Compuestos Volátiles y No volátiles.....	64
Secreción de compuestos volátiles	64
Secreción de compuestos no volátiles	65
Microscopía de las interacciones de las <i>Trichoderma</i> spp sobre patógenos de la madera de vid.....	69
Caracterización de las cepas de <i>Trichoderma</i> con actividad antifúngica.	69
Discusiones	72
Conclusiones	76
Literatura citada	78

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diagrama de la inoculación en cultivo dual de los patógeno y el potencial antagonista. El parámetro de evaluado fue el porcentaje de inhibición del crecimiento radial.....	29
Figura 2. Morfología de las colonias de los seis aislados después de 14 días de inoculación en medio PDA a temperatura ambiente de 25 °C. A. SASI109-1, B. CCBM46-2, C. SACH21-3, D. CCMT01-2, E. CCMT01-1, F. SACH26-1.....	38
Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>D. seriata</i> , <i>F. australe</i> , <i>N. vitifusiforme</i> , <i>D. corticola</i> y <i>L. theobromae</i> en PDA debido a la cepa comercial T-22. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).	39
Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>D. seriata</i> , <i>F. australe</i> , <i>N. vitifusiforme</i> , <i>D. corticola</i> y <i>L. theobromae</i> en PDA debido al aislado SASI109-1. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).	40
Figura 5. Inhibición del crecimiento de dos anamorfos de <i>Botryosphaeria</i> por parte del aislado SASI109-1. A. <i>F. australe</i> , B. <i>N. vitifusiforme</i> . La letra T muestra el sitio de inoculación de <i>Trichoderma</i> , mientras que P indica el del patógeno.	41
Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>D. seriata</i> , <i>F. australe</i> , <i>N. vitifusiforme</i> , <i>D. corticola</i> y <i>L. theobromae</i> en PDA debido al aislado CCBM46-22. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).	42
Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>D. seriata</i> , <i>F. australe</i> , <i>N. vitifusiforme</i> , <i>D. corticola</i> y <i>L. theobromae</i> en PDA debido al aislado SACH21-3.. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).	44
Figura 8. Inhibición del crecimiento de dos diferentes anamorfos de <i>Botryosphaeria</i> por parte del aislado SACH21-3. A. <i>F. australe</i> , B. <i>N. vitifusiforme</i> . La letra T muestra el sitio en donde fue sembrado el aislado de <i>Trichoderma</i> , mientras que P indica el del patógeno.	44

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Página

- Figura 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido al aislado CCMT01-2. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0.05$). 46
- Figura 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido al aislado CCMT01-1. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0.05$). 47
- Figura 11. Inhibición del crecimiento de diferentes anamorfos de *Botryosphaeria* por parte del aislado CCMT01-1. A. *D. seriata*, B. *D. corticola*. La letra T muestra el sitio de inóculo de *Trichoderma*, mientras que P indica el del patógeno..... 48
- Figura 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido al aislado SACH26-1. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0,05$). 49
- Figura 13. Inhibición del crecimiento de diferentes anamorfos de *Botryosphaeria* por parte del aislado SACH26-1. A. *D. seriata*. B. *D. corticola*. La letra T muestra el sitio de inóculo de *Trichoderma*, mientras que P indica el del patógeno..... 50
- Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido a la cepa de *T. atroviride*. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$). 51
- Figura 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las cinco especies de la familia Botryosphaeriaceae por competencia con las ocho cepas evaluadas de *Trichoderma*. Los datos son las medias de las cinco réplicas, y las barras de error denotan las desviaciones estándar de dichas réplicas. Los valores marcados con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo a las pruebas de medias de Tukey. Las diferencias son entre las cepas de *Trichoderma* para cada patógeno. 53

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Página

- Figura 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las cinco especies de la familia Botryosphaeriaceae por competencia con las ocho cepas evaluadas de *Trichoderma*. Los datos son las medias de las cinco réplicas, y las barras de error denotan las desviaciones estándar de dichas réplicas. Los valores marcados con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo a las pruebas de medias de Tukey. Las diferencias son entre la inhibición ejercida por cada cepa de *Trichoderma*..... 54
- Figura 17. Cuadro de valores de significancia (pruebas de medias de Tukey) para comparaciones medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento entre las cepas de *Trichoderma* para *F. australe*. Valores menores a 0.05 indican diferencias significativas. 55
- Figura 18. Cuadro de valores de significancia (pruebas de medias de Tukey) para comparaciones medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento entre las cepas de *Trichoderma* para *D. seriata*. Valores menores a 0.05 indican diferencias significativas..... 56
- Figura 19. Cuadro de valores de significancia (pruebas de medias de Tukey) para comparaciones medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento entre las cepas de *Trichoderma* para *N. vitifusiforme*. Valores menores a 0.05 indican diferencias significativas. 57
- Figura 20. Cuadro de valores de significancia (pruebas de medias de Tukey) para comparaciones medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento entre las cepas de *Trichoderma* para *D. corticola*. Valores menores a 0.05 indican diferencias significativas. 58
- Figura 21. Cuadro de valores de significancia (pruebas de medias de Tukey) para comparaciones medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento entre las cepas de *Trichoderma* para *L. theobromae*. Valores menores a 0.05 indican diferencias significativas. 59
- Figura 22. Inhibición del crecimiento de *Cylindrocarpon* spp por parte de los aislados de *Trichoderma* SACH21-3 (A), CCMT01-1 (D), y SACH26-1 (G). Las interacciones antagonista-patógeno, se muestran en los cuadros B, E y H y en los cuadros C, F e I se presentan el patógeno en ausencia de *Trichoderma* sp. Las imágenes fueron tomadas siete días después de la inoculación. 61

LISTA DE FIGURAS (continuación)

	Página
Figura 23. Inhibición del crecimiento de <i>P. aleophilum</i> , por parte de los aislados de <i>Trichoderma</i> SACH21-3 (A), CCMT01-1 (D), y SACH26-1 (G). Las interacciones antagonista-patógeno, se muestran en los cuadros B, E y H y en los cuadros C, F e I se presentan el patógeno en ausencia de <i>Trichoderma</i> sp. Las imágenes fueron tomadas siete días después de la inoculación.....	62
Figura 24. Inhibición del crecimiento de <i>P. chlamydospora</i> , por parte de los aislados de <i>Trichoderma</i> SACH21-3 (A), CCMT01-1 (D), y SACH26-1 (G). Las interacciones antagonista-patógeno, se muestran en los cuadros B, E y H y en los cuadros C, F e I se presentan el patógeno en ausencia de <i>Trichoderma</i> sp. Las imágenes fueron tomadas siete días después de la inoculación.	63
Figura 25. Inhibición del crecimiento <i>P. aleophilum</i> (cuadros A, B y C) por compuestos no volátiles de tres cepas de <i>Trichoderma</i> : D) SACH21-3, E). CCMT01-1 y F). SACH26-1, siete días después de haber sido inoculado.....	66
Figura 26. Inhibición del crecimiento <i>P. chlamydospora</i> , por compuestos no volátiles de tres cepas de <i>Trichoderma</i> , siete días después de realizada la inoculación. Arriba se observan los controles. A. SACH21-3, B. CCMT01-1, y C. SACH26-1.....	67
Figura 27. Inhibición del crecimiento <i>Cylindrocarpon</i> sp. por compuestos no volátiles de tres cepas de <i>Trichoderma</i> siete días después de realizada la inoculación. Arriba se observan los controles. A. SACH21-3, B. CCMT01-1, y C. SACH26-1.....	68
Figura 28. Micrografías (100x) que muestran las interacciones entre <i>Trichoderma</i> y algunas <i>Botryosphaeria</i> spp. (A)SACH26-1 frente a <i>D. seriata</i> . Se pueden apreciar hifas degradadas (flecha negra) debido a la acción del antagonista. En el cuadro B se observa la acción micoparasítica de este mismo aislado hacia este patógeno. CCBM01-1 también colapso hifas de <i>D. seriata</i> (C). El aislado SACH23-1 presentó micoparasitismo ante <i>D. corticola</i> (D), <i>D. seriata</i> (E) y <i>F. australe</i> (F). En las imágenes, la letra B denota al patógeno, T al antagonista y la flecha blanca la interacción entre estos.	70
Figura 29. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias ITS de las cepas analizadas en este estudio y de otras cepas aisladas en diferentes partes del mundo usando el algoritmo del vecino más cercano y 1,000 réplicas en MEGA.	71

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla I. Especies de la familia Botryosphaeriaceae aisladas de vid en diferentes regiones del mundo (modificado de Candolfi-Arballo, 2009).	9
Tabla II. Síndromes específicos asociados a yesca en relación al origen de la planta (modificado de Graniti et al., 2000).	11
Tabla III. Localización de los sitios donde se aislaron <i>Trichoderma</i> spp.	36
Tabla IV. Porcentaje de inhibición ejercido por los aislados SASI109-1 y T-22 sobre cinco especies de la familia Botryosphaeriaceae.	41
Tabla V. Porcentaje de inhibición ejercido por el aislado CCBM46-2 y T-22 sobre las diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae.	43
Tabla VI. Porcentaje de inhibición ejercido por el aislado SACH21-3 y T-22 sobre las diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae.	45
Tabla VII. Porcentaje de inhibición ejercido por las cepas CCMT01-2 y T-22 sobre cinco diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae.....	46
Tabla VIII. Porcentaje de inhibición ejercido los aislados CCMT01-1 y T-22 sobre las diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae	48
Tabla IX. Porcentaje de inhibición ejercido por las cepas SACH26-1 y T-22 sobre las diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae.	50
Tabla X. Porcentaje de inhibición ejercido por las cepas <i>T. atroviride</i> y T-22 sobre las diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae.	52
Tabla XI. Inhibición del crecimiento de <i>P. aleophilum</i> , <i>P. chlamydospora</i> y <i>Cylindrocarpon</i> sp por parte de tres cepas de <i>Trichoderma</i> . El signo (+) expresa inhibición total, (+/-) denota que se observó crecimiento menor al control y (-) que el crecimiento fue similar al control.....	64
Tabla XII. Inhibición del crecimiento de <i>F. australe</i> , <i>D. seriata</i> , <i>N. vitifusiforme</i> , <i>D. corticola</i> y <i>L. theobromae</i> por secreción de compuestos volátiles de cuatro cepas de <i>Trichoderma</i> . El signo (+) expresa inhibición y (-) que hubo crecimiento del patógeno similar al del control.	64

LISTA DE TABLAS (Continuación)

Página

- Tabla XIII. Inhibición del crecimiento de *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* y *Cylindrocarpon* sp. por secreción de compuestos volátiles de cuatro cepas de *Trichoderma*. El signo (+) expresa inhibición mientras que (-) indica que hubo crecimiento del patógeno..... 65
- Tabla XIV. Inhibición del crecimiento de *F. australe*, *D. seriata*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* por secreción de compuestos no volátiles de cuatro cepas de *Trichoderma*. El signo (+) expresa inhibición total y (+/-) denota que se observó crecimiento pero menor al control, mientras que (-) indica que hubo crecimiento del patógeno similar al control..... 65
- Tabla XV. Inhibición del crecimiento de *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* y *Cylindrocarpon* sp. por secreción de compuestos no volátiles de tres cepas de *Trichoderma*. El signo (+) expresa inhibición total y (+/-) denota que se observó crecimiento pero menor al control, mientras que (-) indica que hubo crecimiento del patógeno similar al control..... 68

Introducción

Durante décadas, el cultivo de la vid en Baja California ha estado fuertemente asociado a la industria vinícola. En esta zona la producción de vino equivale al 90% del total de la producción en México. En los últimos años a este binomio uva-vino se le ha sumado la industria turística, junto con la organización de eventos culturales y sociales masivos, que ha resultado en fuentes de empleos directos e indirectos, así como en un fuerte desarrollo económico, social y urbano de las zonas productoras.

Como todo cultivo, la vid es afectada por una serie de factores bióticos y abióticos que pueden repercutir en la producción y la calidad de la cosecha y por ende generar importantes pérdidas económicas. Entre los factores bióticos, las enfermedades y específicamente las conocidas genéricamente como enfermedades de la madera destacan por su importancia. A causa de estas enfermedades, en Australia se han estimado pérdidas anuales de 20 millones de dólares en la producción de la variedad Shiraz (Sosnowski *et al.*, 2005), mientras que en el estado de California, la industria reporta pérdidas que llegan a alcanzar aproximadamente 260 millones de dólares (Scheck *et al.*, 1998). Dentro de las enfermedades de la madera se incluyen entre otras a la yesca, la eutipiosis, la enfermedad de Petri, la enfermedad del brazo muerto y el pie negro (Punitthalingam y Waller, 1976; Punitthalingam, 1980). Aunque se han hecho varios estudios de todas estas enfermedades, aún no hay consenso en cuanto a la designación de qué hongo u hongos son responsables de una u otra enfermedad, por lo cual actualmente se ha optado por agrupar a estas y otras enfermedades

que afectan a la madera de vid bajo la designación de enfermedades de la madera o decaimiento de la madera.

Las plantas afectadas por estas enfermedades, presentan diversos síntomas entre los que destacan un decaimiento progresivo y acronecrosis o muerte lenta del tejido vegetal (Pascoe, 1998). Los principales agentes causales son hongos pertenecientes a varios géneros y especies, como: *Eutypa lata*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacramonium* spp, *Phomopsis* spp, *Cylindrocarpon* spp (Hunt, 2004) y varias especies de la familia Botryosphaeriaceae (Ferreira *et al.*, 1989; Mugnai *et al.*, 1999; Groenewald *et al.*, 2001; Mostert *et al.*, 2001, 2005a; van Niekerk *et al.*, 2004; Bester, 2006).

Estos patógenos penetran a través de las heridas producidas especialmente durante la poda en las partes leñosas de la planta (Ferreira *et al.*, 1989; Mugnai *et al.*, 1999; Larignon y Dubos 2000; Mostert *et al.*, 2005b; van Niekerk *et al.*, 2005a). Los síntomas observados se deben principalmente a la interrupción de la conductividad del xilema o a la producción de toxinas por parte del hongo (Pascoe, 1998). Además de ser patógenos, estos hongos tienen la capacidad de crecer sobre madera muerta donde producen esporas que son diseminadas por medio de insectos, el agua y el viento, hacia otras zonas del viñedo u otros viñedos, donde inician nuevas infecciones.

Dados los importantes daños económicos causados por estos patógenos, a nivel mundial se ha estado trabajando en la búsqueda de diferentes alternativas para controlarlos y prevenir la infección de plantas sanas.

Para el control de enfermedades producidas por hongos en plantas, generalmente se utilizan compuestos químicos llamados fungicidas (Wilson, 1997; Oh y Lee, 2000), sin embargo, su uso trae como consecuencia efectos nocivos al ambiente y al personal involucrado directamente en su aplicación debido a su

toxicidad y en algunos casos residualidad (Batra, 1982; O'Keeffe y Farrell, 2000), además de favorecer el desarrollo de agentes patógenos resistentes. Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas al uso de agentes químicos, por lo que las investigaciones se han dirigido hacia los microorganismos que pueden ser utilizados como agentes de control biológico.

Garret (1965) definió al concepto de control biológico como cualquier práctica o condición por medio de la cual se reduce la actividad o la sobrevivencia de un patógeno. Los mecanismos de acción por medio de los cuales un antagonista puede afectar al patógeno son: competencia, antibiosis, micoparasitismo (Papavizas, 1985; Fravel, 1988; Benhamou y Chet, 1997) e inducción de mecanismos de resistencia (Punja, 1997). Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, lo que indica que no hay un mecanismo principal, sino que pueden llegar a actuar en conjunto, provocando la disminución de la incidencia de la enfermedad.

Existen diversos estudios sobre organismos, principalmente dentro del grupo de bacterias y hongos, que tienen la capacidad natural de combatir organismos patógenos de los cultivos (Blakeman y Fokkema, 1982; Windels y Lindow, 1985; Harman, 2000, Harman *et al.*, 2004). En el caso de los hongos, uno de los organismos de biocontrol más utilizados, son las especies del género *Trichoderma*. A través de diversos estudios, se sabe de su habilidad para reducir los daños causados por hongos patógenos en plantas; esta habilidad está relacionada a su gran capacidad competitiva (Ahmad y Baker, 1987; Nelson, Harman y Nash, 1988), al fenómeno de antibiosis (Ghrisalberti y Sivacithamparam, 1991), a la producción de metabolitos secundarios y enzimas líticas y al micoparasitismo (Henis *et al.*, 1983). Son varias las especies de este género que se han venido utilizando, pero la especie que destaca es *T. harzianum*, debido a su gran potencial como agentes de control biológico contra varias enfermedades (Chet, 1987; Jacobs *et al.*, 1991).

Para el control de las enfermedades del tronco en vid, en los últimos años se han probando varias cepas de *Trichoderma* en diferentes regiones vitícolas del mundo, la mayoría pertenecientes a la especie *T. harzianum* que es la que ha presentado un mayor espectro de control bajo diferentes condiciones ambientales (Migheli *et al.*, 1995). Los estudios han mostrado que con *T. harzianum* se ha logrado la inhibición completa de *P. chlamydospora* (Di Marco, 2004), el antagonismo contra *Cylindrocarpon* spp, el aumento en la masa radicular (Fourie *et al.*, 2001) y el fortalecimiento de la unión injerto-patrón (Messina, 1999).

En trabajos previos en viñedos de la zona vitivinícola de la Costa de Ensenada, Baja California, se ha reportado la presencia de los hongos patógenos *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacramonium* spp, *Cylindrocarpon* spp y algunas especies de la familia Botryosphaeriaceae (Urbez-Torres *et al.*, 2008; Hernández-Martínez *et al.*, 2008; Candolfi-Arballo, 2009). En el presente trabajo se evaluó la capacidad de ocho cepas del género *Trichoderma*, seis de ellas aisladas en los viñedos regionales, para inhibir *in vitro* el crecimiento de los hongos patógenos mencionados con anterioridad. Esto con el fin de buscar un control biológico de los hongos de la madera.

II

Antecedentes

La vid es el cultivo frutal de mayor extensión en el mundo, es cultivada en todos los continentes. La producción se destina al consumo fresco, seco y a la elaboración de vinos. Europa contribuye con el 70% de la superficie total y el 80% de la producción mundial de vino, Italia cubre aproximadamente la cuarta parte de la producción vinícola mundial. Estados Unidos por su parte, con aproximadamente 380,000 has cultivadas en el 2008, (USDA National Agricultural Statistics Service, 2009) tiene el octavo lugar como productor mundial de este fruto. Otros países como Australia y Nueva Zelanda representan menos del 1% (Mullins *et al.*, 1992).

México produce más de 651 mil toneladas de vid, teniendo tres destinos principales: uva para mesa, uva pasa y la que se destina para la industria vinícola. El estado de Sonora es el mayor productor al generar el 70% de la uva nacional, con un volumen estimado de 456 mil toneladas al año. Otros estados productores de uva, son: Baja California, Zacatecas, Coahuila y Aguascalientes; los estados de Nuevo León, Chihuahua, Querétaro y San Luis Potosí apenas están desarrollando un potencial vinícola (SAGARPA, 2005).

En Baja California, la vid es uno de los frutales más importantes tanto en superficie, volumen y valor de producción, contándose actualmente con una superficie de 3,326 has dedicadas a esta actividad (Sepulveda Betancourt, 2009) de las cuales el volumen de producción es de 30,760 toneladas, representando el 18% de la superficie nacional y el 13.2% de la producción nacional de uva. Del

total de la superficie, el 80.3% está dirigida a la producción de vino y el 18.3% a uva de mesa y uva pasa. La producción de vino de mesa en la región es de 200,000 hectolitros anuales, lo que representa el 95% de la producción nacional, de los cuales el 20% se dedica al mercado de exportación (SPV, 2009). La industria vitivinícola de Baja California contribuye altamente a la economía local, además de tener un alto impacto social, al ser generadora de empleos directos e indirectos, y ser una alternativa económica para los productores de la zona (SPV, 2009).

La vid, como todo cultivo puede verse afectada por varios factores que disminuyen el rendimiento de los frutos. Por un lado, condiciones ambientales adversas como son la presencia de heladas o el granizo; y por otro, los producidos por los ataques de insectos y por la presencia de enfermedades. Las enfermedades pueden reducir el rendimiento e incrementar los costos de producción como resultado de actividades culturales y las medidas preventivas, así como por la eliminación de plantas enfermas. Los microorganismos causantes de enfermedades son bacterias, nematodos, virus y hongos. Las enfermedades producidas por hongos son las más devastadoras (Agrios, 1969).

Enfermedades de la madera en vid

Entre las diversas enfermedades producidas por hongos a la vid, las del tronco son de gran importancia en todos los cultivos de alrededor del mundo, ya que son responsables de importantes pérdidas económicas (Gubler *et al.*, 2005). En Australia se ha estimado una pérdida anual de 20 millones de dólares en la producción de la variedad Shiraz (Sosnowski *et al.*, 2005), mientras que en el estado de California, la industria reporta pérdidas que llegan a alcanzar aproximadamente 260 millones de dólares (Scheck *et al.*, 1998).

Las enfermedades del tronco en vid son causadas por hongos patógenos que infectan a través de las heridas producidas especialmente durante la poda en las partes leñosas de la planta (Ferreira *et al.*, 1989; Mugnai *et al.*, 1999; Larignon y Dubos 2000; Mostert *et al.*, 2005b; van Niekerk *et al.*, 2005a). Los síntomas de estas enfermedades incluyen un lento decaimiento y acronecrosis, también llamada gangrena regresiva, como consecuencia de la interrupción de la conductividad del xilema o por la producción de toxinas por parte del hongo (Pascoe, 1998). Son varios los hongos que están asociados a las enfermedades de la madera en vid, entre estos se incluyen *Eutypa lata*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacramonium* spp, *Phomopsis* spp, algunas especies de la familia Botryosphaeriaceae (Ferreira *et al.*, 1989; Mugnai *et al.*, 1999; Groenewald *et al.*, 2001; Mostert *et al.*, 2001, 2005a; van Niekerk *et al.*, 2004; Bester, 2006) y *Cylindrocarpon* spp (Hunt, 2004). La enfermedad producida por *E. lata* se conoce como Eutipiosis; *P. chlamydospora* y *Phaeoacramonium* spp han sido aislados solos o en asociación y están reportados como los agentes causales de la enfermedad de Petri (Morton, 1999; Crous y Gams, 2000) además, se han encontrado frecuentemente asociados a Yesca en asociación con el hongo *Fomitiporia mediterránea* (Surico *et al.*, 2006). *Phomopsis* spp produce excoriosis y las especies de *Botryosphaeria* se han asociado a canchales y brazo muerto.

El periodo de susceptibilidad de la planta varia con el patógeno. Eskalen y colaboradores (2007) evaluaron la susceptibilidad de las plantas a la infección por *P. aleophilum* y *P. chlamydospora* y hallaron que la temporada de mayor susceptibilidad fue durante la poda. También se ha observado, que esta susceptibilidad va disminuyendo con el paso del tiempo, para *P. aleophilum* y *P. chlamydospora*, después de cuatro meses la infección fue nula (Eskalen *et al.*, 2007), mientras que para el caso de *D. seriata*, el periodo de susceptibilidad fue de dos semanas (Larignon *et al.*, 2001a).

La expresión de estos síntomas, además de la presencia de los patógenos, depende de otros factores como la edad, la susceptibilidad de la planta, el mecanismo de infección del hongo, la reacción de la planta, y algunos factores ambientales como la disponibilidad de nutrientes, y la cantidad y calidad del agua (Graniti *et al.*, 2000). Las condiciones climáticas parecen ser un factor determinante para la presencia de estos patógenos (Merrin *et al.*, 1995; Munkvold y Marois, 1995; Mugnai *et al.*, 1999; Larignon y Dubos 2000; Erincik *et al.* 2003; Copes y Hendrix, 2004; Edwards y Pascoe 2004; van Niekerk *et al.*, 2005a; Bester, 2006), por lo que las estrategias para el manejo de estas enfermedades deben ser específicas para cada lugar (Bester *et al.*, 2007).

Enfermedad de cancro por *Botriosferia*

Distintos hongos de la familia Botryosphaeriaceae han sido asociados a varias enfermedades como la excoriosis, decaimiento y la enfermedad del brazo muerto en vid. Diversas especies de esta familia han sido aislados de vides que presentan síntomas de decaimiento y acronecrosis en Egipto (El-Goorani *et al.*, 1972); en los estados de California (Gubler *et al.*, 2005; Leavitt *et al.*, 1987), y Arizona (Leavitt, 1990); México (Leavitt, 1990; Urbez-Torres., 2008), Hungría (Lehoczky, 1974), Francia, (Larignon y Dubos, 2001), Italia (Rovesti y Montermini. 1987), Portugal (Phillips, 1998; 2002), España (Úrbez-Torres *et al.*, 2006b; Luque *et al.*, 2005), Sudáfrica (van Niekerk *et al.*, 2004) , Chile (Auger *et al.*, 2004) y Australia (Castillo-Pando *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2005). Al menos 12 especies de hongos se han encontrado asociadas a vid (Tabla I).

Existe cierta confusión en la epidemiología de las especies *Botryosphaeria*, ya que una patología, puede estar asociada a varios patógenos (van Nierkerk *et al.*, 2006), asimismo, varias especies han sido reportadas como virulentas en ciertas regiones, mientras que en otras, esas mismas especies son consideradas

como patógenos débiles (Úrbez-Torres *et al.*, 2006a). Un claro ejemplo de esto lo representa *B. obtusa*, el cual ha sido reportado como virulento en Chile (Auger *et al.* 2004), Australia (Castillo-Pando *et al.* 2001), y Sudáfrica (van Nierkerk *et al.*, 2004) pero es considerado como un patógeno débil en Portugal (Phillips *et al.* 2002).

Tabla I. Especies de la familia Botryosphaeriaceae aisladas de vid en diferentes regiones del mundo (modificado de Candolfi-Arballo, 2009).

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

Las plantas infectadas por *Botryosphaeria* presentan síntomas foliares similares a los de la yesca, aunque las manchas toman un color diferente, conforme pasan las semanas las hojas se secan por completo y se caen (Larignon y Dubos, 2001). Algunos autores reportan un crecimiento reducido y clorosis foliar a principios de primavera y posteriormente, en fase avanzada, la muerte del brazo (Castillo-Pando et al., 2001; van Nierkerk et al., 2006). En viñedos de California, Estados Unidos, se reportan síntomas similares a los presentados para la eutipiosis (Urbez-Torres et al., 2006b), es decir, se pueden llegar a observar partes del tronco necróticas, con la corteza suelta (Lecomte et al., 2005) y el síntoma interno más típico que es una necrosis sectorial, sobre el xilema de brazos y tronco, de color marrón oscuro y en forma de cuña, aunque también se pueden observar puntos negros o necróticos que rodean la medula central (van Nierkerk et al., 2002, 2006).

Enfermedad de Yesca

La yesca, también conocida como apoplejía, es un complejo de enfermedades, que no puede atribuirse a la acción de un solo patógeno (Graniti et al., 2000), y se caracteriza por la decoloración y deterioro de la madera (Di Marco et al., 2000).

Algunos reportes, principalmente en Francia, Italia y otros países como Estados Unidos, Sudáfrica, Nueva Zelanda, España, y Alemania, señalan que son tres los principales hongos asociados a la Yesca: *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* y *F. mediterránea* los cuales se asocian a cinco síndromes relacionados (Tabla II) (Surico et al., 2008). *P. chlamydospora* y *P. aleophilum* se han aislado de vides con síntomas de decaimiento en Baja California (Hernandez-Martinez et al., 2008).

Phaeomoniella chlamydospora y *P. aleophilum* se han encontrado colonizando el tejido del xilema en plantas de vid (Eskalen *et al.* 2007; Mugnai *et al.*, 1997; Larignon y Dubos, 1997; Sparapano *et al.*, 2000; Surico *et al.*, 2008) y se han asociado a traqueomicosis, enfermedad producida por hongos que invaden el sistema vascular o región traqueal de la planta pudiendo llegar a marchitarla o desecarla.

Tabla II. Síndromes específicos asociados a yesca en relación al origen de la planta (modificado de Graniti *et al.*, 2000).

Síndromes	Descripción
Rayas marrón en la madera	Afecta a esquejes enraizados, portainjertos o plantas patrón, es causada por especies de <i>Phaeoacremonium</i> o géneros relacionados a <i>Phaeomoniella</i> a menudo sin síntomas externos.
Enfermedad de Petri	Este decaimiento en vides jóvenes es conocido bajo diferentes nombres locales (Black goo, declinamiento lento decaimiento de vid por <i>Phaeoacremonium</i>); es causado por la infección temprana de material de propagación o vides jóvenes por especies de <i>Phaeoacremonium</i> o géneros asociados.
Yesca en vides jóvenes	Se da cuando <i>Phaeoacremonium</i> infecta plantas en crecimiento (8-10 años de edad) a través de heridas de poda o injerto se caracteriza por la madera de color negro o marrón y gomosis vascular en tronco y ramas, con o sin síntomas foliares.
Pudrición blanca	Cuando la infección es a través de heridas y exclusivamente por <i>F. punctata</i> u otro basidiomiceto de madrea podrida, se caracteriza por la pudrición e la madera puede o no ir acompañada de síntomas externos en hojas y frutos.
Yesca	Ocurre cuando la podredumbre blanca se desarrolla en los troncos de las vides de edad madura o viejas junto con o precedida por el desarrollo de un color marrón en la madera. Es el síndrome completo y es causada por la combinación o acción sucesiva de una o más especies de <i>Phaeoacremonium</i> y géneros asociados y <i>F. punctata</i> .

El síntoma más característico de yesca, es la presencia de hojas "atigradas", o con manchas amarillentas entre las venas que pueden llegar a convertirse en tejido necrosado (Surico *et al.*, 2008), esto puede ser atribuido tanto a la presencia de los hongos como a una serie de actividades concomitantes como la producción de fitotoxinas (Evidente *et al.*, 2003; Sparapano *et al.*, 2000; Tabacchi *et al.*, 2000; Abou-Mansor, Couché y Tabacchi, 2004; Bruno y Sparapano, 2006a), enzimas pectinolíticas (Marchi *et al.*, 2001) y otras enzimas extracelulares (Mugnai *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2006; Bruno y Sparapano, 2006b), además de la obstrucción del tejido vascular (del Rio *et al.*, 2001; Troccoli *et al.*, 2001; Edwards, *et al.*, 2007).

La prevención de este síndrome es muy difícil, y la erradicación una vez que los hongos han colonizado la planta, es imposible (Mugnai *et al.*, 1999; Di Marco *et al.*, 2000) por lo que es necesario buscar medidas que sean eficaces en el control de esta enfermedad.

Enfermedad de Pie negro

Las especies del género *Cylindrocarpon*, en particular *C. destructans* (Zins) y otras especies como *Campylocarpon* son responsables de la enfermedad en vid conocida como pie negro (Hallen *et al.*, 2007, Grasso y Magnano di San Lio, 1975; Maluta y Larignon, 1991) la cual causa importantes pérdidas económicas ya que las plantas infectadas tienen que ser removidas. Hay reportes de la presencia de esta enfermedad en Francia (Maluta y Larignon, 1991), Portugal (Rego *et al.*, 2000), España (Armengol *et al.*, 2001). Sudáfrica y Nueva Zelanda (Halleen *et al.*, 2003). En California, han sido reportadas las especies, *C. destructans* (Zinssmeister) Sholten, *Cylindrocarpon macrodidymum* Halleen, Schroers y Crous, y *Cylindrocarpon obtusisporum* (Cooke y Harness) Wolleweb (Petit y Gubler, 2005; Scheck *et al.*, 1998) como las especies responsables de la enfermedad de pie

negro. En la región vitivinícola de Baja California se han encontrado también especies de *Cylindrocarpon* asociadas a vid (Hernandez-Martinez *et al.*, 2008).

Al igual que otros hongos fitopatógenos, las cepas aisladas de *Cylindrocarpon* spp de diferentes regiones, presentan grandes variaciones tanto en su morfología como en su virulencia (Booth, 1966; Samuels y Brayford, 1990). Las vides infectadas muestran un crecimiento lento, disminución del vigor, hojas pequeñas, escasas y cloróticas. El tronco de las plantas infectadas muestran una coloración oscura que se puede observar al remover la corteza en la zona de unión patrón-injerto, internamente aparecen manchas que van de color marrón a negras principalmente en la parte basal del patrón, además muestran lesiones en las raíces, las cuales pueden estar necrosadas. Así mismo, la biomasa radicular se ve reducida (Rego *et al.*, 2000; Rego *et al.*, 2006; Halleen *et al.*, 2006; Scheck *et al.*, 1998). La progresión de la enfermedad puede darse de forma repentina o gradual. En su forma repentina, la enfermedad avanza rápidamente y la vid se puede colapsar y morir durante el verano, sin importar el que tenga fruto. En la forma gradual, la enfermedad puede ir deteriorando a la planta lentamente y matarla en dos a tres años, durante este periodo, el crecimiento de los brotes tendrá un visible retraso, la vid tomará un color más pálido en comparación con las plantas sanas que la rodean, y el vigor se reducirá notablemente. La razón por la cual se producen los síntomas de la enfermedad puede deberse a que el micelio del hongo crece en el interior del xilema, bloqueándolo y degradando el xilema en la base del patrón (Bonfiglioli, 2006).

Control de enfermedades de la madera

Control físico-cultural de las enfermedades de la madera

Tras la prohibición en algunos países del uso del arsenito sódico el cual se había venido utilizando para el control de ciertas enfermedades como la yesca (Mugnai *et al.*, 1999), las opciones de tratamiento han sido en gran medida preventivas y se limitan a minimizar el riesgo de infección durante la poda. Las prácticas culturales más comunes son la eliminación de los restos de poda y de las plantas infectadas para reducir las fuentes de inóculo (Larignon y Dubos, 2001), así como la protección de las heridas de poda con fungicidas como el benomilo el cual es un fungicida sistémico, que interfiere en algunas funciones celulares, como la división celular y los mecanismos de transporte intracelulares. Este fungicida originalmente mostraba un amplio rango de actividad contra patógenos en muchos cultivos diferentes (Copping, 1996); sin embargo la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA por su siglas en inglés) clasificó al benomilo como un posible carcinógeno para seres humanos (US EPA, 1996).

También se ha estado retardando la época de poda, ya que así se reduce la susceptibilidad de las heridas (Munkvold y Marois, 1995). Otra medida son las podas de saneamiento (Di Marco *et al.*, 2000; Sosnowski *et al.*, 2004), que consisten en la eliminación de las zonas afectadas sin llegar a extraer toda la planta. En el caso de plantas nuevas, una opción, consiste en sumergir los esquejes de la planta en agua caliente (50 °C) durante media hora, sin embargo los resultados de este método son discutibles ya que, mientras unos reportes muestran resultados esperanzadores para el control de *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* y *Cylindrocarpon* spp (Armengol *et al.*, 2007; Hallen *et al.*, 2007), otros reportan que esta acción no erradica la presencia de ciertos patógenos como *P.*

chlamydospora (Rooney *et al.*, 2001) ni afecta su esporulación (Whiting *et al.*, 2001) además de que en ocasiones, estos tratamientos llegan a dañar el material de plantación (Waite y May, 2005; Waite y Morton, 2007).

Control químico de las enfermedades de la madera

Para el control de enfermedades de plantas principalmente se utilizan compuestos químicos llamados fungicidas. Uno de los más utilizados ha sido el arsenito de sodio el cual es aplicado vía aerosol en los troncos y brazos de planta. El mecanismo de acción de este compuesto aun no ha sido explicado, sin embargo es el producto que ha presentado los mejores resultados (Geoffrion, 1982; Dubos *et al.*, 1983; Desaché *et al.*, 1992, 1995; Boubals, 1996). Sin embargo, algunos países han prohibido su uso, o lo han restringido como en el caso de Francia, Portugal y España debido a los efectos nocivos que puede acarrear a la salud humana, pudiendo llegar afectar al hígado y la piel, además del impacto ambiental y su acumulación en la cadena alimenticia (Meneguz y Zaghi, 1996).

Groenewald y colaboradores (2000) mostraron mediante ensayos *in vitro*, que el benomilo fenarimol, prochloraz, cloruro de manganeso y el tebuconazol pueden inhibir el crecimiento micelial de *P. chlamydospora* a bajas concentraciones. También el tebuconazol, flusilazol, espiroxamina y fluzinam han mostrado ser eficaces *in vitro*, contra el crecimiento micelial de *B. obtusa* (*Diplodia seriata*) y *N. luteum* (Savocchia *et al.*, 2005). Bester y colaboradores (2007) reportaron a benomilo, tebuconazol y prochloraz como los agentes más efectivos en la protección de heridas de poda contra especies de la familia Botriosphaeriaceae.

Dumot y colaboradores (1999), utilizaron varios fungicidas para el control de la enfermedad del pie negro pero sus resultados fueron no concluyentes, ya que

C. destructans no pudo ser recuperado de los controles infectados artificialmente. El uso *in vitro* de benomil, tebuconazol y la mezcla carbendazima + flusilazol resultaron efectivos contra *C. destructans*, por otra parte, las mezclas ciprodinil + fludioxonil y Flusilazol + Carbendazima fueron efectivas contra el mismo patógeno pero en condiciones en campo (Rego *et al.*, 2006).

Control Biológico de las enfermedades de la madera

Baker y Cook (1974) definen el control biológico, como la reducción de la densidad del inoculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, del hospedero, o por la introducción de una población de uno o más antagonistas. El biocontrol por medio de microorganismos antagónicos representa una valiosa herramienta para la protección de los cultivos (Ait-Lashen *et al.*, 2001). La principal ventaja del control biológico, en comparación con el control químico, es la disminución de daños a largo plazo para el medio ambiente por el uso de sustancias químicas persistentes, y la ausencia de residuos químicos en las partes comestibles de los cultivos (Blakeman y Fokkema, 1982).

El control biológico puede ser el resultado de diferentes tipos de interacciones entre los organismos involucrados; en todos los casos, los patógenos son antagonizados por la presencia o por la(s) actividad(es) de otro organismo. Este antagonismo puede darse de manera directa y/o indirecta. El antagonismo directo es el resultado del contacto físico y/o un alto grado de especificidad hacia el patógeno por parte del mecanismo expresado por el organismo controlador. En contraste, en el antagonismo indirecto, no se involucra la detección o ataque hacia el patógeno por parte del antagonista; como ejemplo se puede mencionar la estimulación de los mecanismos de defensa en la planta huésped.

Los mecanismos más comunes de antagonismo que presentan algunos organismos utilizados para control biológico son: a) Hiperparasitismo, que es cuando el patógeno es directamente atacado por un organismo biocontrolador que mata al patógeno o sus propágulos; b) Antibiosis, la cual se da por la secreción de toxinas que pueden, en bajas concentraciones, inhibir o matar a otro microorganismo; c) secreción de enzimas líticas; d) competencia, principalmente por nutrientes; e) inducción de la resistencia del huésped, que puede darse local y/o sistémicamente, dependiendo del tipo, fuente, y cantidad del estímulo (Pal y McSpadden, 2006). En vid, una opción relativamente nueva de protección es la aplicación de microorganismos benéficos como lo son varias especies de *Trichoderma*. Este hongo aislado del suelo puede ser aplicado como enmienda para mejorar el crecimiento de la raíz o como protector de heridas durante la poda. Por más de una década han estado disponibles en el mercado fórmulas comerciales que contienen este ingrediente activo. Investigaciones recientes han demostrado cómo este hongo puede actuar como un comensal que protege a la vid con un "efecto tipo vacuna" una vez que la vid es inoculada y el hongo se establece en el interior del tejido leñoso del tronco y del cordón (Hunt, 2004). Las cepas de *Trichoderma* pueden volver a ser aislada de las vides y árboles hasta cinco años después de la inoculación con las fórmulas comerciales Trichodowel[®] o Trichoject[®] (Hunt, 2004; John *et al.*, 2004).

Hunt y colaboradores (2001) sugieren que *Trichoderma* tiene gran potencial como agente protector de heridas de poda contra infecciones de hongos asociados a enfermedades de la madera y decaimiento de vid. Algunos estudios han demostrado que sí se pre-infecta una planta con *Trichoderma sp.* durante la poda, se previene la infección por *P. chlamydospora*, lo que indica que *Trichoderma* es efectivo como agente de prevención en plantas que aun no han sido infectadas (Di marco *et al.*, 2000).

Di Marco (2002) encontró 22 cepas de *Trichoderma* efectivas en condiciones *in vitro* contra *P. chlamydospora*, incluso algunas cepas inhibieron completamente al patógeno. Asimismo, algunas cepas de *Trichoderma harzianum* han mostrado varios grados de acción lítica hacia hongos patógenos aislados en vides enfermas.

Messina (1999) reportó que los tratamientos con diferentes especies de *Trichoderma* ayudan a producir una fuerte unión en los injertos además de que el tiempo de formación del callo se ve reducido. Además de prevenir las infecciones vía aérea, se ha observado que sí los esquejes de vid son sometidos a un tratamiento con *Trichoderma*, la zona radicular de la planta se ve beneficiada. Fourie y colaboradores (2001) encontraron que hay un incremento de hasta el 41.7 % en masa radicular en vid después de que el suelo ha sido tratado con *Trichoderma*, lo que reditúa en plantas fuertes y con bajos índices de infección. Asimismo, reportaron la efectividad de este antagonista para el control de *Cylindrocarpon* spp.

Las especies de *Trichoderma*

Trichoderma es un hongo filamentoso imperfecto del orden de los Hypocreales de la división Ascomicetos. Es cosmopólita, se encuentra presente en casi todos los suelos y otros diversos hábitats (Harman, 2006). Su principal rol ecológico es la descomposición de los residuos de plantas en el suelo (Harper y Lynch, 1985). Este hongo ha sido estudiado como agente de control biológico desde hace más de 70 años (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Esto ha llevado a un alto grado de desarrollo tecnológico que ha generado la aparición de diferentes formulas comerciales de diversas cepas para control biológico de algunas enfermedades. Los más importantes organismos de biocontrol contra hongos

patógenos de plantas son miembros de las especies *Trichoderma virens* y *T. harzianum* (Hermosa *et al.*, 2000).

Las estructuras de esporulación de *Trichoderma* son las conidias, mientras que sus estructuras de resistencia son las clamidosporas (Cohen *et al.*, 1983). Sus colonias son de rápido crecimiento, con micelio compacto y de coloración de blanco a verde (Cook y Baker, 1989). En medio de papa agar dextrosa (PDA), las colonias son al principio blancas y algodonosas, posteriormente adquieren un color verde debido a los conglomerados de conidios que se forman en las puntas de las hifas (Velázquez y Pineda, 1995a); los conidios, también pueden ser de color blanco o amarillo (Velázquez y Pineda, 1995b).

Algunas cepas presentan una alta competencia por la rizosfera: son capaces de colonizar y crecer en las raíces a medida que se desarrollan. Una vez que entran en contacto con las raíces, colonizan su superficie o la corteza, dependiendo de la cepa (Harman y Kubicek, 1998). Algunos de los mecanismos de biocontrol asociados a *Trichoderma* son: micoparasitismo, antibiosis y secreción de enzimas, competencia por rizosfera y nutrientes, e inducción de mecanismos de defensa en plantas (Harman y Kubicek, 1998).

La competencia se da principalmente por espacio, nutrientes y factores de crecimiento (Elad *et al.*, 1999; Graham y Mitchell, 2002; Weller *et al.*, 2002) mientras que el micoparasitismo se da vía producción de enzimas líticas como las quitinasas, y β 1-3 β 1-4 glucanasas (Graham y Mitchel, 2002, Lorito *et al.*, 1996; Weller *et al.*, 2002), y proteinasas (Ait-Lahsen *et al.*, 2001), compuestos que permiten la degradación de la pared celular del hospedero.

La capacidad antagonista de *Trichoderma* depende de la especificidad de la cepa aislada. En 1986, Mihuta-Grimm y Rowe probaron la capacidad antagonista de 255 cepas de *Trichoderma* aisladas de diferentes lugares, encontrando que

sólo el 15% de estas fueron efectivas en el control de *Rhizoctonia*; asimismo, en base a sus resultados, reportan que las cepas aisladas del mismo lugar son más efectivas que las traídas de fuera.

Antibiosis

La antibiosis se produce durante las interacciones que involucran compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Benítez *et al.*, 2004). Los antibióticos secretados por los organismos antagonistas pueden ser volátiles o no volátiles y las diferentes especies de *Trichoderma* pueden producir ambos tipos, mostrando una fuerte acción inhibitoria debido a la producción de estos compuestos. Sivasithamparam y Ghisalberti (1998) reportaron 43 sustancias producidas por *Trichoderma* con actividad antibiótica. Algunas especies y cepas de *Trichoderma* han presentado actividad biocontroladora por medio de compuestos como pironas alquilos, isonitrilos, policétidos, peptaiboles, dicetopiperazinas, sesquiterpenos, y esteroides (Howell, 1998; Vey *et al.*, 2001). Entre estos compuestos se pueden mencionar al alcohol isopropílico, viridepirinina (Wheatly *et al.*, 1997, Bruce *et al.* 2000; Evidente *et al.* 2003, Chakraborty *et al.* 2004), también a la trichodermina (Dennis y Webster, 1971), gliovirina y gliotóxina (Howell y Stipanovic, 1995; Lumsden *et al.*, 1992; van Tilburg y Thomas, 1993), además de compuestos furanónicos antimicrobiales como la 3-(1-haxanil)-5-hidroxi-5-metil-2,5(H) furanona (Paulitz *et al.*, 2001) y la 6-pentil- β -pirona (Cooney *et al.*, 2001).

Micoparasitismo

El antagonismo de *Trichoderma* es un proceso complejo que involucra quimiotropismo (Chet, 1987; Papavizas, 1985.), reconocimiento mediado por

lectinas, y la formación de estructuras que van a hacer que se ancle y penetre al hospedero. El parasitismo es uno de los mecanismos por el cual las especies del género *Trichoderma* antagonizan a otros hongos (Inbar y Chet, 1995). *Trichoderma* es considerado como un organismo necrotrófico (Barnett y Binder, 1973) mata al hongo y luego le extrae sus nutrientes. Es un proceso muy complejo que involucra una serie de eventos secuenciales como el reconocimiento, ataque y subsiguiente penetración y muerte del huésped (Benítez *et al.*, 2004). También se ven involucrados cambios morfológicos, como el enrollamiento y la formación de estructuras tipo apresorios las cuales contienen altas concentraciones de soluciones osmóticas que sirven para penetrar al huésped (McIntyre *et al.*, 2004). *Trichoderma* se une al patógeno por enrollamiento, enganchándose o por medio de las estructuras tipo apresorio, posteriormente penetra la pared celular por secreción de enzimas líticas como β -glucanasas (Haran *et al.*, 1995; Lora *et al.*, 1995; Lorito *et al.*, 1994), quitinasas (Harman *et al.*, 1993; De la Cruz *et al.*, 1992; Carsolio *et al.*, 1994; Elad *et al.*, 1983) y proteinasas (Geremia *et al.*, 1993). El reconocimiento, unión y enrollamiento de *Trichoderma* alrededor de la hifa del patógeno son eventos primarios que son desencadenados por el reconocimiento de diferentes señales (Inbar y Chet, 1995) que preceden al daño de la hifa (Benhamou y Chet, 1993; Elad *et al.*, 1983; Inbar y Chet, 1994), seguidos por una serie de eventos que van a terminar en la degradación del hospedero.

La participación de enzimas degradadoras de pared celular fúngica en la acción micoparasitica de *Trichoderma* ha sido demostrada en varias ocasiones (Benhamou y Chet, 1993; Cherif y Benhamou, 1990; Elad *et al.*, 1982,1983). Haran y colaboradores (1985) reportaron la secreción de seis diferentes enzimas quitinolíticas por parte de una cepa de *T. harzianum* cultivada en medio líquido con quitina como única fuente de carbono. Se ha observado que algunas especies de *Trichoderma*, cuando se encuentra en composta con madera fresca y en presencia de *Rhizoctonia solani*, no atacan al patógeno, pero una vez que la madera entra en descomposición y la cantidad de celulosa disponible se ve

reducida, se activan los genes que van a codificar para quitinasas las cuales ayudan a parasitar al patógeno (Benhamou y Chet, 1997). Para protegerse de su propia maquinaria enzimática, *T. harzianum* presenta un gen, que se expresa en presencia de *Botrytis cinerea*, el cual codifica para un inhibidor de quitinasa incorporado en la pared celular de *T. harzianum* que previene la lisis por las enzimas secretadas por el propio hongo (Lora *et al.*, 1995).

Hongos fitopatógenos asociados a enfermedades de la madera en vid en la costa de Ensenada

Urbez-Torres y colaboradores (2008) realizaron una serie de muestreos en seis viñedos de la zona vitivinícola de Ensenada, en los cuales encontraron la presencia de dos especies de la familia Botryosphaeriaceae: *L. theobromae* y *D. seriata*; sin embargo, estos muestreos se enfocaron únicamente a las plantas con síntomas de brazo muerto, y no se buscó la presencia de otros hongos asociados a enfermedades de la madera. Para identificar los hongos asociados a distintas enfermedades de la madera de la vid en plantas adultas y conocer el impacto de estos patógenos en la zona vitivinícola de Ensenada, Baja California, Hernández-Martínez y colaboradores (2008) realizaron una serie de muestreos en diferentes viñedos de los valles de Guadalupe, Santo Tomás, San Vicente y San Antonio de las Minas. Los resultados confirmaron la existencia de al menos varios géneros de hongos infectando a plantas de vid. Las especies fúngicas aisladas fueron *Phomopsis viticola*, *P. chlamydospora*, *Phaeacremonium sp.*, *Cylindrocarpon sp.*, y distintas especies de Botryosphaeriaceae. Dentro de esta familia se pudieron identificar cuatro especies, siendo estas *Diplodia seriata*, *Fusicoccum australe*, *Neofusicoccum vitifusiforme* y *Diplodia corticola* (Candolfi-Arballo, 2009).

Justificación

Las enfermedades de la madera de vid, ocasionadas principalmente por hongos se encuentran dentro de las más importantes a nivel mundial ya que pueden llegar a ocasionar importantes pérdidas económicas. El modo en que los hongos infectan a la planta es a través de las heridas producidas especialmente durante la poda de las partes leñosas. Los síntomas de las enfermedades de la madera en vid ocasionadas por hongos, incluyen un lento decaimiento y gangrena regresiva, llegando, en casos severos a causar la muerte. Aunque se han probado varias alternativas para el control de estas enfermedades hasta ahora no existe una medida efectiva. Una opción de protección para las heridas de poda es la aplicación de microorganismos benéficos como *Trichoderma* spp. Aunque ya existen en el mercado varios productos a base de estos hongos, estas han sido aisladas de condiciones ambientales diferentes y evaluadas para diferentes hongos, por lo que su efecto podría ser menor en la protección contra hongos de la madera que el de cepas aisladas del mismo campo de cultivo de vid donde será aplicado. Por esta razón, en este trabajo se evaluó el desempeño *in vitro* de varias cepas del genero *Trichoderma* aisladas de plantas de vid de la zona vitivinícola de Ensenada, frente especies causantes de enfermedades de la madera, comparando los resultados obtenidos con la eficiencia de una cepa comercial. Los resultados derivados en este trabajo servirán para determinar la potencialidad que presentan estas cepas para ser utilizadas como control biológico de los hongos que afectan a la madera de la vid en la Costa de Ensenada.

Hipótesis

Cepas de *Trichoderma* spp aisladas de los viñedos de la región puede ser efectivos en el control de crecimiento de hongos patógenos de la madera de vid.

Objetivos

Objetivo General.

Identificar el efecto *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp aisladas en viñedos de la costa de Ensenada, Baja California sobre hongos patógenos de la madera de la vid aislados del mismo lugar.

Objetivos específicos.

1. Identificar a nivel de especie aislados de *Trichoderma* aisladas en viñedos de la costa de Ensenada, B.C.
2. Cuantificar el porcentaje de inhibición del crecimiento de hongos patógenos de la madera de vid atribuible a la presencia de aislados de *Trichoderma* spp nativas.
3. Evaluar el efecto de compuestos volátiles producidos por aislados de *Trichoderma* spp sobre el crecimiento de hongos patógenos de la madera de la vid.

4. Evaluar el efecto de compuestos no volátiles producidos por aislados de *Trichoderma* spp sobre el crecimiento de hongos patógenos de la madera de la vid

III

Materiales y métodos

Obtención de cepas de hongos patógenos

Las cepas de *Diplodia seriata*, *Fusicoccum australe*, *Neofusicoccum vitifusiforme*, *Diplodia corticola*, *Cylindrocarpon sp.* y *Phaeoconiella chlamydospora* forman parte de la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Todas fueron aisladas en la región vitivinícola de la Costa de Ensenada, mediante muestreos en diferentes viñedos de los Valles de Guadalupe, Santo Tomás, San Vicente y San Antonio de las Minas. *Diplodia seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *Phaeoconiella chlamydospora* fueron aisladas del Valle de Guadalupe de plantas con síntomas de decaimiento, mientras que *Cylindrocarpon sp.* fue aislada de plantas de vid con síntomas de pie negro en el Valle de San Vicente. Las cepas de *Phaeoacremonium aleophilum* y *Lasiodiplodia theobromae* fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Douglas Gubler de UC-Davis.

Obtención de aislados de *Trichoderma*.

Los aislados de *Trichoderma* fueron obtenidas de muestras de tallos y cordones de plantas de vid colectadas en diferentes campos vitícolas de la costa

de Ensenada. Una vez en el laboratorio el material vegetal fue cortado en trozos de aproximadamente 10 cm, se lavaron con agua corriente por un minuto, posteriormente se pasaron por alcohol y se flamearon durante 10 segundos para eliminar cualquier microorganismo presente en la corteza. Una vez secos, los trozos de madera, se colocaron sobre una cama de papel secante humedecida con agua destilada que se encontraba dentro de una caja de plástico esterilizada a 121°C y 20 atm de presión por 15 min. Las cajas se sellaron, etiquetaron y guardaron en completa oscuridad a temperatura ambiente por aproximadamente 2 semanas. Una vez que se observó la presencia de micelio sobre los trozos de madera, este se transfirió a cajas de Petri conteniendo medio PDA con tetraciclina a 25 mg/ml (PDA-tet) usando un palillo de dientes estéril. Para obtener cultivos puros se tomaron ápices de hifas en crecimiento que se transfirieron a medio de PDA. Para el mantenimiento del cultivo se hicieron resiembras periódicas tomando un fragmento de micelio cada vez. Para almacenamiento a largo plazo, esporas y micelio se colocaron en tubos de 2 ml que contenían glicerol al 50% en agua y se mantuvieron a -80°C.

Con fines comparativos, en los estudios realizados se incluyó una cepa comercial de *Trichoderma* conocida como PHC[®]T-22[®] y la cual fue etiquetada como T-22. Esta cepa es un híbrido de varias cepas de *T. harzianum*. Se incluyó además una cepa de *T. atroviridae* perteneciente al Laboratorio de Microbiología del CICESE.

Identificación morfológica de los aislados

La identificación morfológica de los aislados se hizo basándose en el olor y color del cultivo, la forma y tamaño de las conidias, la tasa de crecimiento, etc., utilizando la información contenida en el sitio de Internet (<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>), este sitio provee claves

interactivas, imágenes y descripciones, distribución y nomenclatura del género de *Trichoderma*.

Evaluación de los mecanismos de inhibición de *Trichoderma* sobre hongos patógenos de la madera de vid

Se evaluaron tres mecanismos de inhibición de crecimiento ejercido por las cepas de *Trichoderma*: antagonismo, secreción de compuestos volátiles (CV) y secreción de compuestos no volátiles (CNV).

Inhibición del crecimiento de *Botryosphaeria* spp por *Trichoderma*

Para estimar los efectos de las 8 diferentes cepas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de los hongos patógenos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae: *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae*, se utilizó el siguiente procedimiento: Todos los hongos fueron crecidos por cuatro días medio PDA. De esos cultivos se cortaron discos de micelio con un sacabocados estéril de 5 mm de diámetro. Usando una plantilla previamente diseñada para el propósito, se colocó un disco del micelio de *Trichoderma* a una distancia de 10 mm del borde de la caja de Petri y a 80 mm de distancia de este, se colocó un disco micelial del patógeno. Este procedimiento se repitió cinco veces para cada combinación *Trichoderma*-patógeno, más un control negativo para cada patógeno en el que crecieron en ausencia del antagonista. Todas las cajas fueron incubadas durante siete días a 25 °C.

La inhibición del crecimiento del patógeno por *Trichoderma* se estimó por medio de la ecuación (1) propuesta por Royse y Ries (1978), y utilizada por Demirci *et al.* (2009) para determinar la eficacia de *Verticillium biguttatum* en el control de la enfermedad en papa causado por *Rizhoctonia solani*. Esta ecuación

ya ha sido utilizada para evaluar diferentes cepas de *Trichoderma*, en 1987 Whipps evaluó *T. harzianum* Rifai y *T. viride* Pers. frente a varios hongos fitopatógenos. Akadémiai (2004) probó diferentes cepas de *Trichoderma* frente a *L. thobromae*. Chakraborty y Chatterjee (2008) evaluaron el efecto inhibitorio en el crecimiento de *Fusarium solani* ejercido por cinco cepas de *Trichoderma* por medio de esta ecuación. En la figura 1, se muestra la forma como fueron medidas las distancias mínimas y máximas.

$$\text{Porcentaje de inhibición} = [100 \times (r_1 - r_2) / r_1] \quad (1)$$

Donde:

r_1 = distancia máxima alcanzada por el patógeno (mm) siete días después de la inoculación

r_2 = distancia mínima alcanzada por el patógeno (mm) siete días después de la inoculación

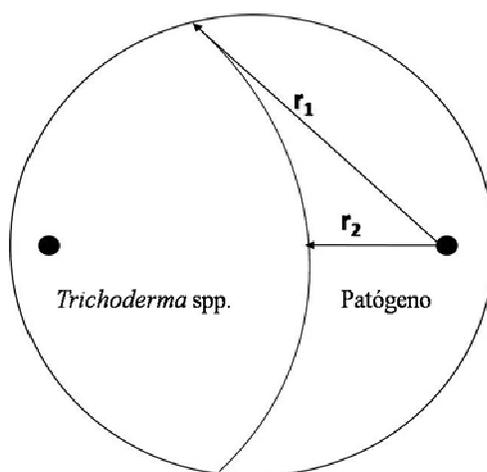


Figura 1. Diagrama de la inoculación en cultivo dual de los patógeno y el potencial antagonista. El parámetro de evaluado fue el porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

Evaluación de antagonismo de cepas de *Trichoderma* sobre *Cylindrocarpon* sp, *P. aleophilum* y *P. chlamydospora*.

Para evaluar el antagonismo hacia las cepas de *Cylindrocarpon* sp., *P. aleophilum* y *P. chlamydospora*, debido a que la tasa de crecimiento de estos tres hongos es muy lenta en relación con la de *Trichoderma* no se pudo hacer la evaluación con micelio, por lo que se tomó la decisión de trabajar con esporas de los patógenos usando este procedimiento, los hongos se pusieron a crecer en medio de PDA durante 3 semanas a 25°C, de este cultivo se obtuvo una solución de esporas mediante una serie de lavados realizados con agua destilada estéril sobre el micelio del hongo. La suspensión se transfirió a un tubo de ensayo y se hicieron una serie de diluciones que se espatularon sobre medio PDA-tet y se conservó la suspensión en refrigeración. Las cajas inoculadas se dejaron crecer por dos días y se seleccionó la dilución que visualmente se distribuyera uniformemente en la caja de Petri formando colonias individuales que en cinco días formarían un micelio uniformemente extendido sobre toda la superficie del medio de cultivo. Cada solución de esporas de hongo así obtenida, fue espatulada en medio PDA-tet. Después de incubar las cajas por 24 h a 25 °C, se colocó en el centro un disco micelial de *Trichoderma*.

Las cepas de *Trichoderma* seleccionadas para este estudio fueron: SACH21-3, CCMT01-1 y SACH26-1, ya que fueron las que mostraron mayor potencial de control de acuerdo a ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio. La evaluación de los efectos de las cepas de *Trichoderma* sobre los patógenos se hizo de manera visual durante siete días después de la inoculación, observando si había crecimiento o no del patógeno. Todos los tratamientos tuvieron cinco réplicas y un control negativo también con cinco réplicas.

Inhibición de hongos de la madera por compuestos volátiles de *Trichoderma*

Para la evaluación de la inhibición de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* se utilizó el método descrito por Dennis y Webster (1970a). Se colocó un disco micelial del hongo patógeno en el centro de una caja de Petri de 90 mm con medio PDA-tet. Posteriormente las bases de las cajas se invirtieron sobre otra base que contenía un disco micelial del antagonista; las cajas se sellaron herméticamente con Parafilm® y se incubaron a 25°C durante 7 días. El control consistió en cajas con el patógeno, invertidas sobre cajas con PDA-tet estéril. La evaluación de los efectos de los aislados de *Trichoderma* sobre los patógenos se hizo de manera visual siete días después de la inoculación, observando si había crecimiento o no del patógeno. Todos los tratamientos tuvieron 5 repeticiones.

Para las cepas de *Cylindrocarpon sp.*, *P. aleophilum* y *P. chlamydospora* se siguió el mismo procedimiento, pero en vez de utilizar discos miceliales del patógeno, se espatuló una solución de esporas del hongo obtenida de la misma forma como se describió para la evaluación del antagonismo. Todos los tratamientos tuvieron cinco réplicas.

Inhibición de hongos de la madera por compuestos no volátiles

Para determinar la capacidad de los aislados de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de los patógenos *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae*, se utilizó el método descrito por Dennis y Webster (1970b) y modificado por Chambers (1993). Primeramente, se obtuvieron círculos de 80 mm de diámetro de una membrana de diálisis (Spectrapor membrane tubing, Spectrum medical industries, Inc.), los cuales fueron hervidos por 1 hora para eliminar las sales, el agua se reemplazó y se esterilizaron a 121°C y 20 atm de presión por 15

min. Las membranas húmedas se colocaron sobre medio PDA-tet. En el centro de la caja, se colocó un disco micelial de 5 mm de *Trichoderma* sobre la membrana y se incubaron en oscuridad total a 25° C. Después de 36 horas se marcó sobre la base de la caja el área de cobertura que tuvo el micelio en el medio de cultivo, se retiró la membrana junto con el micelio de la cepa de *Trichoderma*, y se reemplazó con un círculo de micelio del patógeno. Las cajas se incubaron a 25°C en oscuridad durante una semana. Con el fin de determinar si la cepa de *Trichoderma* tenía efecto fungistático o fungicida, los discos miceliales del patógeno que no mostraron crecimiento después de ese periodo, fueron transferidos a nuevas cajas con medio de cultivo fresco y se incubaron durante dos semanas bajo las mismas condiciones. Todos los tratamientos incluyendo el control, que consistió en cajas sin *Trichoderma* spp, tuvieron cinco réplicas.

Para las cepas de *Cylindrocarpon* sp., *P. aleophilum* y *P. chlamydospora* se siguió el mismo procedimiento, pero en vez de utilizar discos miceliales del patógeno, se plaqueó una solución de esporas del hongo sobre el medio de cultivo después de retirar la membrana sobre la cual había crecido la cepa de *Trichoderma*. Todos los tratamientos incluyendo el control sin el antagonista, tuvieron cinco réplicas.

Microscopía de las interacciones de las *Trichoderma* spp sobre patógenos de la madera de vid.

Para la obtención de imágenes por medio de microscopia, se realizaron cultivos duales *Trichoderma*-patógeno sobre medio agar/agua (1.5%), se incubaron a 25 °C durante 7 días y posteriormente se hicieron cortes de las zonas de interacción de los organismos y se observaron por medio de la técnica de bloque invertido (Hickey *et al.*, 2004). Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio invertido modelo Axiovert 200 (Zeiss®), y fueron capturadas con una

cámara AxioCam HRc y se procesaron usando el software Axiovision ver. 2.7 (Zeiss®).

Análisis estadístico

Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos probados, los datos fueron analizados mediante análisis de varianza, y cuando fue el caso se realizó la prueba de medias Tukey al 5%. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa estadístico XLStat (Addinsoft, 2009).

Caracterización de las cepas de *Trichoderma* con actividad antifúngica.

Extracción de DNA de las cepas de *Trichoderma* spp.

Los hongos seleccionados se incubaron en caldo de papa dextrosa (PDB, Difco, 15 mg/L) a 25°C con agitación continua a 180 rpm en un incubador Environ Shaker durante 5 días. Una vez transcurrido dicho periodo, el micelio fue recuperado del medio de cultivo y se colocó en un tubo de 1.5 ml (Eppendorf Int.) y posteriormente se deshidrató usando un liofilizador FreeZone 2.5 de Labconco.

El micelio liofilizado, se trituró usando una varilla de vidrio estéril y el DNA genómico se obtuvo usando un kit de extracción de DNA (Kit DNeasy Plant Tissue, Quiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para comprobar la presencia de DNA genómico, se realizó una electroforesis de 5 µl de las muestras obtenidas en un gel de agarosa al 1.5% con Bromuro de Etidio a 0.5 µg/ml (Invitrogen®) y se utilizó con un marcador de peso molecular de una kilobase (ExACTGene DNA, Fisher Labs), para corroborar el tamaño del DNA obtenido. La electroforesis se hizo en una cámara BioRad® a 60 Volts durante 45 min en Tris-acetato-EDTA (TAE). El DNA se observó bajo luz ultravioleta (UV) usando un

transiluminador BioRad y la captura de imágenes del gel se realizó por medio del software Quantity One[®]. El DNA genómico se mantuvo en tubos de 1.5 ml a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

Amplificación de los fragmento de ITS de los aislados de *Trichoderma*

Para la identificación de los aislados de *Trichoderma*, se utilizaron los oligonucleótidos universales específicos para hongos: ITS1 (5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3') como cadena conductora e ITS4 (5'-tcctccgcttattgatatgc-3') como cadena complementaria (White *et al*, 1990). Estos cebadores amplifican la región del espaciador interno transcrito (ITS por sus siglas en inglés) del RNA ribosomal que incluye las regiones ITS1 e ITS2 (5.8S) con un tamaño aproximado de 560 pb.

Para la PCR la mezcla de reacción contenía 12.5 µl de buffer FailSafe™ PCR 2X PreMix E (Cat # FSP995E, Epicentre, Biotechnologies), 0.5 µl de cada cebador a 100 pM, 5 µl de DNA genómico, 0.5 µl de enzima Vent (sequencing grade, 500 µl, Promega, Cat. # M203D) y el resto de agua destilada para un volumen final de 25 µl. La amplificación se realizó en un termociclador NYX Technik ATC 401, empleando un ciclo inicial de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineación a 55°C, y 1 min de extensión a 72°C y un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos del PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% con Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml), usando TAE 1X como tampón de corrida (45 min; 60 Volts).

Purificación y secuenciación

Los productos de PCR se purificaron usando un kit de purificación (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Cat #28704) siguiendo las instrucciones del fabricante y la presencia del fragmento de aproximadamente 460 a 500 pb se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa como se describió anteriormente. Las muestras positivas se mandaron a secuenciar a Eton Bioscience, Inc., San Diego, CA.

Para el análisis, las secuencias se recuperaron usando el software Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pth Ltd), a la par, se recuperaron secuencias de ITS de *Trichoderma* spp del “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Con las secuencias obtenidas y las recuperadas se realizó un alineamiento múltiple usando el programa ClustalX 2.0.11 (Thompson, 1994) usando los parámetros por defecto. El alineamiento se corrigió manualmente usando el programa BioEdit Sequencer Alignment Editor (version 7.0. 9. 0; Tom Hall, Isis Pharmaceuticals, Inc, Carlsbad, CA). Finalmente, para el análisis filogenético se utilizó el software MEGA 4 usando el algoritmo Neighbor-Joining (vecino más cercano). La estabilidad de las ramas se calculó mediante 1000 réplicas de bootstrap (Hills y Bull, 1993).

IV

Resultados

Aislamiento e identificación de aislados *Trichoderma* spp.

Se obtuvieron 6 aislados de dos localidades de la zona vitivinícola de la Costa de Ensenada. Los aislados, el sitio de muestreo y la clave asignada para el cepario de hongos del Laboratorio de Microbiología del CICESE se presentan en la Tabla III.

Tabla III. Localización de los sitios donde se aislaron *Trichoderma* spp.

Localización	Vinícola	Variedad de vid	Designación
Valle de Guadalupe	Chateau Camou	Cabernet Sauvignon	CCBM46-2
Valle de Guadalupe	Chateau Camou	Merlot	CCMT01-1
Valle de Guadalupe	Chateau Camou	Merlot	CCMT02-2
San Antonio de las minas	Santo Tomás	Shiraz	SASI109-1
San Antonio de las minas	Santo Tomás	Chardonnay	SACH21-3
San Antonio de las minas	Santo Tomás	Chardonnay	SACH26-1

Caracterización morfológica de los aislados de *Trichoderma*.

Aunque todos los aislados, se caracterizaron por tener un rápido crecimiento y presentar micelio blanco y algodonoso durante los primeros días, su crecimiento varió a las 72 horas después de haber sido inoculados (hdi) e incubados a 25°C

en oscuridad. De acuerdo a su morfología y crecimiento, los aislados, se diferenciaron en tres tipos. Las cepas que más crecieron fueron las CCMT01-2 y SACH26-1 con aproximadamente 60 mm en promedio, mientras que las que menos desarrollaron fueron SASI109-1 y CCBM46-2 con 45.2 mm y 43.5 mm respectivamente. La cepa SACH21-3 tuvo un crecimiento intermedio de 52.9 mm.

Los aislados SASI109-1, CCBM46-2, CCMT01-2 CCMT01-1 y SACH26-1, presentaron morfología muy similar durante los primeros 4 días con micelio blanco, fino y poco abundante, además de emanar un fuerte olor a coco. A partir del quinto día, se comenzó a observar la presencia de micelio aéreo y se pudieron diferenciar los miembros de este grupo de aislados ya que, CCMT01-2, CCMT01-1 y SACH26-1 (Figura 2 D, E y F) presentaron una coloración que fue del color crema al amarillo, debido a presencia de conidios, mientras que SASI109-1 y CCBM46-2 no variaron de color.

El micelio del aislado SACH21-3 fue plano, es decir no desarrolló micelio aéreo, y a las 36 hdi se observó la presencia de densos conidios de color verde (Figura 2C). En este aislado, no se detectó olor alguno.

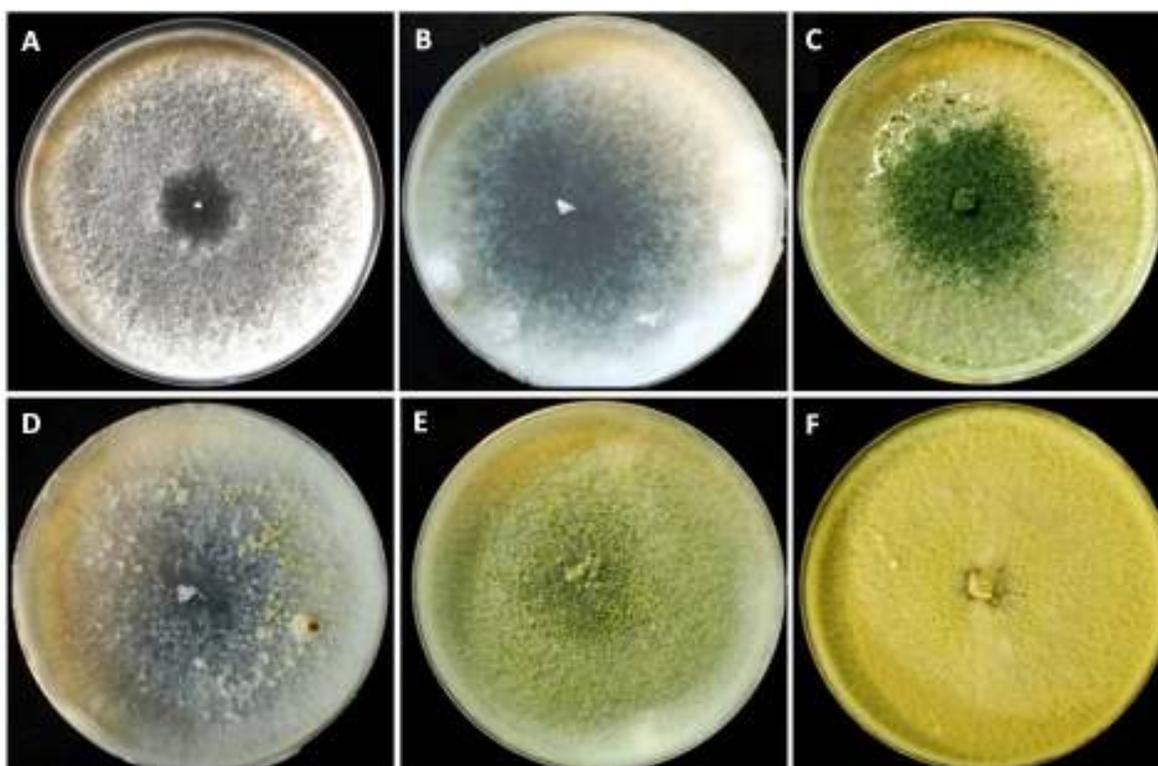


Figura 2. Morfología de las colonias de los seis aislados después de 14 días de inoculación en medio PDA a temperatura ambiente de 25 °C. A. SASI109-1, B. CCBM46-2, C. SACH21-3, D. CCMT01-2, E. CCMT01-1, F. SACH26-1.

Evaluación del antagonismo de los aislados de *Trichoderma* ante hongos patógenos de vid.

Evaluación del antagonismo de la cepa PHC®T-22®

Los resultados del estudio del crecimiento dual entre la cepa comercial PHC®T-22® (T-22) y las cinco especies de la familia Botryosphaeriaceae se muestran en la Figura 3. Los valores representan la media de cinco réplicas. Las pruebas de separación de medias de Tukey se presentan en las figuras de la 17 a la 21. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos

probados. El mayor porcentaje de inhibición del crecimiento debido al antagonismo de esta cepa de *Trichoderma*, se observó hacia *D. corticola* con 56.24 %, mientras que el menor efecto se presentó sobre *N. vitifusiforme* con 43.40 %.

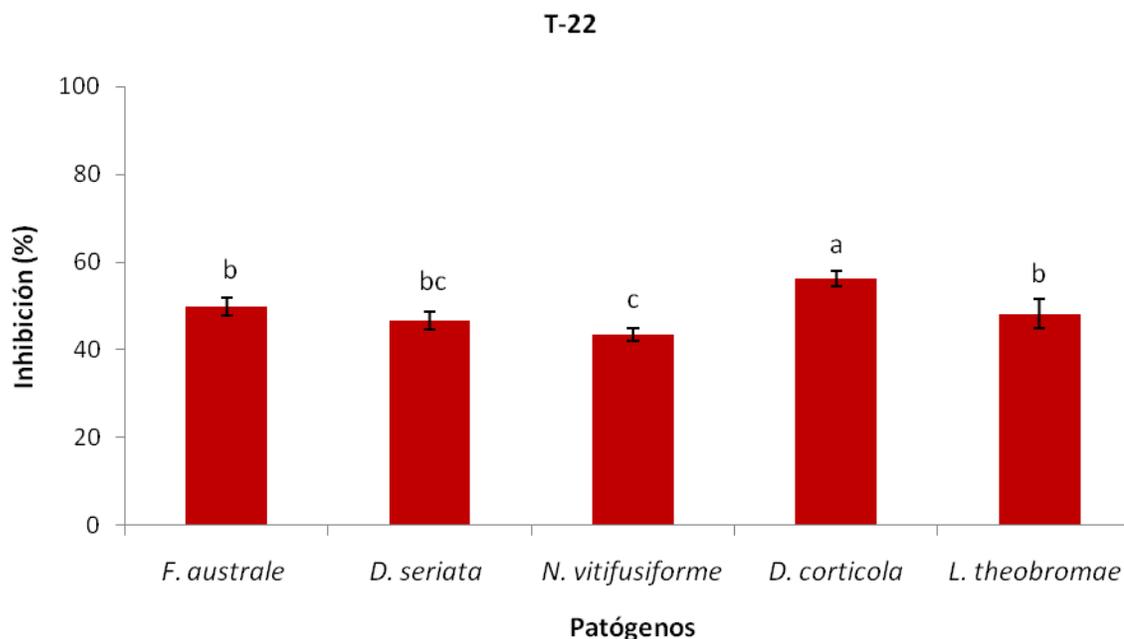


Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido a la cepa comercial T-22. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Evaluación del antagonismo del aislado SASI109-1

Los porcentajes de inhibición del crecimiento ejercido por el aislado SASI109-1 sobre los diferentes patógenos de la familia Botryosphaeriaceae se muestran en la Figura 4. Se puede observar que SASI109-1 inhibió en mayor

proporción el crecimiento de cuatro de las cinco especies de patógenos evaluadas. El patógeno menos inhibido (con 23.81%) fue *F. australe*.

En la Figura 5 se muestran ejemplos del antagonismo de SASI109-1 hacia algunos de los patógenos evaluados. Los resultados obtenidos de este estudio, mostraron que SASI109-1 ejerció el mismo porcentaje de inhibición que la cepa comercial, sobre los patógenos *L. theobromae*, *D. seriata* y *N. vitifusiforme*. Sin embargo, su efecto inhibitorio de 23.81% sobre los patógenos *D. corticola* y *F. australe*, fue significativamente inferior que el de T-22 que alcanzó un porcentaje de 50% (tabla IV).

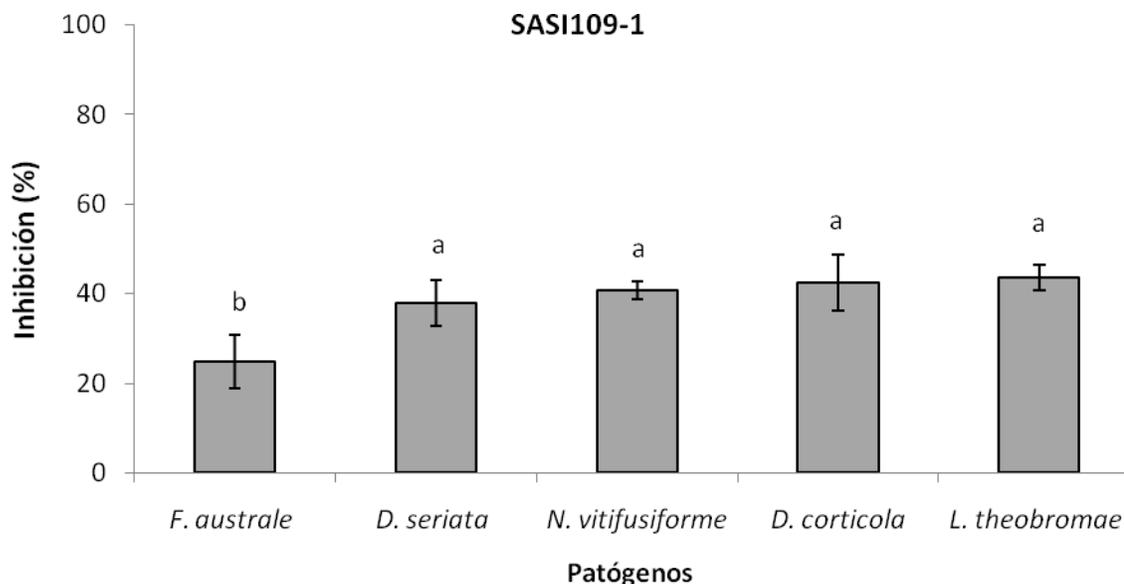


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido al aislado SASI109-1. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

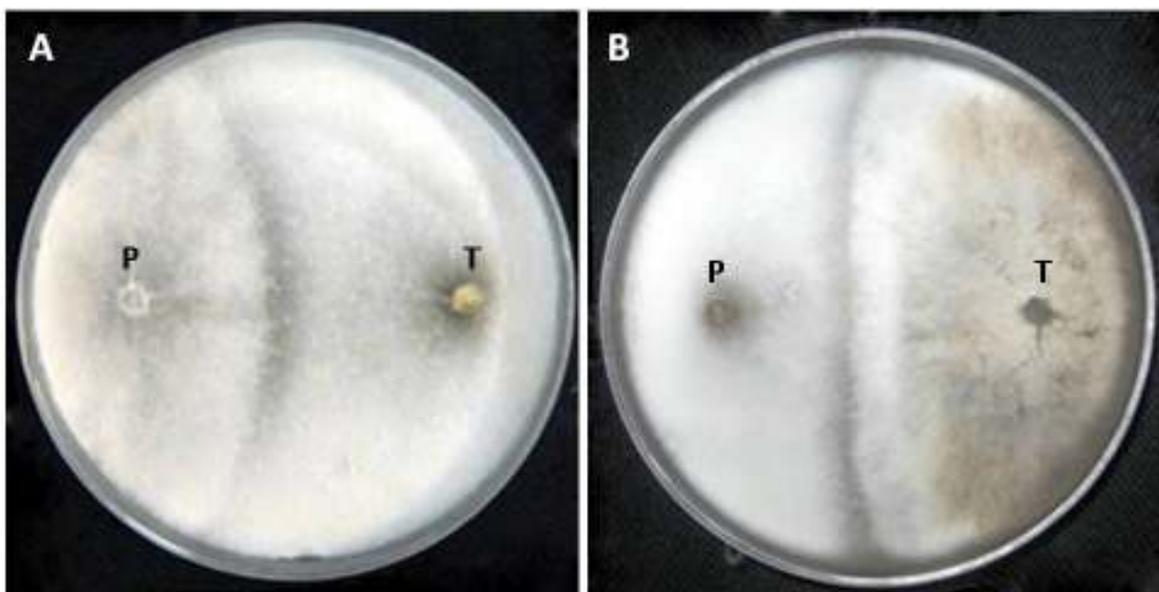


Figura 5. Inhibición del crecimiento de dos anamorfos de *Botryosphaeria* por parte del aislado SASI109-1. A. *F. australe*, B. *N. vitifusiforme*. La letra T muestra el sitio de inoculación de *Trichoderma*, mientras que P indica el del patógeno.

Tabla IV. Porcentaje de inhibición ejercido por los aislados SASI109-1 y T-22 sobre cinco especies de la familia Botryosphaeriaceae.

	<i>F. australe</i>	<i>D. seriata</i>	<i>N. vitifusiforme</i>	<i>D. corticola</i>	<i>L. theobromae</i>
Cepa	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)
SASI109-1	23.81 (5.57)a	37.95 (4.62)a	40.80 (1.82)a	42.75 (4.91)a	43.46 (2.54)a
T-22	49.87 (1.95)b	46.61 (2.08)a	43.40 (1.47)a	56.24 (1.65)b	48.16 (3.33)a

\bar{x} = media; DS = desviación estándar. Medias en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes a ($p < 0.05$).

Evaluación del antagonismo del aislado CCBM46-2

Los resultados de esta evaluación mostraron que el aislado CCBM46-2, inhibió de manera significativa el desarrollo de todos los hongos patógenos

probados (Figura 6). Los hongos sobre los cuales tuvo mayor control fueron *N. vitifusiforme* y *L. theobromae*, mientras que los menos afectados fueron *F. australe*, *D. seriata* y *D. corticola*.

El aislado CCBM46-2 mostró el mismo efecto inhibitorio que la cepa comercial, sobre los patógenos *N. vitifusiforme* y *L. theobromae*, mientras que su efecto fue menor al de la cepa comercial cuando ambos fueron probados contra los patógenos *F. australe*, *D. seriata* y *D. corticola* (Tabla V).

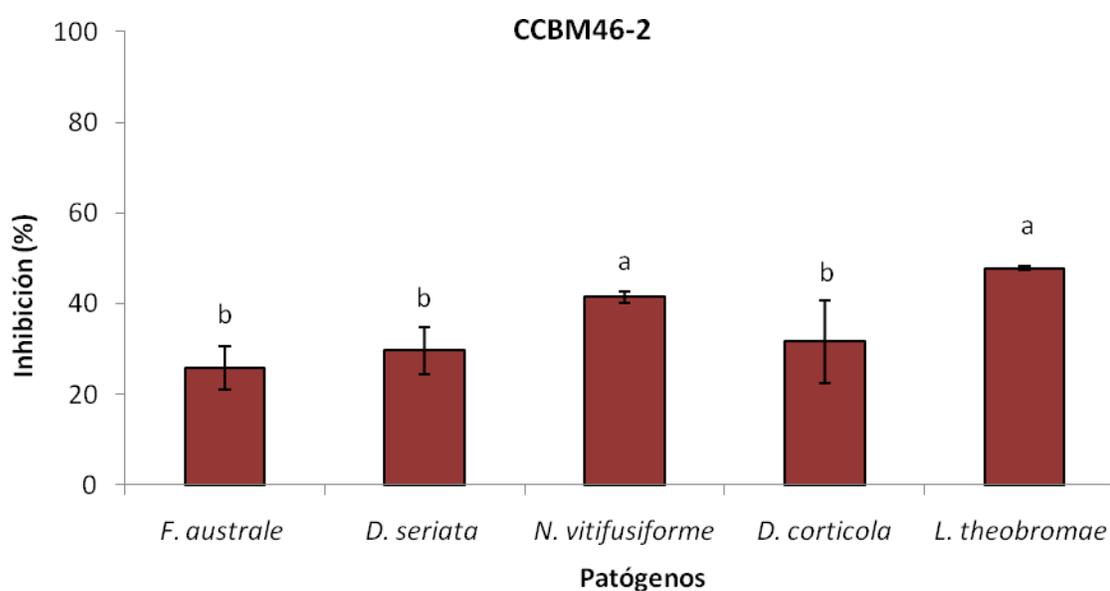


Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido al aislado CCBM46-22. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Tabla V. Porcentaje de inhibición ejercido por el aislado CCBM46-2 y T-22 sobre las diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae.

	<i>F. australe</i>	<i>D. seriata</i>	<i>N. vitifusiforme</i>	<i>D. corticola</i>	<i>L. theobromae</i>
Cepa	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)
CCBM46-2	25.72(4.77)a	29.78(4.50)a	41.39(1.27)a	30.56(8.27)a	47.90(0.35)a
T-22	49.87(1.95)b	46.61(2.08)b	43.40(1.47)a	56.24(1.65)b	48.16(3.33)a

\bar{x} = media; DS = desviación estándar. Medias en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes a ($p < 0.05$).

Evaluación del antagonismo del aislado SACH21-3

El aislado SACH21-3, inhibió el crecimiento de los patógenos de forma significativa (Figura 7). Los mayores porcentajes (más del 54%) de inhibición ocurrieron sobre *F. australe*, *D. seriata*, *D. corticola* y *L. theobromae*. El patógeno *N. vitifusiforme*, también fue inhibido por SACH21-3, pero en menor proporción con 41%. Las Figura 8 A y 8B, muestran de manera clara el impacto de este aislado de *Trichoderma* sobre *F. australe* y *N. vitifusiforme*, en ellas se puede observar que la diferencia que existe entre el crecimiento por la parte central del patógeno con respecto a la periferia del mismo, es mayor en *F. australe* que para *N. vitifusiforme* lo que indica mayor inhibición para el primero

En cuanto al comportamiento de SACH21-3 en relación a la cepa comercial de *Trichoderma*, la Tabla VI muestra que el primero fue más eficiente que la segunda en el control del crecimiento de los hongos patógenos *D. seriata* y *L. theobromae*. Sin embargo, ambos fueron igual de eficientes en el control de los otros tres patógenos estudiados.

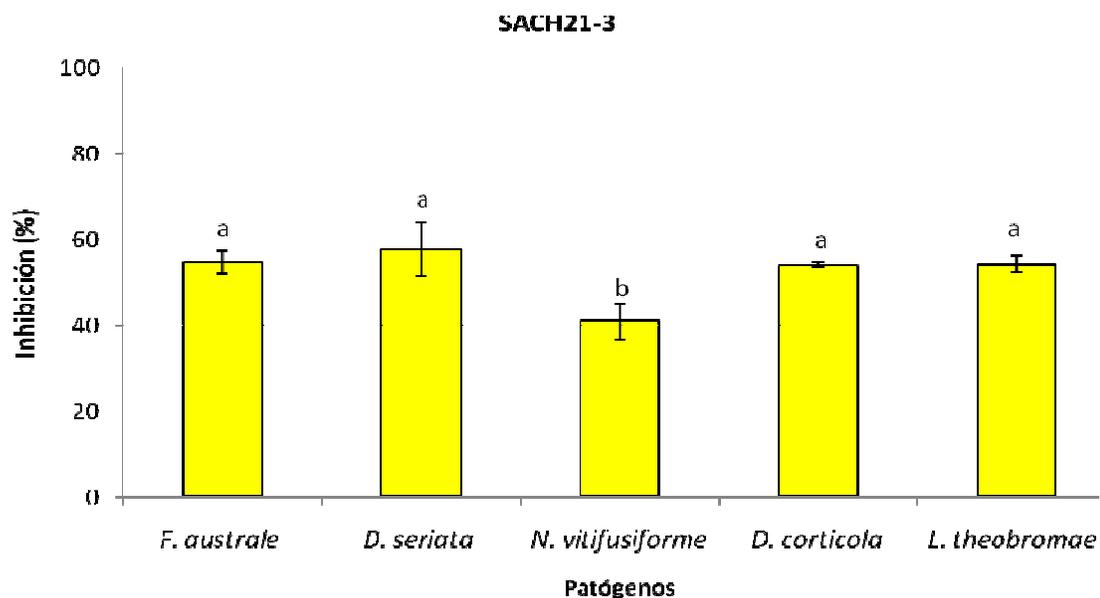


Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido al aislado SACH21-3. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

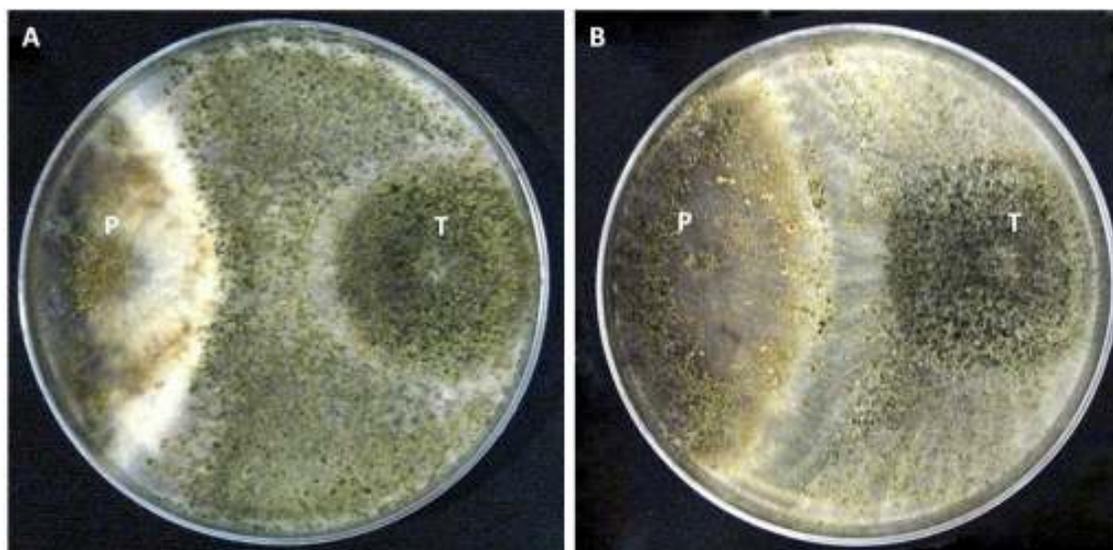


Figura 8. Inhibición del crecimiento de dos diferentes anamorfos de *Botryosphaeria* por parte del aislado SACH21-3. A. *F. australe*, B. *N. vitifusiforme*. La letra T muestra el sitio en donde fue sembrado el aislado de *Trichoderma*, mientras que P indica el del patógeno.

Tabla VI. Porcentaje de inhibición ejercido por el aislado SACH21-3 y T-22 sobre las diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae.

Cepa	<i>F. australe</i>	<i>D. seriata</i>	<i>N. vitifusiforme</i>	<i>D. corticola</i>	<i>L. theobromae</i>
	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)
SACH21-3	54.83(2.64)a	57.81(6.30)a	40.90(4.27)a	54.10(0.78)a	54.16(1.89)a
T-22	49.87(1.95)a	46.61(2.08)b	43.40(1.47)a	56.24(1.65)a	48.16(3.33)b

\bar{x} = media; DS = desviación estándar. Medias en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes a ($p < 0.05$).

Evaluación del antagonismo del aislado CCMT01-2

La eficiencia de CCMT01-2 en el control de los hongos patógenos fue significativamente diferente. Mientras el porcentaje de inhibición sobre *F. australe*, *D. seriata*, *N. vitifusiforme* y *L. theobromae*, fue superior al 34%, sobre *D. corticola* este aislado solo logró porcentajes de inhibición del 18% (Figura 9).

Por otra parte, el aislado CCMT01-2 presentó menor eficacia que la cepa comercial en el control de los patógenos *F. australe*, *D. seriata*, *D. corticola* y *L. theobromae*, pero fue igual de eficiente sobre *N. vitifusiforme* (Tabla VII).

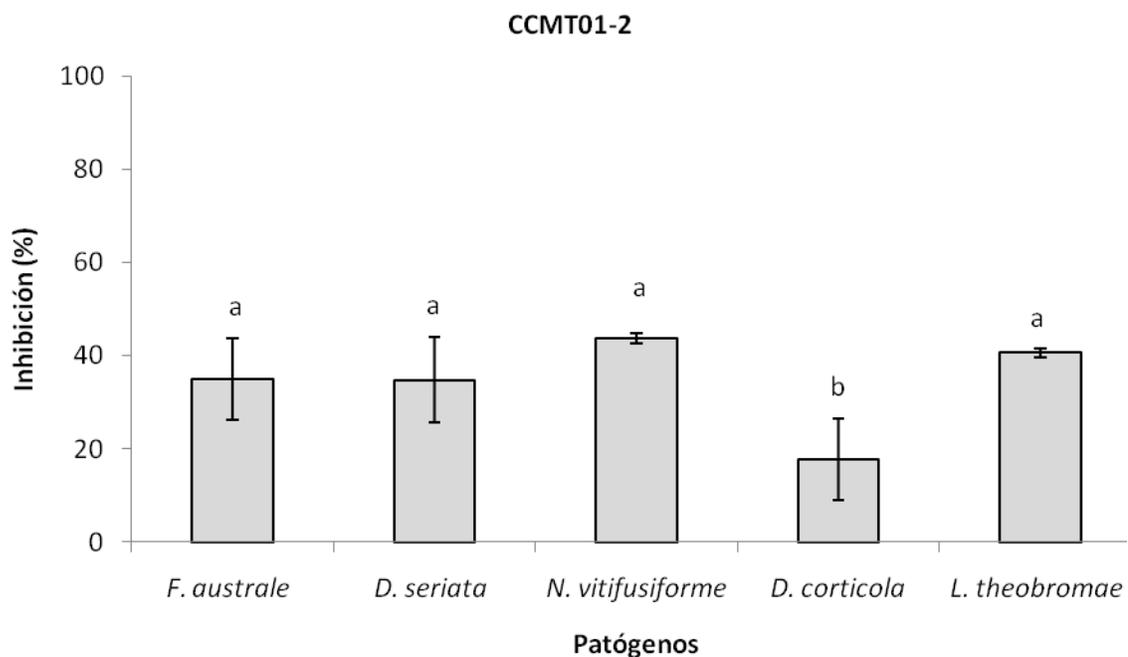


Figura 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido al aislado CCMT01-2. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Tabla VII. Porcentaje de inhibición ejercido por las cepas CCMT01-2 y T-22 sobre cinco diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae

	<i>F. australe</i>	<i>D. seriata</i>	<i>N. vitifusiforme</i>	<i>D. corticola</i>	<i>L. theobromae</i>
Cepa	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)
CCMT01-2	34.98(8.83)a	34.81(9.11)a	43.68(1.15)a	17.83(8.80)a	40.60(0.85)a
T-22	49.87(2.18)b	46.26(2.53)b	43.04(1.42)a	56.24(1.85)b	48.16(3.72)b

\bar{x} = media; DS = desviación estándar. Medias en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes a ($p < 0.05$).

Evaluación del antagonismo del aislado CCMT01-1

El aislado CCMT01-1 mostró valores de inhibición de crecimiento por arriba del 50 % hacia todas las cepas de *Botryosphaeria* en las que fue probado. Los mayores porcentajes de inhibición se observaron hacia *F. australe* (75.52 %), *N. vitifusiforme* (65.78 %) y *L. theobromae* (56.22 %) (Figura 10). En la Figura 11 se observan ejemplos de la inhibición de este aislado de *Trichoderma* hacia los hongos *D. seriata* y *D. corticola*.

El aislado CCMT01-1, fue significativamente superior a la cepa comercial en el control del crecimiento de los patógenos *F. australe*, *N. vitifusiforme* y *L. theobromae*, pero igual de eficiente para inhibir el desarrollo de *D. seriata* y *D. corticola* (Tabla VIII).

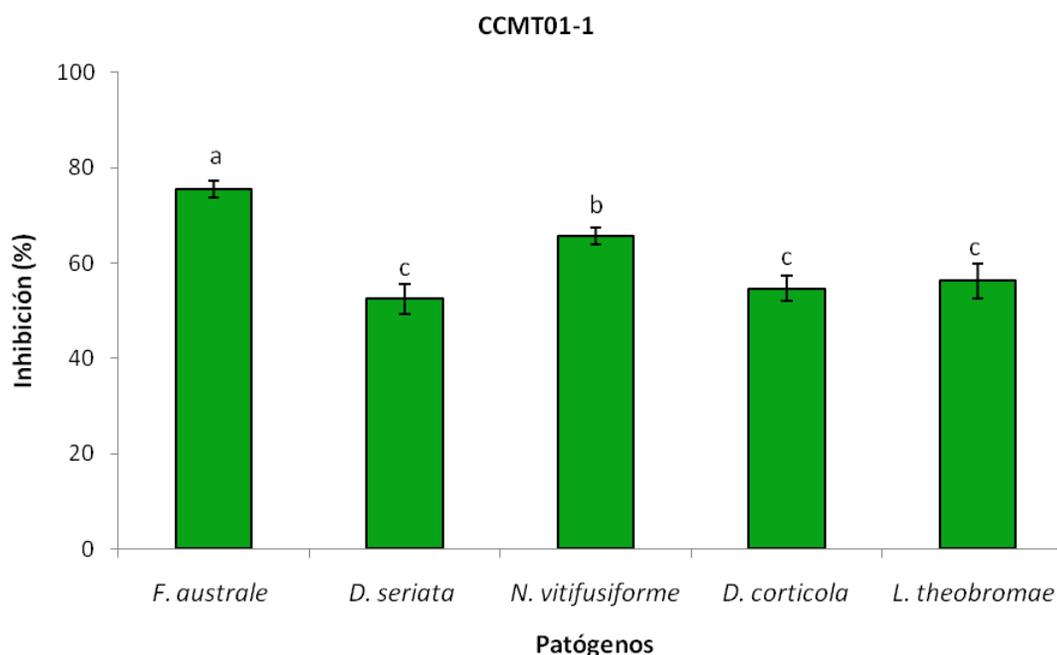


Figura 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido al aislado CCMT01-1. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

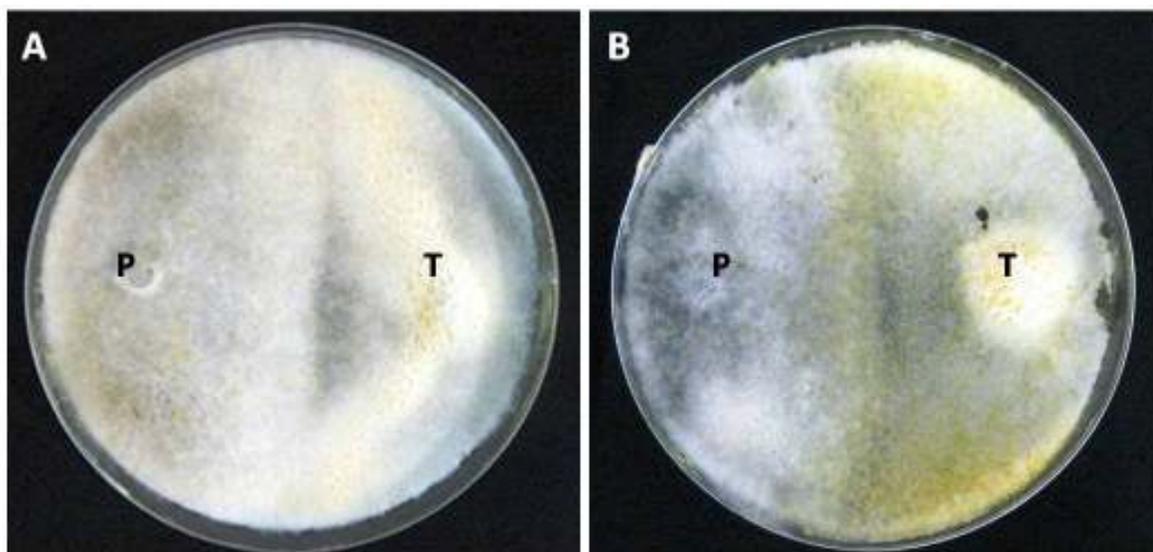


Figura 11. Inhibición del crecimiento de diferentes anamorfos de *Botryosphaeria* por parte del aislado CCMT01-1. A. *D. seriata*, B. *D. corticola*. La letra T muestra el sitio de inóculo de *Trichoderma*, mientras que P indica el del patógeno.

Tabla VIII. Porcentaje de inhibición ejercido los aislados CCMT01-1 y T-22 sobre las diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae

	<i>F. australe</i>	<i>D. seriata</i>	<i>N. vitifusiforme</i>	<i>D. corticola</i>	<i>L. theobromae</i>
Cepa	\bar{X} (DS)	\bar{X} (DS)	\bar{X} (DS)	\bar{X} (DS)	\bar{X} (DS)
CCMT01-1	75.52(1.79)a	52.50(3.16)a	65.78(1.78)a	54.59(2.65)a	56.22(3.69)a
T-22	49.87(1.95)b	46.61(2.08)a	43.40(1.47)b	56.24(1.65)a	48.16(3.33)b

\bar{X} = media; DS = desviación estándar. Medias en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes a ($p < 0.05$).

Evaluación del antagonismo del aislado SACH26-1

La inhibición de crecimiento por parte de SACH26-1 hacia los cinco patógenos, se puede separar en tres grupos significativamente diferentes, *F. australe* y *D. corticola* con los valores más altos, *D. seriata* y *N. vitifusiforme* con

valores medios y *L. theobromae* con el valor más bajo (Figura 12). En la Figura 13 se puede observar la fuerte inhibición ejercida por este aislado hacia *D. seriata* (13A) y *D. corticola* (13B).

El aislado SACH26-1 mostró en todos los casos valores de inhibición superiores a los ejercidos por la cepa comercial T-22 (Tabla IX). El porcentaje mayor de inhibición se observó para *F. australe* (95.74 %) y *D. corticola* (94.43 %), seguidos de *D. seriata* (81.96 %), *N. vitifusiforme* (78.82 %) y finalmente, el valor de inhibición más bajo se encontró para *L. theobromae* (56.47 %).

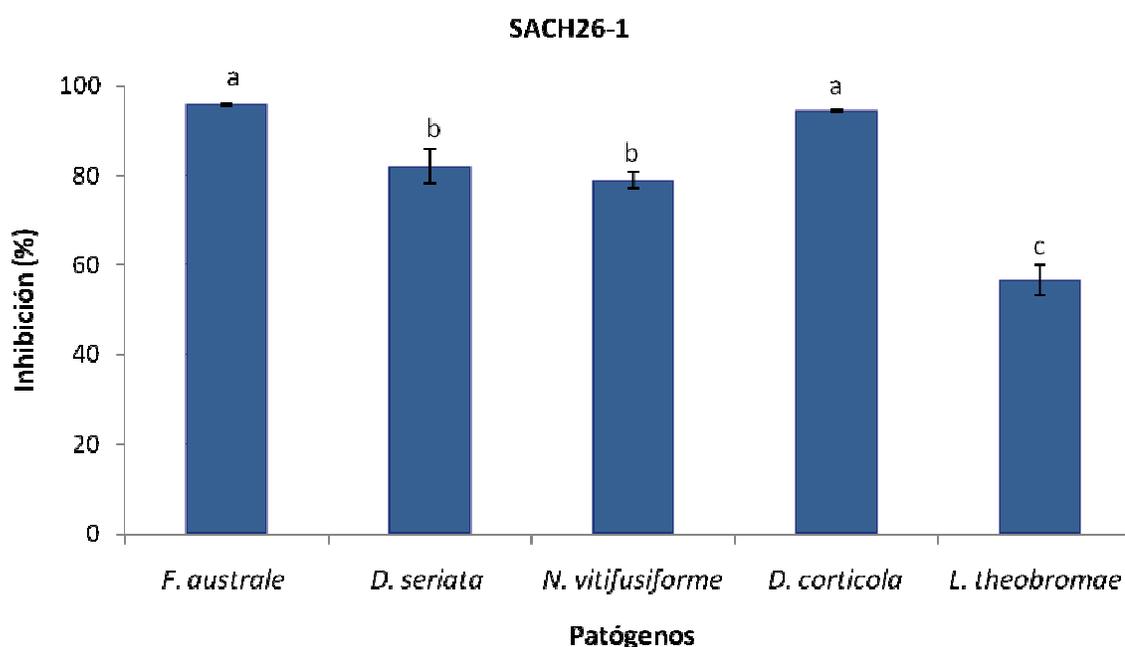


Figura 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido al aislado SACH26-1. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

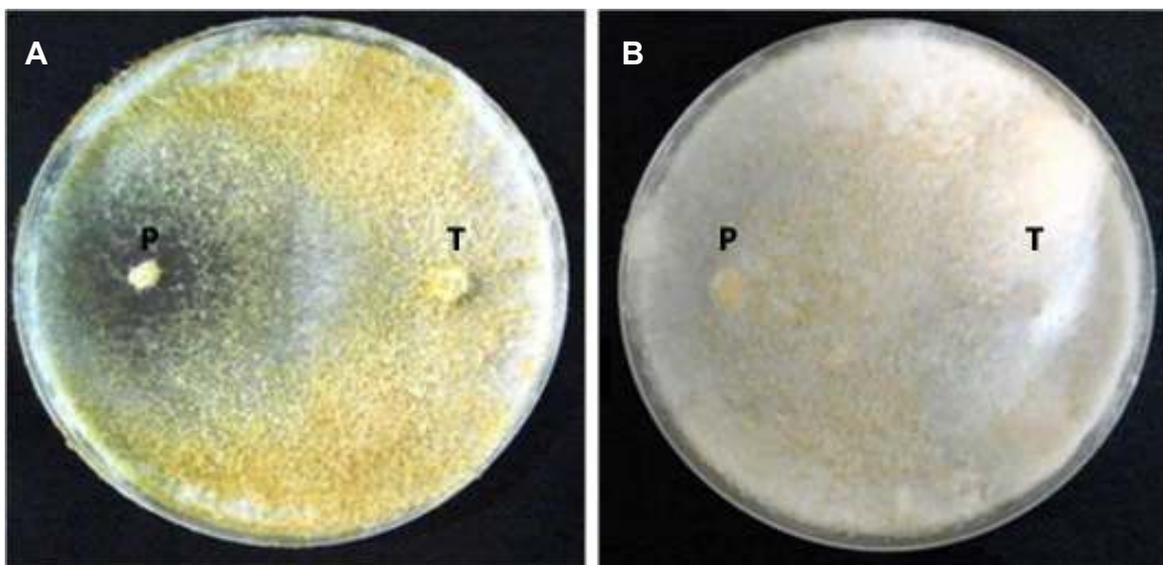


Figura 13. Inhibición del crecimiento de diferentes anamorfos de *Botryosphaeria* por parte del aislado SACH26-1. A. *D. seriata*. B. *D. corticola*. La letra T muestra el sitio de inóculo de *Trichoderma*, mientras que P indica el del patógeno.

Tabla IX. Porcentaje de inhibición ejercido por las cepas SACH26-1 y T-22 sobre las diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae.

	<i>F. australe</i>	<i>D. seriata</i>	<i>N. vitifusiforme</i>	<i>D. corticola</i>	<i>L. theobromae</i>
Cepa	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)
SACH26-1	95.74(0.19)a	81.96(3.87)a	78.82(1.90)a	94.43(0.29)a	56.47(3.44)a
T-22	49.87(1.95)b	46.61(2.08)b	43.40(1.47)b	56.24(1.65)b	48.16(3.33)b

\bar{x} = media; DS = desviación estándar. Medias en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes a ($p < 0.05$).

Evaluación del antagonismo de la cepa *T. atroviride*

T. atroviride inhibió significativamente el crecimiento de las especies de Botryosphaeriaceae. Se tuvieron porcentajes de inhibición superiores al 39% en

cuatro de los cinco patógenos estudiados. El hongo patógeno menos inhibido por *T. atroviride* fue *D. corticola* con 21% (Figura 14).

T. atroviride mostró menor inhibición del crecimiento que la cepa comercial T-22, sobre *D. corticola* y *L. theobromae*. Aunque los porcentajes de inhibición más altos debidos a *T. atroviride* fueron observados frente a *D. seriata* y *N. vitifusiforme* (43 %), este valor fue estadísticamente igual al observado para la cepa comercial (Tabla X).

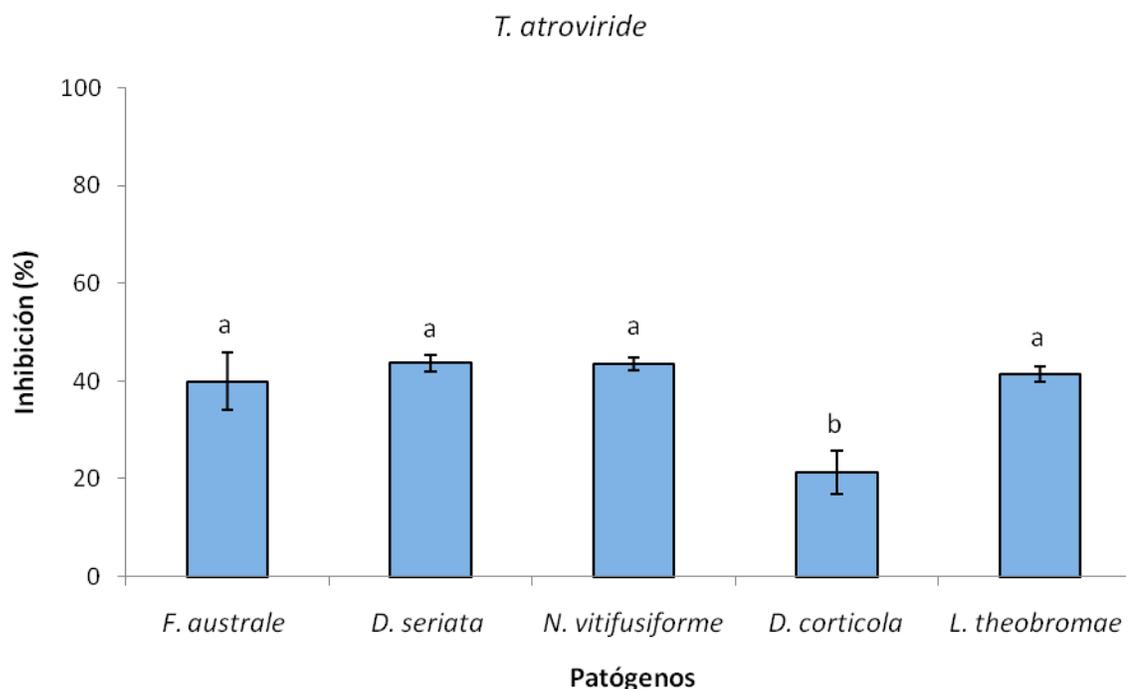


Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* en PDA debido a la cepa de *T. atroviride*. Las barras indican la desviación estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Tabla X. Porcentaje de inhibición ejercido por las cepas *T. atroviride* y T-22 sobre las diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae.

Cepa	<i>F. australe</i>	<i>D. seriata</i>	<i>N. vitifusiforme</i>	<i>D. corticola</i>	<i>L. theobromae</i>
	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)	\bar{x} (DS)
<i>T. atroviride</i>	39.91(5.83)a	43.65(1.69)a	43.49(1.41)a	21.28(4.37)a	41.33(1.59)a
T-22	49.87(1.95)a	46.61(2.08)a	43.40(1.47)a	56.24(1.65)b	48.16(3.33)b

\bar{x} = media; DS = desviación estándar. Medias en columnas con la misma letra no son significativamente diferentes a ($p < 0.05$).

Comparación entre los aislados de *Trichoderma* hacia las cepas de *Botryosphaeria*.

Al comparar la eficacia que presentaron los diferentes aislados de *Trichoderma*, sobre la inhibición del crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae*, se observó que el aislado SACH26-1 presentó valores superiores al resto de las cepas (Figuras de la 15 a la 21) excepto para el caso de *L. theobromae* frente a la cual la inhibición fue similar a las presentadas por SACH21-3 y CCMT01-1 (Figura 21). Estos dos últimos también presentaron una eficacia superior a la cepa comercial y el resto de las cepas nativas cuando se enfrentaron a *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme* y *L. theobromae*, pero no al enfrentarse a *D. corticola* donde no hubo diferencia significativa.

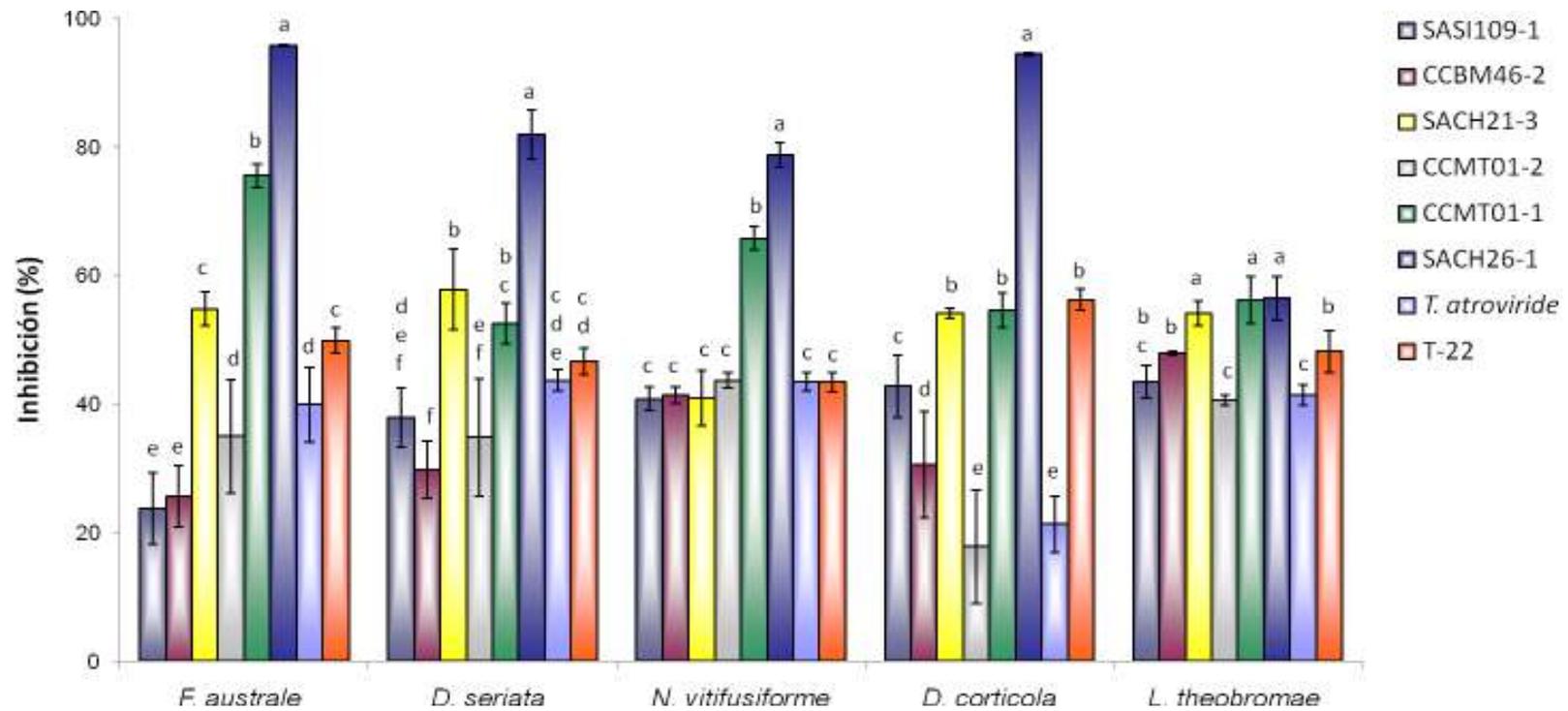


Figura 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las cinco especies de la familia Botryosphaeriaceae por competencia con las ocho cepas evaluadas de *Trichoderma*. Los datos son las medias de las cinco réplicas, y las barras de error denotan las desviaciones estándar de dichas réplicas. Los valores marcados con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo a las pruebas de medias de Tukey. Las diferencias son entre las cepas de *Trichoderma* para cada patógeno.

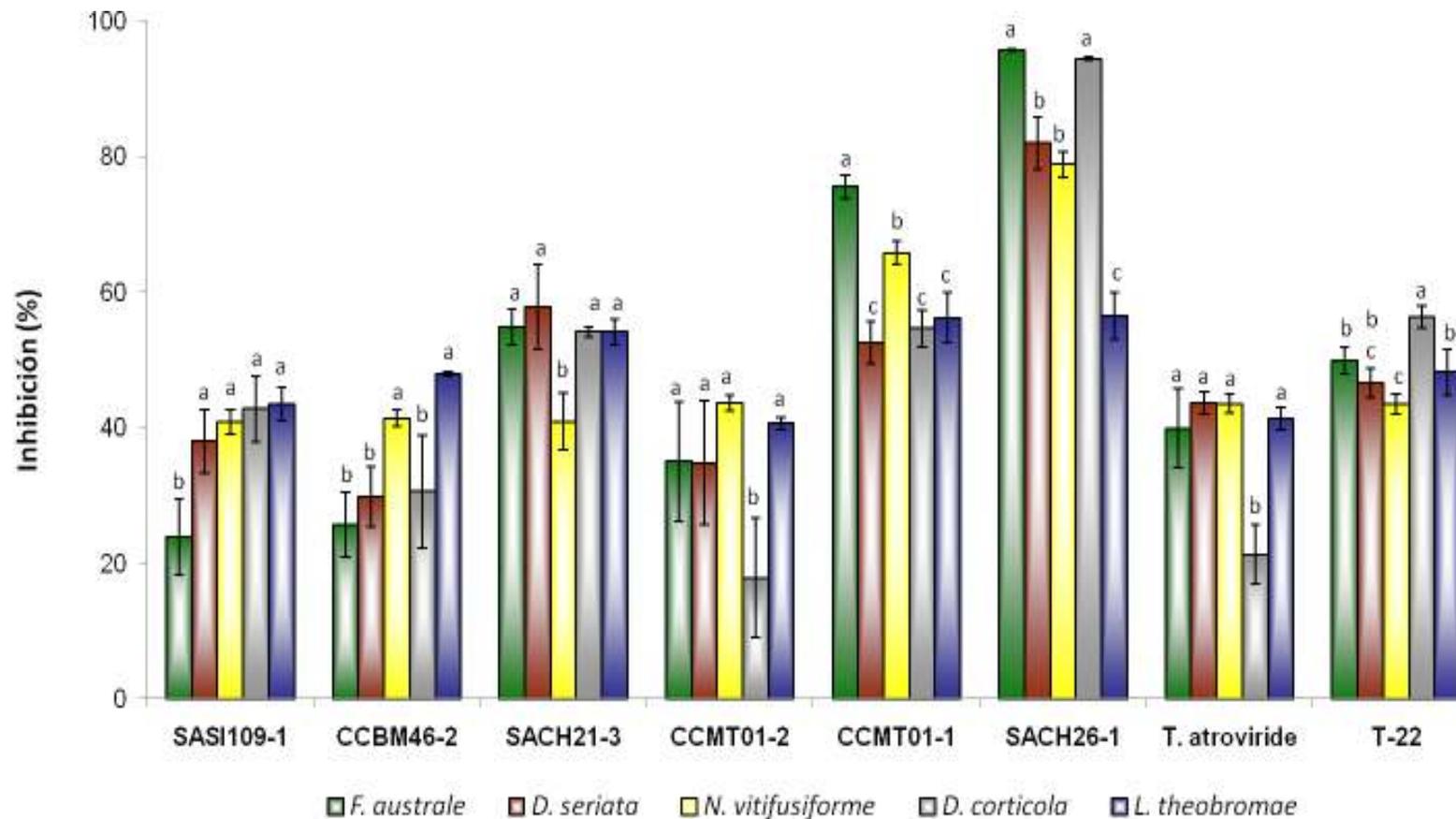


Figura 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las cinco especies de la familia Botryosphaeriaceae por competencia con las ocho cepas evaluadas de *Trichoderma*. Los datos son las medias de las cinco réplicas, y las barras de error denotan las desviaciones estándar de dichas réplicas. Los valores marcados con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) de acuerdo a las pruebas de medias de Tukey. Las diferencias son entre la inhibición ejercida por cada cepa de *Trichoderma*.

F. austral

	SASI109-1							
SASI109-1		CCBM46-2						
CCBM46-2	0.946		SACH21-3					
SACH21-3	<0.0001	<0.0001		CCMT01-2				
CCMT01-2	0.013	0.170	<0.0001		CCMT01-1			
CCMT01-1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		SACH26-1		
SACH26-1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		T. atroviridae	
<i>T. atroviride</i>	0.000	0.006	0.003	0.842	<0.0001	<0.0001		T-22
T-22	<0.0001	<0.0001	0.837	0.003	<0.0001	<0.0001	0.113	

Figura 17. Cuadro de valores de significancia (pruebas de medias de Tukey) para comparaciones medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento entre las cepas de *Trichoderma* para *F. australe*. Valores menores a 0.05 indican diferencias significativas.

D. seriata

	SASI109-1							
SASI109-1		CCBM46-2						
CCBM46-2	0.247		SACH21-3					
SACH21-3	<0.0001	<0.0001		CCMT01-2				
CCMT01-2	0.979	0.794	<0.0001		CCMT01-1			
CCMT01-1	0.003	< 0.0001	0.746	0.000		SACH26-1		
SACH26-1	<0.0001	<0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		T. atroviridae	
<i>T. atroviride</i>	0.673	0.003	0.004	0.169	0.169	0.0001		T-22
T-22	0.014	< 0.0001	0.002	0.001	0.085	< 0.0001	0.380	

Figura 18. Cuadro de valores de significancia (pruebas de medias de Tukey) para comparaciones medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento entre las cepas de *Trichoderma* para *D. seriata*. Valores menores a 0.05 indican diferencias significativas.

N. vitifusiforme

	SASI109-1								
SASI109-1		CCBM46-2							
CCBM46-2	1.000		SACH21-3						
SACH21-3	1.000	1.000		CCMT01-2					
CCMT01-2	0.620	0.834	0.662		CCMT01-1				
CCMT01-1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		SACH26-1			
SACH26-1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		T. atroviridae		
<i>T. atroviride</i>	0.692	0.884	0.731	1.000	<0.0001	<0.0001		T-22	
T-22	0.727	0.906	0.765	1.000	<0.0001	<0.0001	1.000		

Figura 19. Cuadro de valores de significancia (pruebas de medias de Tukey) para comparaciones medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento entre las cepas de *Trichoderma* para *N. vitifusiforme*. Valores menores a 0.05 indican diferencias significativas.

D. corticola

	SASI109-1							
SASI109-1		CCBM46-2						
CCBM46-2	0.020		SACH21-3					
SACH21-3	0.038	<0.0001		CCMT01-2				
CCMT01-2	<0.0001	<0.0001	<0.0001		CCMT01-1			
CCMT01-1	0.026	<0.0001	1.000	<0.0001		SACH26-1		
SACH26-1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		T. atroviridae	
<i>T. atroviride</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.968	<0.0001	<0.0001		T-22
T-22	0.008	<0.0001	0.998	<0.0001	1.000	0.0001	<0.0001	

Figura 20. Cuadro de valores de significancia (pruebas de medias de Tukey) para comparaciones medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento entre las cepas de *Trichoderma* para *D. corticola*. Valores menores a 0.05 indican diferencias significativas.

L. theobromae

	SASI109-1							
SASI109-1		CCBM46-2						
CCBM46-2	0.223		SACH21-3					
SACH21-3	<0.0001	0.024		CCMT01-2				
CCMT01-2	0.733	0.005	<0.0001		CCMT01-1			
CCMT01-1	<0.0001	0.001	0.934	<0.0001		SACH26-1		
SACH26-1	<0.0001	0.0001	0.887	<0.0001	<0.0001		T. atroviridae	
<i>T. atroviride</i>	0.923	0.015	<0.0001	1.000	0.0001	<0.0001		T-22
T-22	0.169	1.000	0.034	0.003	0.002	0.0001	0.010	

Figura 21. Cuadro de valores de significancia (pruebas de medias de Tukey) para comparaciones medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento entre las cepas de *Trichoderma* para *L. theobromae*. Valores menores a 0.05 indican diferencias significativas.

Antagonismo de las cepas de SACH21-3, CCMT01-1 y SACH26-1 sobre los patógenos *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* y *Cylindrocarpon* sp.

De los tres aislados probados, solamente SACH26-1 pudo inhibir el crecimiento de *Cylindrocarpon* sp, aunque esta inhibición no fue total ya que solo se observó un menor crecimiento cuando se comparó con el control (Figura 22, cuadro H e I). En cuanto al *P. aleophilum*, se observó que las cepas CCMT01-1 y SACH26-1 inhibieron su crecimiento (Figura 22 cuadros E y H) e inhibición parcial por parte del aislado SACH21-3 (Figura 23 cuadro B). Por último, los tres aislados de *Trichoderma* sp inhibieron totalmente el crecimiento de *P. chlamydospora* (Figura 24 cuadros B, E y H). En la Tabla XI, se muestra un concentrado de las observaciones realizadas.

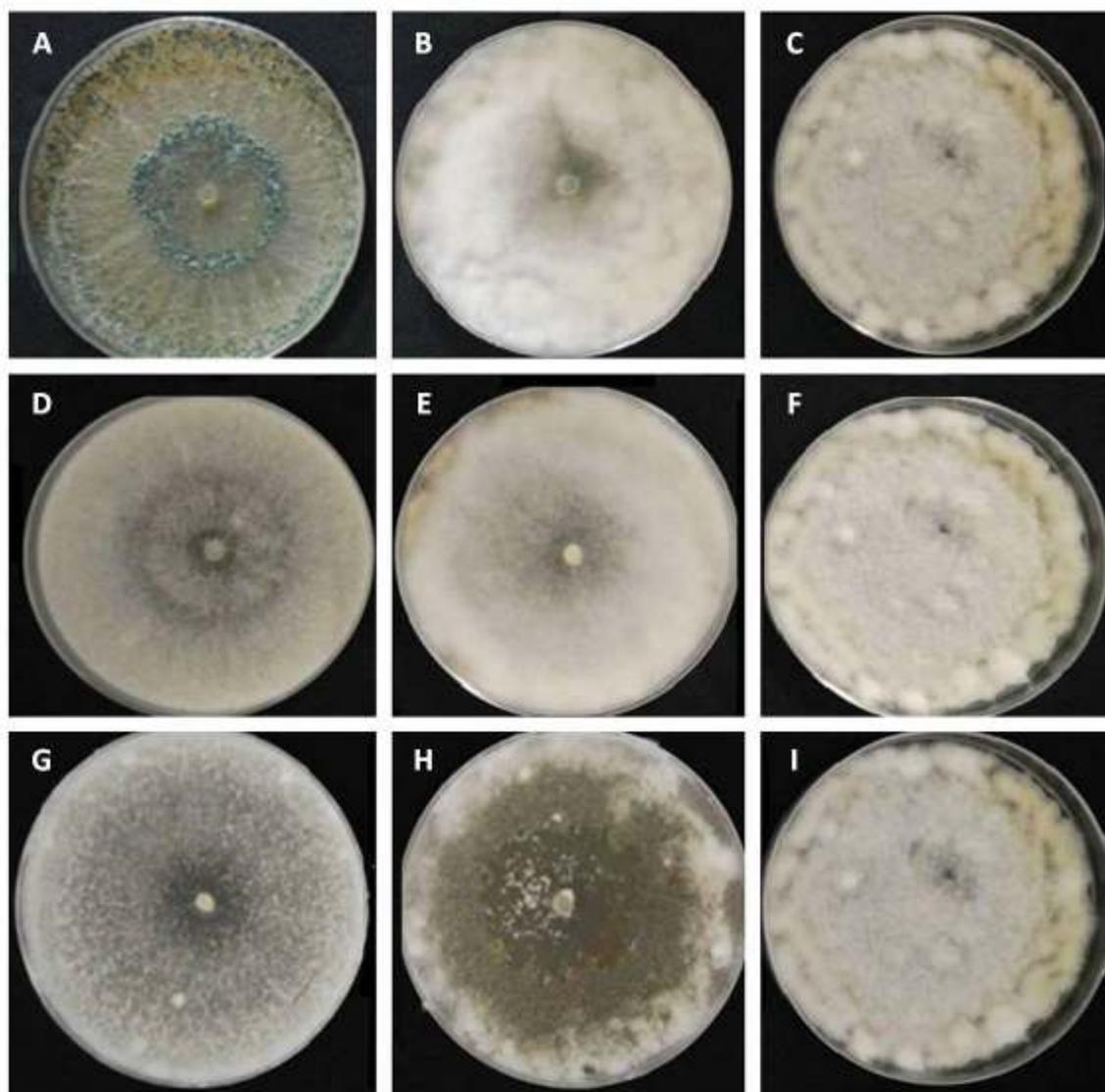


Figura 22. Inhibición del crecimiento de *Cylindrocarpon* spp por parte de los aislados de *Trichoderma* SACH21-3 (A), CCMT01-1 (D), y SACH26-1 (G). Las interacciones antagonista-patógeno, se muestran en los cuadros B, E y H y en los cuadros C, F e I se presentan el patógeno en ausencia de *Trichoderma* sp. Las imágenes fueron tomadas siete días después de la inoculación.

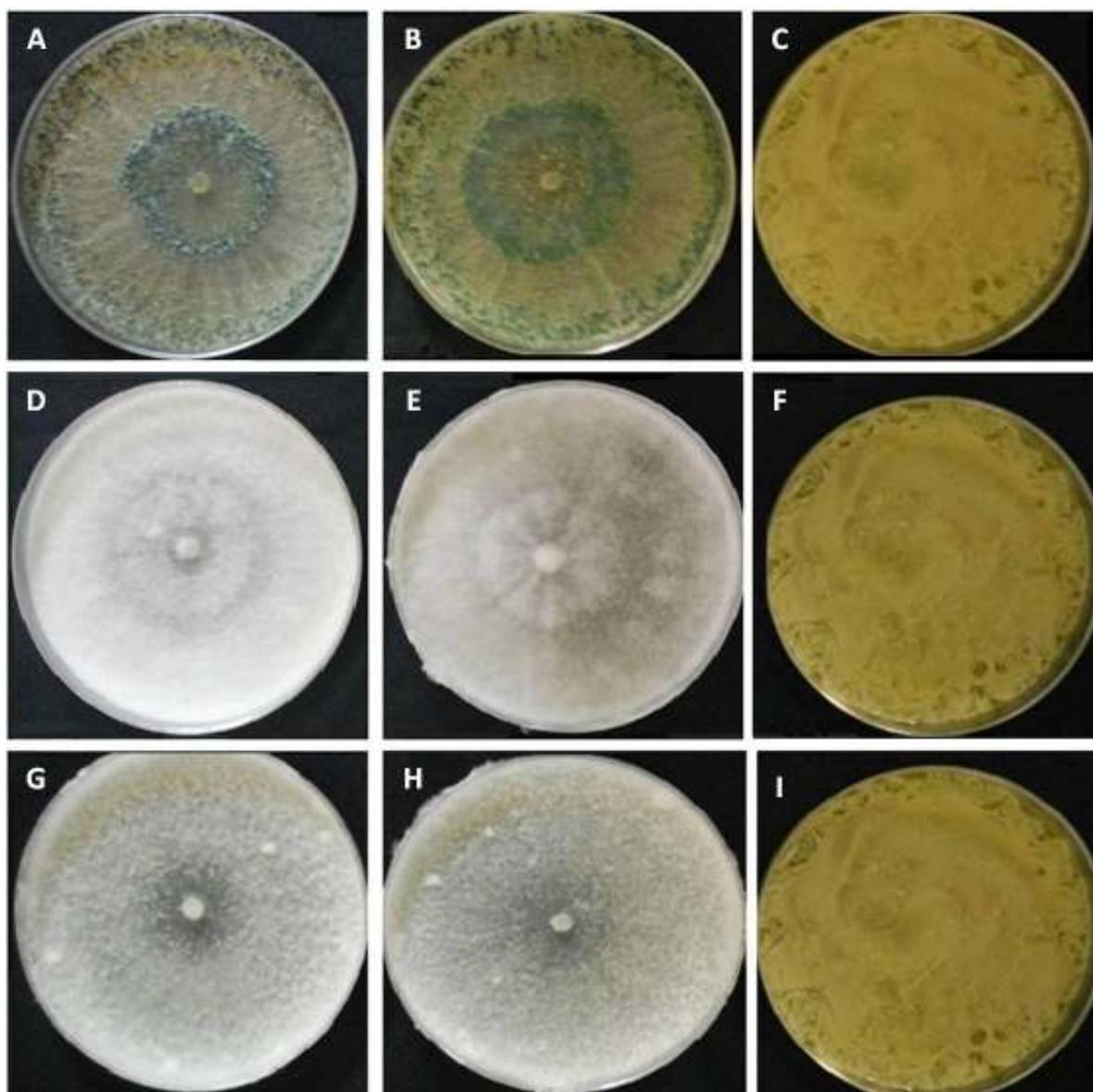


Figura 23. Inhibición del crecimiento de *P. aleophilum*, por parte de los aislados de *Trichoderma* SACH21-3 (A), CCMT01-1 (D), y SACH26-1 (G). Las interacciones antagonista-patógeno, se muestran en los cuadros B, E y H y en los cuadros C, F e I se presentan el patógeno en ausencia de *Trichoderma* sp. Las imágenes fueron tomadas siete días después de la inoculación.

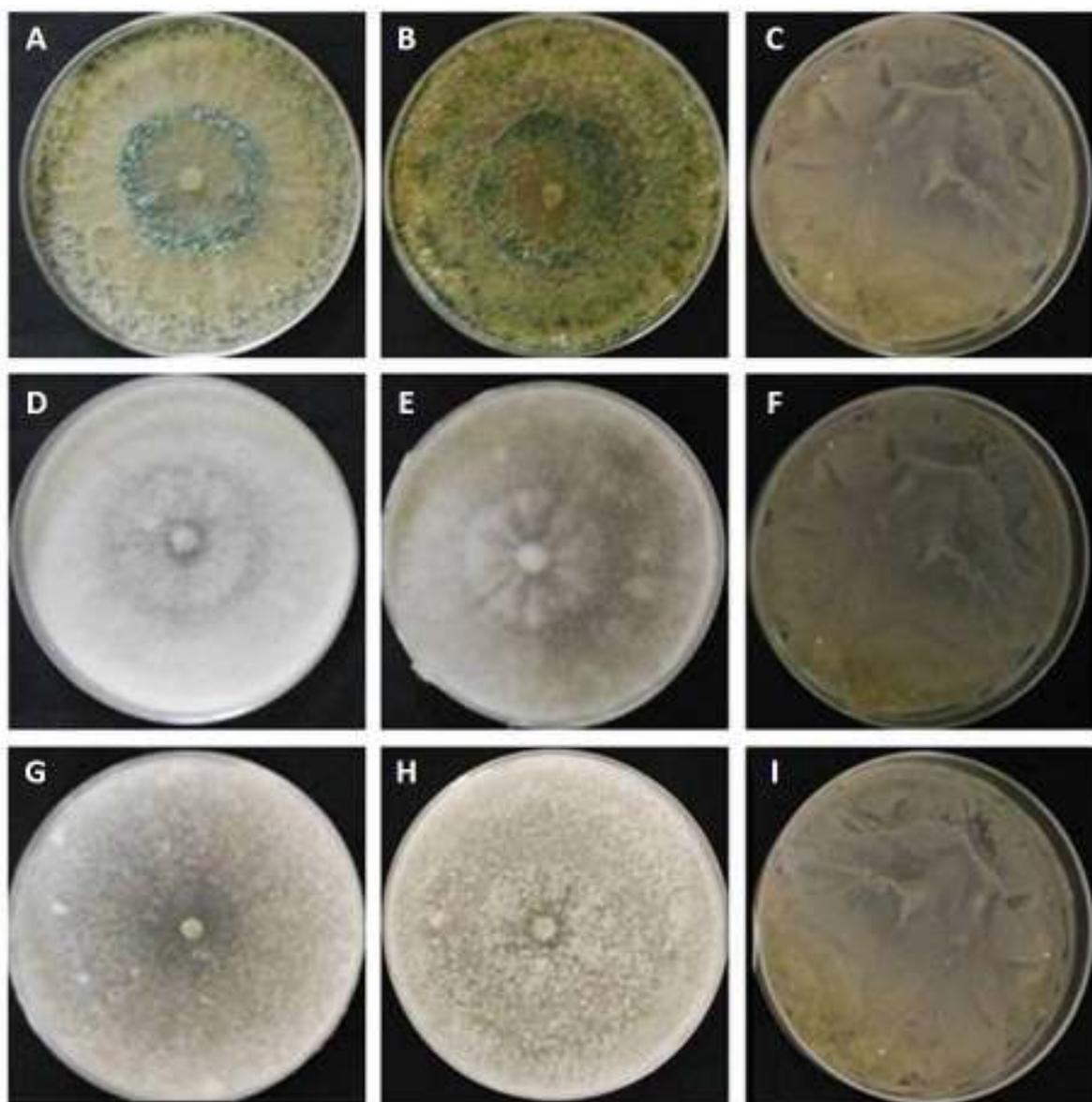


Figura 24. Inhibición del crecimiento de *P. chlamydospora*, por parte de los aislados de *Trichoderma* SACH21-3 (A), CCMT01-1 (D), y SACH26-1 (G). Las interacciones antagonista-patógeno, se muestran en los cuadros B, E y H y en los cuadros C, F e I se presentan el patógeno en ausencia de *Trichoderma* sp. Las imágenes fueron tomadas siete días después de la inoculación.

Tabla XI. Inhibición del crecimiento de *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* y *Cylindrocarpon* sp por parte de tres cepas de *Trichoderma*. El signo (+) expresa inhibición total, (+/-) denota que se observó crecimiento menor al control y (-) que el crecimiento fue similar al control.

Cepa	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	<i>Cylindrocarpon</i> sp.
SACH21-3	+/-	+	-
CCMT01-1	+	+	-
SACH26-1	+	+	+/-

Compuestos Volátiles y No volátiles

Secreción de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles de dos de los cuatro aislados de *Trichoderma* (CCMT01-1 y SACH26-1) evaluados inhibieron el crecimiento de las cinco especies de *Botryosphaeria* (Tabla XII), mientras que las cepas SACH21-3 y T-22 no mostraron ningún efecto negativo sobre estos patógenos.

Tabla XII. Inhibición del crecimiento de *F. australe*, *D. seriata*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* por secreción de compuestos volátiles de cuatro cepas de *Trichoderma*. El signo (+) expresa inhibición y (-) que hubo crecimiento del patógeno similar al del control.

Cepa	<i>F. australe</i>	<i>D. seriata</i>	<i>N. vitifusiforme</i>	<i>D. corticola</i>	<i>L. theobromae</i>
SACH21-3	-	-	-	-	-
CCMT01-1	+	+	+	+	+
SACH26-1	+	+	+	+	+
T-22	-	-	-	-	-

Al evaluar estas cepas contra *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* y *Cylindrocarpon* sp, (Tabla XIII) ninguna de ellas presentó efecto de inhibición ya

que los tres patógenos crecieron de manera normal sin mostrar diferencias visuales con respecto a los controles.

Tabla XIII. Inhibición del crecimiento de *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* y *Cylindrocarpon* sp. por secreción de compuestos volátiles de cuatro cepas de *Trichoderma*. El signo (+) expresa inhibición mientras que (-) indica que hubo crecimiento del patógeno.

Cepa	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	<i>Cylindrocarpon</i> sp.
SACH21-3	-	-	-
CCMT01-1	-	-	-
SACH26-1	-	-	-

Secreción de compuestos no volátiles

En la evaluación de inhibición por secreción de compuestos no volátiles, se observó que las cepas CCMT01-1 y SACH26-1, inhibieron el crecimiento de los cinco patógenos (Tabla XIV). Por el contrario las cepas SACH21-3 y la cepa comercial (PHC[®]T-22[®]) no presentaron acción inhibitoria ya que todas las cepas de Botryosphaeriaceae probadas crecieron de manera similar al control.

Tabla XIV. Inhibición del crecimiento de *F. australe*, *D. seriata*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* por secreción de compuestos no volátiles de cuatro cepas de *Trichoderma*. El signo (+) expresa inhibición total y (+/-) denota que se observó crecimiento pero menor al control, mientras que (-) indica que hubo crecimiento del patógeno similar al control.

Cepa	<i>F. australe</i>	<i>D. seriata</i>	<i>N. vitifusiforme</i>	<i>D. corticola</i>	<i>L. theobromae</i>
SACH21-3	-	-	-	-	-
CCMT01-1	+	+	+	+	+
SACH26-1	+	+	+	+	+
PHC [®] T-22 [®]	-	-	-	-	-

El crecimiento de *P. aleophilum* fue inhibido por los aislados SACH21-3, CCMT01-1 y SACH26-1 (Figura 25). Al evaluar *P. chlamydospora* se observó un crecimiento menos denso que el presentado por el control frente a las cepas CCMT01-1 y SACH26-1 (Figura 26) y ningún efecto frente a SACH21-3 y lo mismo fue observado para *Cylindrocarpon* sp (Figura 27). En la tabla XV se muestra un concentrado de las observaciones realizadas.).

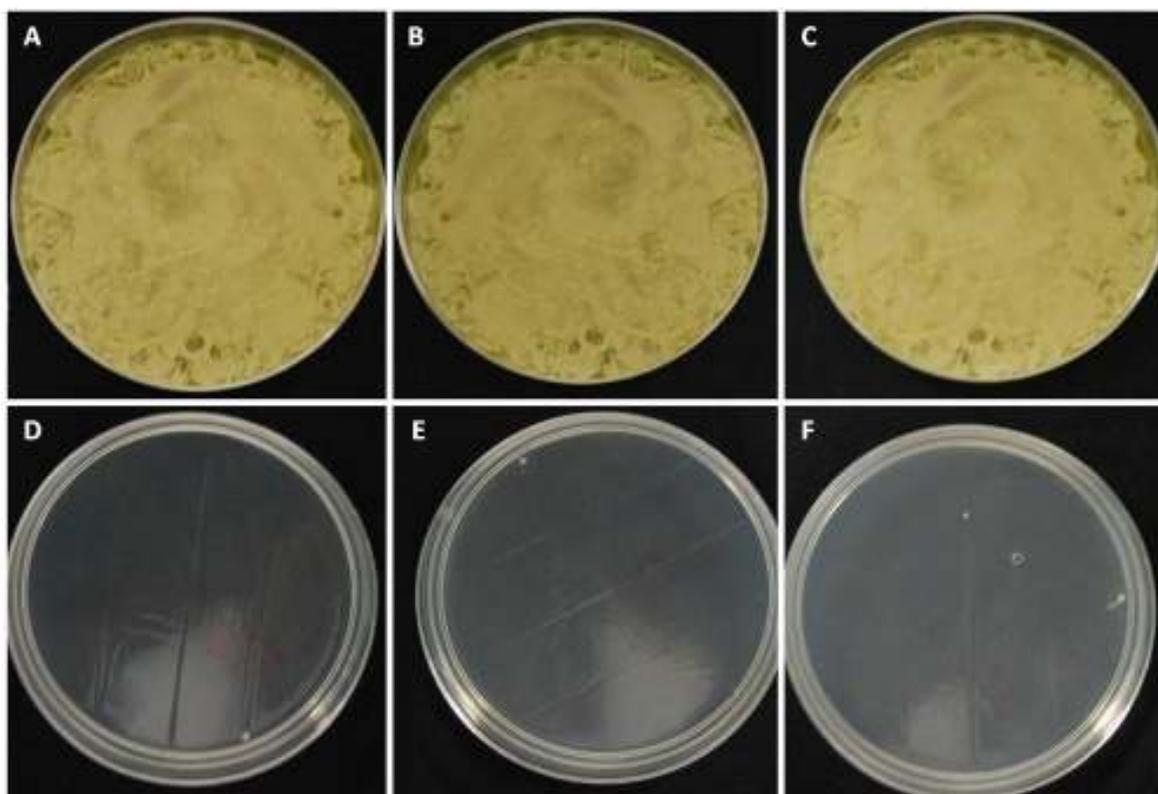


Figura 25. Inhibición del crecimiento *P. aleophilum* (cuadros A, B y C) por compuestos no volátiles de tres cepas de *Trichoderma*: D) SACH21-3, E). CCMT01-1 y F). SACH26-1, siete días después de haber sido inoculado.

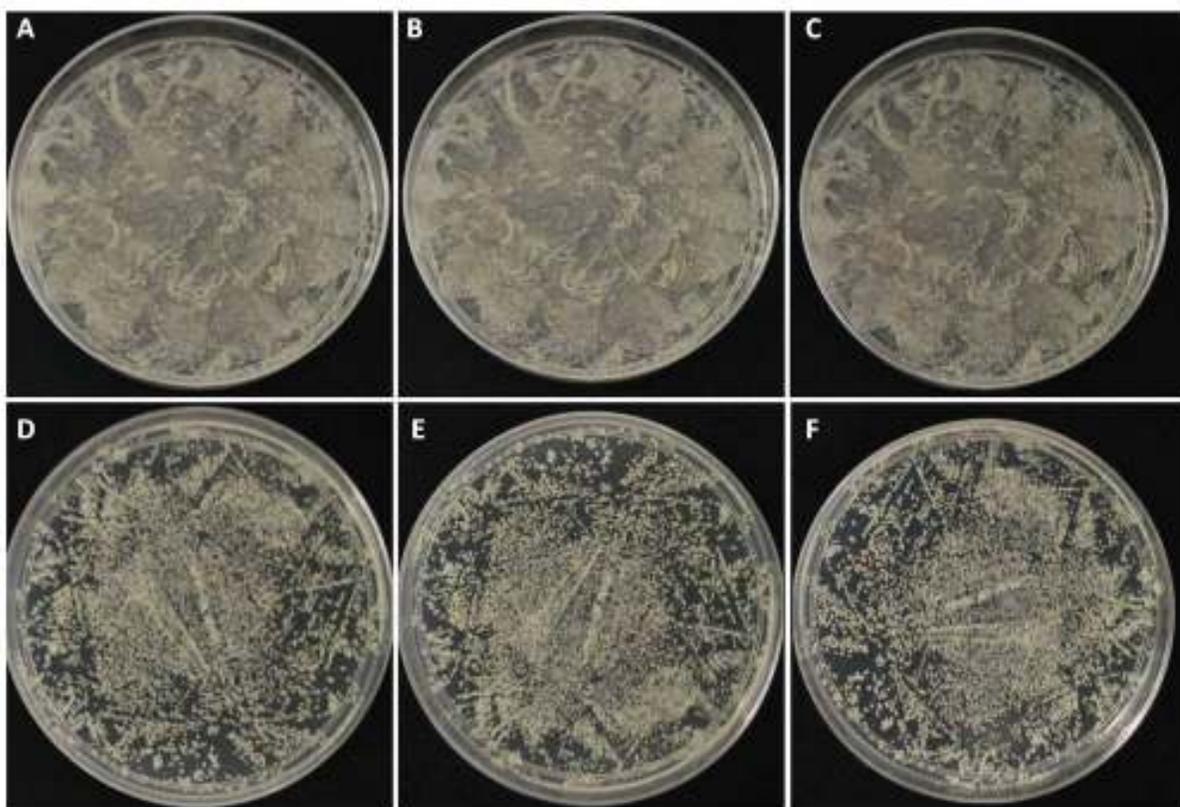


Figura 26. Inhibición del crecimiento *P. chlamydospora*, por compuestos no volátiles de tres cepas de *Trichoderma*, siete días después de realizada la inoculación. Arriba se observan los controles A. SACH21-3, B. CCMT01-1, y C. SACH26-1.

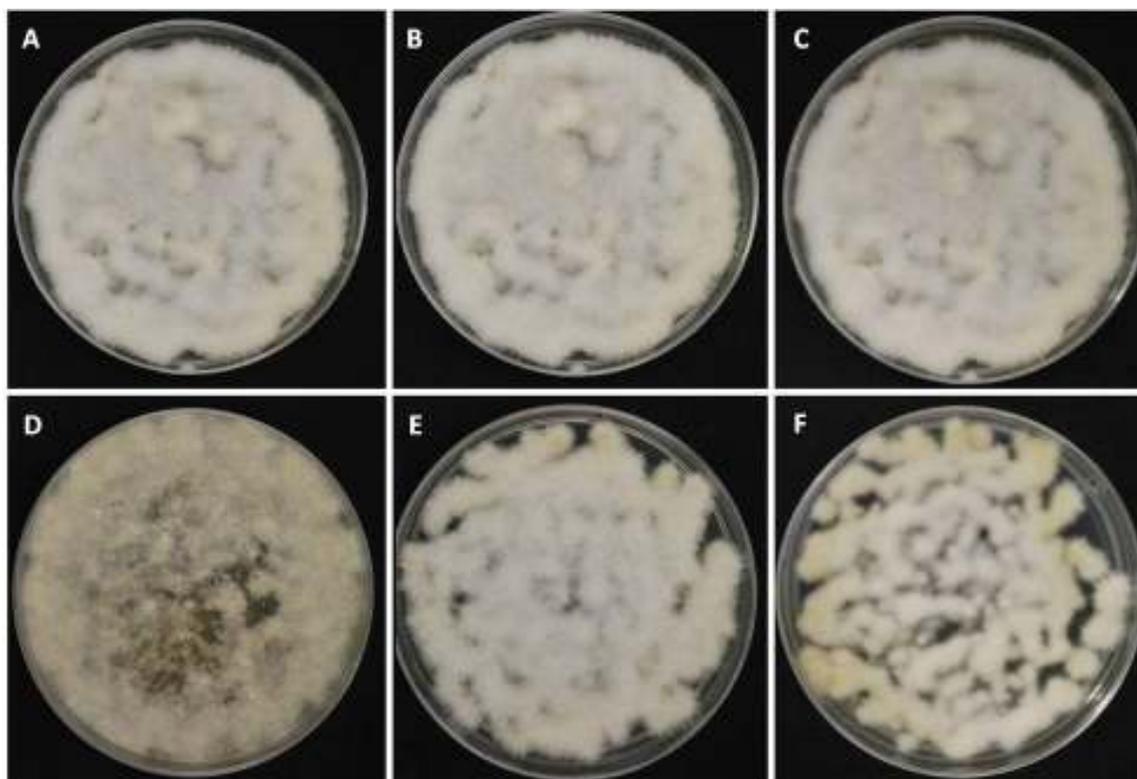


Figura 27. Inhibición del crecimiento *Cylindrocarpon* sp. por compuestos no volátiles de tres cepas de *Trichoderma* siete días después de realizada la inoculación. Arriba se observan los controles. A. SACH21-3, B. CCMT01-1, y C. SACH26-1.

Tabla XV. Inhibición del crecimiento de *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* y *Cylindrocarpon* sp. por secreción de compuestos no volátiles de tres cepas de *Trichoderma*. El signo (+) expresa inhibición total y (+/-) denota que se observó crecimiento pero menor al control, mientras que (-) indica que hubo crecimiento del patógeno similar al control.

Cepa	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	<i>Cylindrocarpon</i> sp.
SACH21-3	+	-	-
CCMT01-1	+	+/-	+/-
SACH26-1	+	+/-	+/-

Microscopía de las interacciones de las *Trichoderma* spp sobre patógenos de la madera de vid.

Solamente se observó la interacción de los aislados SACH21-3, CCBM01-1 y SACH26-1 ya que fueron estos aislados los que mostraron mayor actividad frente a las cinco especies de la familia Botryosphaeriaceae.

Al observarse bajo microscopio con una magnificación de 100x, se detectó que algunas hifas de los patógenos a los que se enfrentó el aislado SACH26-1 se encontraban degradadas (Figura 28 A), presumiblemente por acción de compuestos no volátiles, además se detectaron hifas micoparasitadas por este antagonista (Figura 28 B). CCMB01-1 también fue capaz de degradar algunas de las hifas del patógeno como en el caso de *D. seriata* presentado en la figura 28 C. El aislado SACH21-3 solamente presentó acción micoparasítica (Figura 28 D,E y F).

Caracterización de las cepas de *Trichoderma* con actividad antifúngica.

Solamente los aislados que mostraron mayor actividad, es decir aquellos que presentaron valores significativos mayores a la cepa comercial para la mayoría de los patógenos probados se identificaron genéticamente. Los resultados del análisis genético de las tres especies seleccionadas indican que estas pertenecen a dos especies diferentes de *Trichoderma* (Figura 29), una de ellas a *T. harzianum* (SACH21-3) y dos a *T. gamsii* (CCMT01-1, SACH26-2).

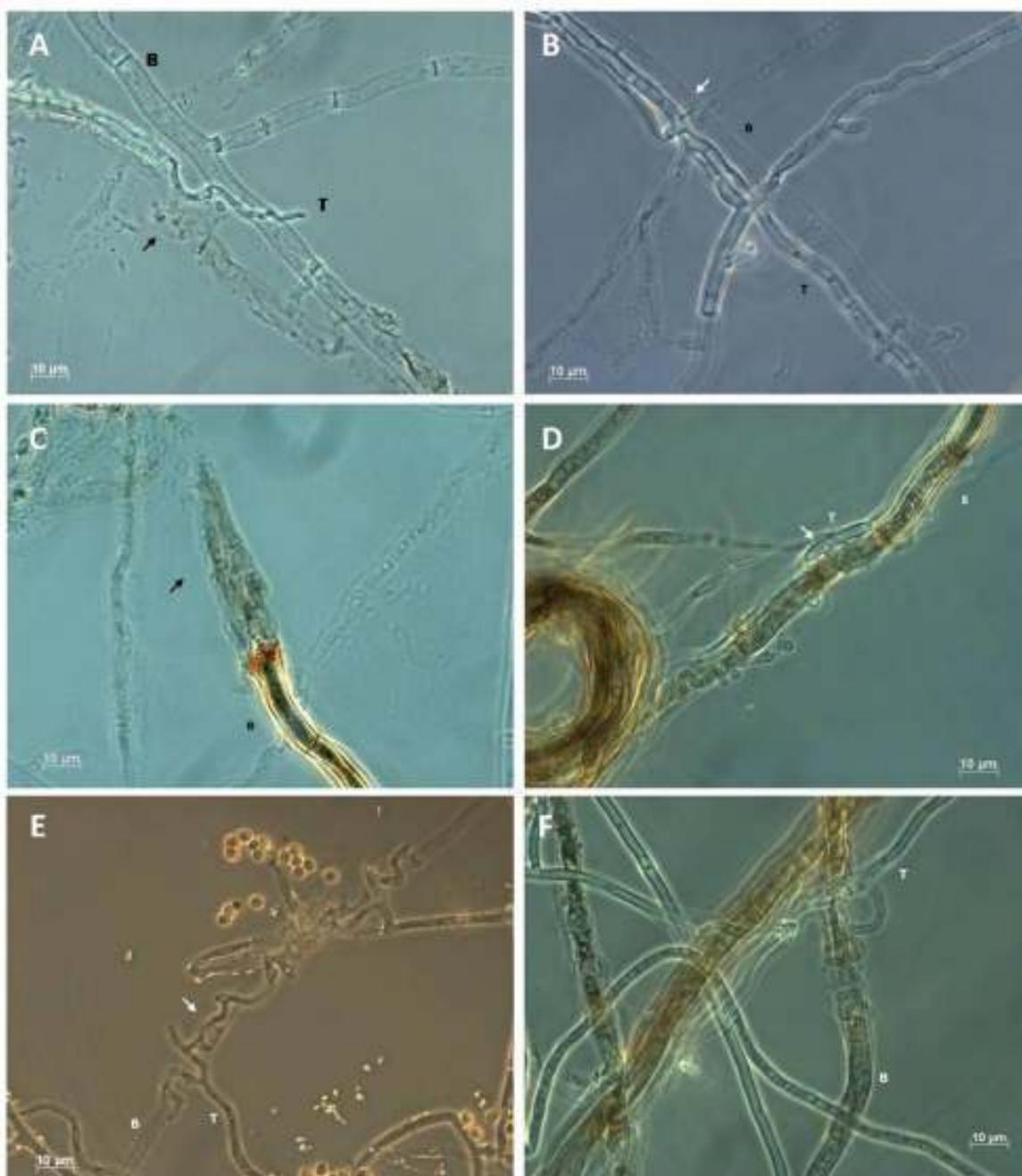


Figura 28. Micrografías (100x) que muestran las interacciones entre *Trichoderma* y algunas *Botryosphaeria* spp. (A) SACH26-1 frente a *D. seriata*. Se pueden apreciar hifas degradadas (flecha negra) debido a la acción del antagonista. En el cuadro B se observa la acción micoparasítica de este mismo aislado hacia este patógeno. CCBM01-1 también colapso hifas de *D. seriata* (C). El aislado SACH23-1 presentó micoparasitismo ante *D. corticola* (D), *D. seriata* (E) y *F. australe* (F). En las imágenes, la letra B denota al patógeno, T al antagonista y la flecha blanca la interacción entre estos.

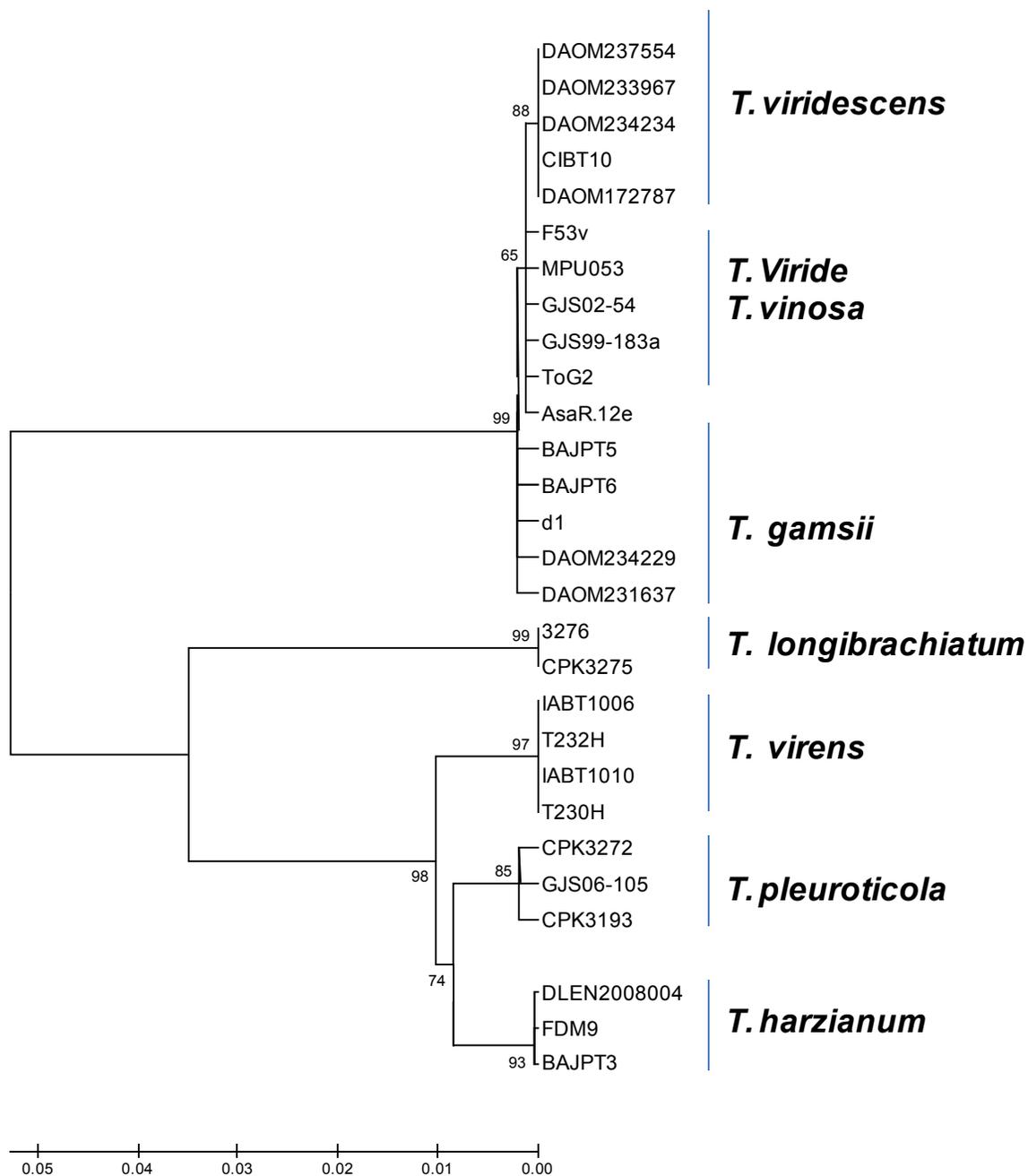


Figura 29. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias ITS de las cepas analizadas en este estudio y de otras cepas aisladas en diferentes partes del mundo usando el algoritmo del vecino más cercano y 1,000 réplicas en MEGA.

V

Discusiones

Las características morfológicas observadas en los hongos aislados de los viñedos de la zona, permitieron obtener seis aislados pertenecientes al género *Trichoderma* de troncos de madera de vid en dos viñedos, tres aislados en cada uno. Si bien, las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelo con diferentes cantidades de materia orgánica, y son capaces de descomponerla (Infante *et al.*, 2009), algunos estudios han demostrado que también pueden persistir en las partes aéreas de la planta en asociación endofítica. Algunas especies de *Trichoderma* pueden reaislarse de tejidos de tallo de cacao, incluyendo la madera, el xilema, los meristemos apicales y en menor grado las hojas (Evans, *et al.*, 2003). Para el caso de madera de vid, estudios en invernadero ha demostrado que *T. harzianum* es capaz de colonizar las cañas hasta una distancia de 10 cm o más por arriba y por abajo del punto de inoculación después de 12 semanas, mientras que en campo crece 3 cm después de 3 meses (John *et al.*, 2008) por lo cual tiene capacidad endofítica y parece altamente probable que haya más especies de *Trichoderma* capaces de colonizar troncos de vid.

Dentro de un mismo viñedo se encontraron tres aislados diferentes (SASI109-1, SACH21-3 y SACH26-1), pertenecientes al menos a dos especies. Dos aislados de *Trichoderma* (CCMT01-1 y CCMT01-2) fueron recuperados de la misma planta, y mostraron diferencias morfológicas y en su habilidad para antagonizar el crecimiento de los patógenos probados, así es posible hallar más

de un biotipo dentro de la misma planta de vid. Esto se puede explicar por la gran capacidad de adaptación de este género y su abundancia en el ambiente, principalmente en el suelo (Infante *et al.*, 2009).

Los aislados también mostraron diferencias significativas en su actividad antagonica sobre los patógenos estudiados. Esta variación en la efectividad ya se había observado con anterioridad para hongos de la madera. Por ejemplo Hunt (2004) evaluando siete cepas de *T. harzianum* encontró diferencias en la producción de lisis y la actividad parasítica hacia varias especies de *Botryosphaeria* y solo dos de ellas fueron capaces de inhibir a los cuatro patógenos probados. En este trabajo, al probar los seis aislados de *Trichoderma* se encontró que al menos dos de ellos mostraron mayor efectividad y un tercer aislado mostró resultados comparables a la cepa comercial. Las cepas que mostraron mayor potencial de control fueron identificadas como miembros de las especies *T. harzianum* y *T. gamsii*. *Trichoderma harzianum* es la especie más conocida como agente de biocontrol de fitopatógenos (Margolles-Clark *et al.*, 1996) al grado que ya existen en el mercado productos con base en esta especie como TrichodexTM, Vinevax[®], Trichoprotection[®], Bio-Treck[®], T-35[®] y la cepa evaluada en este trabajo, PHC T-22[®]. El efecto de la cepa T-22 se ha evaluado solamente en un estudio de protección de heridas de poda en kiwi, pero su efecto directo contra los hongos de la madera no ha sido reportado (Neri *et al.*, 2008).

Este es el primer estudio en donde se evalúan especies nativas de *Trichoderma* contra varios hongos de la madera de vid, en todos los estudios anteriores se han usado cepas comerciales contra uno o dos patógenos pero no de manera conjunta como en esta ocasión.

La menor inhibición del crecimiento hacia los patógenos probados se observó hacia *L. theobromae*, es probable que el rápido crecimiento presentado por esta cepa haya disminuido el efecto de los antagonistas. Esto puede

explicarse por el hecho de que los niveles de interacción entre patógenos y antagonistas están regulados por la acción de varios genes, tanto del antagonista como del patógeno (Bell *et al.*, 1982) y así, no todos los patógenos responden de la misma manera ni las *Trichoderma* spp ejercen el mismo efecto hacia todos los patógenos.

La cepa de *T. harzianum* (SACH21-3) aislada aquí no mostró producción de compuestos volátiles pero si de no volátiles y bajo el microscopio, solo se pudo observar micoparasitismo un mecanismo común en miembros de esta especie (Whipps, 1987; Fouzia y Saleem, 2005; Verma *et al.*, 2007; Chakraborty y Chatterjee, 2008). Así solo pudo inhibir el crecimiento de los patógenos cuando estuvo en contacto directo con ellos. Se ha reportado que dependiendo de la cepa y del patógeno al que se enfrenta, *T. harzianum* tiene la habilidad para producir compuestos antifúngicos volátiles y no volátiles (Verma *et al.*, 2007).

Respecto a las cepas de *T. gamsii*, si bien, existen pocos reportes que señalen a esta especie como importante en el control de hongos fitopatógenos, es importante mencionar que hasta hace poco tiempo sus miembros se agrupaban dentro de la especie *T. viride* (Jaklitsch *et al.*, 2006), por lo que existe la posibilidad de que algunas de las cepas señaladas como *T. viride* en reportes anteriores, sean realmente *T. gamsii*. *T. viride*, es señalado como un organismo con alto nivel de actividad antagónica hacia un amplio espectro de fitopatógenos (Bai *et al.*, 2008) con producción de enzimas lipolíticas, proteolíticas, pectinolíticas y celulolíticas (Calistru *et al.*, 1997a; Calistru *et al.*, 1997b), además de antibióticos no-volátiles como la viridina con propiedades antifúngicas y antibacteriales (Bankole y Adebajo, 1996). De *T. gamsii*, existen pocos productos en el mercado, uno se comercializa bajo el nombre de Several® en Alemania (Gisi *et al.*, 2009) y otro, Remedier®, anteriormente se comercializaba como formulado a base de *T. viride* (cepa ICC080, Isagro Spa). Ninguno de ellos se ha evaluado contra hongos de la madera.

Las cepas nativas de *T. gamsii*: CCBM01-1 y SACH26-1 mostraron producción de compuestos volátiles y no volátiles. Al observar la interacción de las cepas con los patógenos, se detectaron hifas colapsadas, hecho que puede atribuirse a la acción de compuestos no volátiles, los cuales podrían ser enzimas.

Baker y Cook (1974) indican que una de las desventajas en la efectividad del control biológico, es que los organismo utilizados como antagonistas de los patógenos, no están adaptadas a las condiciones ambientales donde se van aplicar, en cambio, las especies nativas presentan características fisiológicas que las hacen estar mejor adaptadas a las condiciones ecológicas de la zona donde fueron encontradas (Briand-Panoma y Mayleon, 1998). En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, las cepas CCBM01-1 y SACH26-1 (*T. gamsii*), podrían tener mejores resultados al aplicarse en los viñedos que una cepa foránea. No obstante, aun con estos resultados prometedores, es necesario realizar estudios en invernadero y campo antes de recomendar su uso. Asimismo, existe la posibilidad de utilizar una mezcla de dos o más cepas para tener una mayor eficiencia en la prevención y/o reducción de las enfermedades tal y como lo sugiere Harman (2000), aunque se requieren hacer estudios de compatibilidad entre estos aislados antes de usarlos en combinaciones ya que se ha demostrado que algunos aislados de *Trichoderma* ejercen poder inhibitorio sobre otros, sobre todo debido a liberación de compuestos no-volátiles (LeLay, *et al.*, 2007)

VI

Conclusiones

Se aislaron seis cepas nativas de *Trichoderma* spp en viñedos de la región vitivinícola de la Costa de Ensenada. Todas las cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae*, en menor o mayor grado.

El aislado SACH21-3 mostró valores de inhibición similares a la cepa comercial utilizada como comparativo frente *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae* y mostró producción de compuestos no volátiles y parasitismo. Este aislado también inhibió totalmente a *P. chlamydospora* pero solo parcialmente a *P. aleophilum*.

Los aislados CCMT01-1 y SACH26-1 mostraron mayor antagonismo que la cepa comercial empleada como comparativo en el control de los hongos de la madera.

SACH26-1 fue capaz de inhibir el crecimiento de los ocho patógenos contra los que se evaluó y mostró micoparasitismo, secreción de compuestos volátiles y no volátiles.

CCMT01-1 no inhibió el crecimiento de *Cylindrocarpon* sp y mostró secreción de compuestos volátiles y no volátiles.

En base a sus características morfológicas y al análisis de la región del espaciador transcrito interno (ITS1-5.8S-ITS2), los aislados CCMT01-1 y SACH26-1 fueron identificados como miembros de la especie *T. gamsii*, mientras que SACH21-3 de *T. harzianum*.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran a las cepa CCBM01-1 y SACH26-1 como organismos potenciales para ser utilizados como control biológico de los hongos que afectan a la madera de la vid.

VII

Literatura citada

Abou-Mansour, E., Couché, E., y Tabacchi, R. 2004. Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms? *Phytopathol. Mediterr.* 43: 75-82.

Ait-Lahsen H, Soler A, Rey M, de la Cruz J, Monte E, Llobell A. 2001. Molecular and antifungal properties of an exo- α -glucanase, AGN13.1, from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *App Environ Microbiol.* 67:5833–5839.

Agrios, G. 1969. *Plant Pathology*. APS Press, New York, EE.UU. 629 pp.

Akadémiai, K. Chakraborty, M. R. Dutta, Ojha, S. y Chatterjee S. N. C. 2004. Antagonistic potential of biocontrol agents against *Botryodiplodia theobromae* causing die-back of bottle brush (*Callistemon citrinus*). *Acta Bot. Hung.* 46: 279-28.

Ahmad, J.S. y Baker, R. 1987. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology.* 77:3 58-3 62.

Armengol, J., Vicent, A., Torne, L., Garcia-Figueroles F y Garcia-Jimenez J. 2001. Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: A three-year survey. *Phytopathol. Mediterr.* 40: 325–329.

Armengol, J., Gramaje, D., Salazar, D., López-Cortés, I., Jiménez-Jaime, A., Albarañez, E.H. y Garcia-Jiménez, J. 2007. A hot-water treatment to control *Phaeoconiella chamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in Spanish grapevine nurseries. *Phytopathol. Mediterr.* 46:12-18.

Auger, J., Esterio, M., Ricke, G., y Pérez, I. 2004. Black dead arm and basal canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Dis.* 88:1286.

- Bai Z., Jin B., Li Y., Chen J. y Zuming LI. 2008. Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *J. Environ. Sci.* 20:3:353-358
- Baker, R. y Cook, R. 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco USA, W. H. Freeman. 433 p
- Bankole, S.A. y Adebajo A. 1996. Biocontrol of brown blotch of cowpea caused by *Colletotrichum truncatum* with *Trichoderma viride*, *Crop Prot.* 15: 633–636.
- Barnett, H. L. y Binder, F. L. 1973. The fungal host-parasite relationship. *Annu. Rev. Phytopatbol.* 11: 273-292.
- Batra, S. W. T. 1982. Biological control in agroeco- systems. *Science* 215:134-139.
- Bell D.K., Wells, H.D. y Markham C.R. 1982. In Vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant Pathogens. *Phytopathology.* 72: 379-82.
- Benhamou, N. y Chet, I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83: 1062-1071.
- Benhamou, N., y Chet, I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the intersection between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2095–2099.
- Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C., y Codon, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7:249-260.
- Bester, W. 2006. Characterization and management of trunk disease-causing pathogens on table grapevines. MSc. Thesis, University of Stellenbosch, Stellenbosch, South Africa. 165 p.
- Bester, W., P.W. Crous, P.H. Fourie. 2007. Evaluation of fungicides as potencial grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australas. Plant Path.* 36:73-77.

Blakeman, J. y Fokkema, N. 1982. Potential for biological control of Plant Diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20:167-192.

Booth C. 1966. *The Genus Cylindrocarpon*. Commonwealth Mycology Institute. Kew, Surrey, England. 56 p.

Bonfiglioli, R., y McGregor, S. 2006. The *Botryosphaeria* conundrum; a New Zealand perspective. *Aust. N. Z. Grapegrow. Winemaker.* September:49-53.

Boubals, D., 1996. L'emploi de l'arsénite de soude en viticulture? Oui!. *In: Convegno nazionale "Arsenico, Si-No"*, 14 dicembre 1995, Codroipo, Udine, Forum fitoiatrici Ersa, Udine, Italy, 15-17.

Bruce, A., Wheatly, R.E., Christien, A.H., Maria, E.J.F. 2000. Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effects on selected wood decay fungi. *Holzforschung* 54: 481-486.

Bruno, G., Sparapano, L. 2006a. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli. *Physiol. Mol. Plant P.* 69: 209-223.

Bruno, G., Sparapano L. 2006b. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungusto-fungus interactions. *Physiol. Mol. Plant P.* 69: 182-194.

Calistru, C., McLean M., Berjak P. 1997a. *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species, *Mycopathologia* 137:115–124.

Calistru, C., McLean M. y Berjak P. 1997b. *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species 1. Macroscopical and microscopical observations of fungal interactions, *Mycopathologia* 139:115–121.

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. CICESE. 98 p.

Carsolio, C., A. Gutierrez, B. Jimenez, M. Van Montagu, y A. Herrera-Estrella. 1994. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10903–10907.

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

Chakraborty M.R. y N.C. Chatterjee. 2008. Control of *Fusarium* wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. Biol. Plantarum. 52 (3): 582-586.

Chakraborty, M.R., Dutta, S., Ojha, S., Chatterjee, N.C. 2004. Antagonistic potential of biocontrol agents against *Botryodiplodia theobromae* causing die-back of Bottle brush (*Callistemon citrinus*). - Acta bot. hung. 46: 279-286.

Chambers, S.M., 1993. Phytophthora *Root Rot of Chestnut*. PhD thesis, University of Adelaide, Adelaide, Australia. 189p.

Cherif, M. y Benharnou, N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology 80:1406-1414.

Chet, I. 1987. *Trichoderma*: application, mode of action y potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi, p. 137–160. In I. Chet (ed.), Innovative approaches to Plant Disease control. John Wiley & Sons, New York.

Cohen, S. D., J. A. Lewis, G. C. Papavizas y G. A. Bean. 1983. Cytological investigation of chlamydospores of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 73:965-972.

Cook, R.J. y Baker, K.F.1989. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society. II Edition. USA 539 p.

Constant, P., Marchay, L., Fischer-Le Saux, M., Briand-Panoma, S., Mauleon, H., 1998. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Guadeloupe Islands. Fundam. Appl. Nematol. 21:667–672.

Cooney, J. M., Lauren, D. R., y di Menna, M. E. 2001. Impact of Competitive Fungi on Trichothecene Production by *Fusarium graminearum*. J. Agric. Food Chem. 49 1:522–526.

Copes, W.E., F.F. Hendrix. 2004. Effect of temperature on sporulation of *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtuse* and *B. rodhina*. Plant Dis. 88: 292-296.

Copping, L.G. 1996. Agrow's Top Twenty Five, PJB Publications. p105. En: Pesticide News Pan-UK 1997.

Crous, P. W., y W. Gams. 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. Nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. Phytopathol. Mediterr. 39:112-118

De la Cruz, J., A. Hidalgo-Gallego, J. M. Lora, T. Benitez, J. A. Pintor-Toro y A. Llobell. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. Eur. J. Biochem. 206:859–867.

Del Rio, J. A., Gonzalez, A., Fuster, M. D., Botia, J. M., Gomez, P., Frias, V., y Ortuño, A. 2001. Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. Phytopathol. Mediterr. 40:394-399.

Demirci, E. Cafer E. y Dane E. 2009. Biological control of *Rhizoctonia solani* on potato by *Verticillium biguttatum*. Af. J. Biotechnol. 8: 2503-2507.

Dennis, C. y J. Webster, 1971a. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. T. Brit. Mycol. Soc. 57:41–48.

Dennis C. y J. Webster, 1971b. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotics. T. Brit. Mycol. Soc.57:25–39.

Dennis L, Webster J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III Hyphal interaction. Trans. Br. Mycol. Soc. 57:363-369.

Desache, F., Courlit, Y. Menard, E. Lurton, L. y B. Leppert, 1992. Protection du vignoble: lutte chimique contre l'escabe la vigne. Progrès agricole et viticole. 109:9: 205-206.

Desache, F., Courlit, Y. y E. Menard, 1995. Optimiser la lutte chimique contre l'esca. *Phytoma*. 344:1:16-19.

Di Marco, S., Mazzulo, A., Calzarano, F. y Cesari, A. 2000. The control of esca: status and perspectives. *Phytopathol. Mediterr.* 39: 232–240.

Di Marco, S., Osti, F., R. Roberti, Calzarano F. y Cesari, A. 2002. Attività di specie di *Trichoderma* nei confronti di *Phaeomoniella chlamydospora*, patogeno associato al mal dell'esca della vite. *Atti Giornate Fitopatologiche*. 2:419–424.

Di Marco, S., F. Osti y A. Cesari, 2004. Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathol. Mediterr.* 43:108–115.

Dubos, B., Bugaret, Y., Bulit J. y Roudet, J. 1983. Maladies du bois: symptomes et méthodes de lutte. *Phytoma*,344(1):16-19.

Dumot, V., Y. Courlit, C. Roulland y P. Larignon, 1999. La maladie du pied noir dans le vignoble Charentais. *Phytoma* 516: 30–33.

Edwards, J., I.G. Pascoe. 2004. Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australas. Plant Path.* 33: 273-279.

Edwards, J., Pascoe, I. G., y Salib, S. 2007. Impairment of grapevine xylem function by *Phaeomoniella chlamydospora* infection is due to more than physical blockage of vessels with 'goo'. *Phytopathol. Mediterr.* 46: 87-90.

Elad, Y., Chet, I. y Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol* 28:719-725

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. y Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73:85-88.

Elad, Y., Rav David D, Levi T, Kapat A, Kirshner B, Gorin E, Levine A. 1999. *Trichoderma harzianum* T39 - mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. Hampshire, UK: Modern Fungicides and Antifungal Compounds II, Intercept Ltd, Handover. 459–467 p.

Elad, Y., G. Zimand, V. Zaqs, S. Zuriel y I. Chet 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. Plant Pathol. 42:324-332.

El-Goorani, M. A., y El Meleigi, M. A. 1972. Dieback of grapevine by *Botryodiplodia theobromae* Pat. in Egypt. Phytopathol.Mediterr. 11:210-211.
Environ. Microbiol. 64:5053-5056.

Erincik, O., L.V. Madden, D.C. Feree, M.A. Ellis. 2003. Temperature and wetness-duration requirements for grape leaf and cane infection by *Phomopsis viticola*. Plant Dis. 87: 832-840.

Eskalen, A. Feliciano A., Gubler W.D. 2007. Susceptibility of Grapevine Pruning Wounds and Symptom Development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phamoniella chlamydospora*. Plant Disease. 91:9:1100-1104.

Evans, H. C., Holmes, K. A., y Thomas, S. E. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa disease. Mycol. Prog. 2:149-60.

Evidente, A., Cabras, A., Maddau, L., Serra, S., Andolfi, A., Motta, A. 2003. Viridepyronone, a new fungal 6-substituted 2Hpyran-2-one produced by *Trichoderma viride*. J. Agr. FoodChem. 51: 6957-6960.

Ferreira, J.H.S., F.N. Mathee, A.C. Thomas. 1989. Fungi associated with dieback and pruning wounds of grapevines in South Africa. S. Afr. J. Enol. Vitic.10:62-66.

Fourie, P.H., Halleen, F., van der Vyver, J. y Schrueder, W. 2001. Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. Phytopathol. Mediterr. 40:S473-S478.

Fouzia, Y. y Shahzad, S. 2005. *In vitro* evaluation of microbial antagonists against *Sclerotium rolfsii*. Pak. J. Bot. 37:4: 1033-1036.

Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of Plant Dis. Annu. Rev. Phytopathol. 26:75-91

Garrett, S. D. 1965. Toward biological control of soil-borne plant pathogens. In *Ecology of Soil-borne Plant Pathogens*, 4-17 (Baker, K. F., Snyder, W. C., Univ. California Press, Berkeley, Calif. 571 p.

Geoffrion, R., 1982. L'esca de la vigne. *Phytoma*, 335:25-26.

Geremia, R. A., G. H. Goldman, D. Jacobs, W. Ardiles, S. B. Vila, M. van Montagu, y A. Herrera-Estrella. 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* 8:603–613.

Ghisalberti, E.L. y Sivasithamparam, K., 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Biochem.* 23:1011–1020.

Gisi, U. Chet, I. Gullino y M. Lodovica (Eds.). 2009. *Recent Developments in Management of Plant Disease* 2nd Printing. XV, 377 p. ISBN: 978-1-4020-8803-2.

Graham, H., J y J.M. Mitchell, 2002. Biological control of soil borne plant pathogens and nematodes (chapter 19). In *Principles and applications of soil microbiology*. Edited by David M Sylvia, J.J. Fuhrmann, Peter G Hartel and David A Zuberer. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ 07458

Graniti, A., Surico G. y Mugnai L. 2000. Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? *Phytopathol. Mediterr.* 39:16–20.

Grasso, S., Magnano Di San Lio G. 1975. Infections of *Cylindrocarpon obtusisporum* on grapevines in Sicily. *Vitis.* 14: 36–39.

Groenewald, M., J. Kang, P.W. Crous W. Gams. 2001. ITS and b-tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* species. *Mycol. Res.* 105: 651-657.

Groenewald, M., S. Denman, P.W. Crous. 2000. Fungicide sensivity of *Phaeomoniella chlamydospora* the causal organism of Petri grapevine decline. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 59-61.

Gubler, W. D., Rolshausen, P. E., Trouillas, F. P., Úrbez-Torres, J. R., Voegel, T., Leavitt, G. M., y Weber, E. A. 2005. Grapevine trunk diseases in California. *Pract. Winery Vineyard* (Jan/Feb):6-25.

Halleen, F., Crous, P. W., y Petrini, O. 2003. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australas. Plant Path.* 32, 47-52.

Halleen, F., P.H. Fourie y P.W. Crous, 2006. A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 45:S55–67.

Hallen, P.H, Fourie, P.H., y Crous P.W. 2007. Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathol.* 56: 637-645.

Haran, S., H. Schickler, A. Oppenheim, y I. Chet. 1995. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 99:441–446.

Harman, G. E. y Kubicek, C. P. 1998. *Trichoderma and Gliocladium, Vol. 2, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. Taylor & Francis, London. 393 pg. World Health Organization. 1994. WHO/PCS/94.87 Data sheet on benomyl, Geneva,. En: Pesticide News Pan-UK 1997.

Harman, G. E., C. K. Hayes, M. Lorito, R. M. Broadway, A. Di Pietro, C. K. Peterbauer, y A. Tronsmo. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83:313–318.

Harman, G. E. 2000. The myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* strain T-22. *Plant Dis.* 84:377-393.

Harman, G. E., Howell C. R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts, *Nature Reviews.* 2: 43-56.

Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.

Harper, S. H. y Lynch, T. 1985. Colonization and descomposition of straw by fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 85:655–661.

Henis, Y., Adams, P. B., Papavizas, G. C., y Lewis, J. A. 1983. Penetration of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 73:1043-1046

Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte E. y Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66:1890-1898.

Hernandez-Martinez, R., Valenzuela-Solano C., Candolfi-Arballo O. y Plata-Caudillo J. A. 2008. Trunk diseases on grapevine caused by fungi in Baja California, México. Phytopathology. 98:S67.

Hickey, P.C., Swift S.R., Roca M.G., Read N. D. 2004. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. Methods Microbiol. 34:63–87.

Hjeljord L, Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds). Volumen 2. 131-151 p.. Taylor & Francis.

Howell, C. R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. Pages 173-184 in: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. G. E. Harman and C.P. Kubicek, eds. Taylor and Francis, London.

Howell C.R., y Stipanovic R.D. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. Phytopathology 85:469–472.

Hunt, J.S., Gale, D.S.J., Harvey, I.C. 2001. Evaluation of *Trichoderma* as bio-control for protection against wood-invading fungi implicated in grapevine trunk diseases. Phytopathol. Mediterr. 40:S485-486.

Hunt H.S. 2004. *Trichoderma* and trunk disease fungi: prospects for new protective management options. The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker. 17-20.

Inbar, J. y Chet, I. 1994. A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and its role in mycoparasitism. Microbiology 140:651-657.

Inbar, J. y Chet, I. 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Microbiology 141: 2823-2829.

Infante D., Martínez B., González N. y Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. [revista en Internet] Abr; 24(1): 14-21. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es.

Jacobs, D., R. Geremia, .A. Goldman, Okamoen G.H., van Montagu y M. A. Herrera-Estrella. 1991. Study of the expression of β -(1,3) glucanase of *Trichoderma harzianum*. Petria. 1:125-133.

Jaklitsch, W.M., Samuels, G., J. Dodd, Lu, S. L., Druzhinina, I. S. 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. Stud. Mycol. 56: 1:135-177.

John, S., Scott, E.S., Wicks, T.J. y Hunt, J.S. 2004. Interactions between *Eutypa lata* and *Trichoderma harzarium*. Phytopathol. Mediterr.43: 95-104.

Larignon, P. y Dubos B. 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. Eur. J. Plant Pathol. 103: 147–157.

Larignon, P. y Dubos, B. 2000. Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. Phytopathologia Mediterranea. 39: 184-189.

Larignon, P., y Dubos, B. 2001. The villainy of black dead arm. Wines Vines. 82:86-89.

Lecomte, P., M. Leyo, G. Louvet, M.F. Corio-Costet, J.P. Gaudillere y D. Blancard. 2005a. Développement des symptômes de Black Dead Arm: un lien avec la rupture de trajets de sève. *Le Progrés Agricole et Viticole* 14: 307–316

Leavitt, G. M. 1990. The occurrence, distribution, effects and control of *Botryodiplodia theobromae* on *Vitis vinifera* in California, Arizona and northern Mexico. Ph.D. dissertation, University of California, Riverside. 216p.

Leavitt, G. M., y Munnecke, D. E. 1987. The occurrence, distribution, and control of *Botryodiplodia theobromae* on grapes (*Vitis vinifera*) in California. (Abstr.) Phytopathology. 77:1690.

Lehoczky, J. 1974. Black dead arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. Acta Phytopathol. Hung. 9:319-327.

LeLay, Y., Ruano-Rosa, D. y López-Herrera, C.. 2007. estudio de compatibilidad *in vitro* de aislados monoconídicos de *Trichoderma* sp. potenciales agentes de biocontrol de la podredumbre blanca del aguacate. Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) 2007. ISBN No 978-956-17-0413-8.

Lora, J. M., J. De La Cruz, T. Benitez, y J. A. Pintor-Toro. 1995. A putative catabolite-repressed cell wall protein from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Mol. Gen. Genet. 247:639–645.

Lorito, M., C. K. Hayes, A. Di Pietro, S. L. Woo, y G. E. Harman. 1994. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3-b-glucosidase and an N-acetyl-b-D-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 84:398–405.

Lorito, M., Woo, S. L., D'Ambrosio, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Kubicek, C. P., y Scala, F. 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. Mol. Plant. Microbe Interact. 9:206-213.

Lumsden, R. D., Ridout, C. J., Vendemia, M. E., Harrison, D. J., Waters, R. M., y Walter, J. F. 1992. Characterization of major secondary metabolites produced in soilless mix by a formulated strain of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. Can. J. Microbiol. 38:1274-80.

Luque, J., Martos, S., y Phillips, A. J. L. 2005. *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. Mycologia 97:1111-1121.

Maluta, D.R. y Larignon, P. 1991. Pied-noir: mieux vaut prévenir. *Viticulture* 11: 71–72.

Marchi, G., Roberti, S., D'Ovidio, R., Mugnai, L., y Surico, G. 2001. Pectic enzymes production by *Phaeomoniella chlamydospora*. Phytopathol. Mediterr.. 40:S407-S416.

Margolles-Clark, E., G. E. Harman, y M. Penttilä. 1996. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression on *Trichoderma reesei*. Appl. Environ. Microbiol. 62:2152-2155.

McIntyre, M., Nielsen J, Arnau J., van der Brink H., Hansen K., Madrid S. (eds). 2004. Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. Copenhagen, Denmark. 47p.

Meneguz, A. y C. Zaghi, 1996. Tossicità e impatto dell'arsenico. *In*: Convegno nazionale "Arsenico, Si-No", 14 dicembre 1995, Codroipo, Udine, Forum fitoiatrici Ersa, Udine, Italy, 37-46.

Merrin, S.J., N.G. Nair y J. Tarran. 1995. Variation in *Phomopsis* recorded on grapevine in Australia y its taxonomic an biological implications. *Australas. Plant Path* 24; 44-56.

Messina, J. 1999. The use of beneficial *Trichoderma* in grapevine propagation. Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society 48:145–148.

Migheli, Q., Whipps, J. M., Budge, S. P. Lynch, J. M. 1995. Production of inter- and intra-strain hybrids of *Trichoderma* spp. by protoplast fusion and evaluation of their biocontrol activity against soil-borne and foliar pathogens. *J Phytopathol* 143: 91-97.

Mihuta-Grimm, L. y Rowe, C. 1986. *Trichoderma* spp. as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems. *Phytopathology*. 76:306-312.

Morton, L. 1999. On the trail of black goo. *In*: Black goo - Occurrence and Symptoms of Grape Declines. IAS/ICGTD Proceedings 1998, (L. Morton, ed.), International Ampelography Society, Fort Valley, Virginia, USA, 1-10.

Mostert, L., J.Z. Groenewald, R.C.P.W. Crous, J. Kang, A.J.L. Phillips. 2005a. Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. *J. Clin. Microbiol.* 43:1752-1767.

Mostert, L., P.W. Crous, J. Kang, A.J.L. Phillips. 2001. Species of *Phomopsis* and *Liberella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia* 93: 146-167.

Mostert, L., F., Hallen, P.H. Fourie, P.W. Crous. 2005b. A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and esca of grapevines. *Phytopathol. Mediterr.* 45:12-29.

Mugnai, D., Ranfagni A., y Schulman L. 1997. Delay time measurements in a diffraction experiment: A case of optical tunneling. *Phys. Rev. E* 55, 3593–3597

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

Mullins, M.G., Bouquet A, Williams, L.E. 1992. *Biology of the grapevine.* Cambridge: Cambridge University Press.

Munkvold, G.P. y J.J. Marois. 1995. Factors associated with variation in susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Eutypa lata*. *Phytopathology* 85: 249-256.

Nelson, E. B., G. E. Harman, y G. T. Nash. 1988. Enhancement of *Trichoderma*-induced biological control of *Pythium* seed rot and pre-emergence damping-off of peas. *Soil Biol. Biochem.* 20:145-150.

Neri, L., Baraldi, R., Osti, F. and Di Marco, S. 2008. Effects of *Trichoderma harzianum* applications on fresh pruning wounds in *Actinidia deliciosa* for the protection against pathogens associated with the “wood decay” of kiwifruit. *Cultivating the Future Based on Science: 2nd Conference of the International Society of Organic Agriculture Research ISOFAR, Modena, Italy, June 18-20.*

Oh, H. S. y Lee, Y. H. 2000. A target-site-specific screening system for antifungal compounds on appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 90:1162-1168.

O'Keeffe, M. y Farrell, F. 2000. The importance of chemical residues as a food safety issue. *Irish J. Agr. Food Res.* 39:257-264.

Pal, K. K. y B. McSpadden Gardener, 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. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23:23–54.

Petit, E. y W. D. Gubler. 2005. Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Dis.* 89:1051-1059.

Pascoe, I. 1998. Trunk diseases of grapevines, perspectives from a tour of California. *Aust. Graper. Winem.* 417:68-71.

Paulitz, T. y Bélenger, R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:103-33.

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

Phillips, A. J. L. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathol. Mediterr.* 41:3-18.

Punitthalingam, E., y J. M.Waller. 1976. *Botryosphaeria obtusa*. Description of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 394 p.

Punitthalingam, E. 1980. Plant Dis.s attributed to *Botryodiplodia theobromae*. In: *Biblioteca Mycologica*. J. Cramer, Berlin. 121 p

Punja, Z. K.1997. Comparative efficacy of bacteria, fungi, and yeasts as biological control agents for diseases of vegetable crops. *Can J. Plant Pathol.* 19:315-323

Rego, C., Oliveira, H., Carvalho, A., y Phillips, A. 2000. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. And *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathol. Mediterr.* 39:76-79.

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

Roiger, D. J., Jeffers, S. N. y Caldwell, R. W. 1991. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biol Biochem* 23:353-359.

Rooney, S. N., Eskalen, A., y Gubler, W. 2001. Recovery of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from soil and grapevine tissues. *Phytopathol. Mediterr.* 40:S351-356.

Rovesti, L., y Montermini, A. 1987. A grapevine decline caused by *Spaheropsis malorum* widespread in the province of Reggio-Emilia. Inf. Fitopatol. 37:1-59.

Royse ,D. J. y Ries S. M. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. Pythopathology 68: 603-607

SAGARPA. 2005. Ocupa México el quinto lugar mundial como exportador de uva de mesa; envió a los mercados internacionales 123 mil 693 toneladas en el 2004 Boletín no. 215/05. México.

Samuels, G.J., Brayford, D. 1990. Variation in *Nectria radicola* and its anamorph *Cylindrocarpon destructans*. Mycol. Res. 94: 433-442.

Santos, C., Fragoeiro S., Valentim, H., y Phillips A. 2006. Phenotypic characterisation of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* strains isolated from grapevines: enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses. Sci. Hortic. Amsterdam. 107:123-130.

Savocchia, S., E.N. Laurent, B.J. Stodart, C.C. Steel. 2005. Botryosphaeria canker and sensivity to fungicides in vivo. In "Proceedings of the 43rd Annual Congress of th South African Society for Plant Pathology". 88 p.

Scheck, H.S., Vazquez, S.J., Gubler, W.D. y Fogle, D. 1998. Young grapevine decline in California. Pract. Winery Vineyard 3: 32-38.

Sepúlveda-Betancourt, J. 2009. Distribución geográfica y estadística de los viñedos en Baja California. VI Seminario Internacional de Vitivinicultura. México. 26 p.

Sistema Producto Vid. 2009. Disponible en: <http://vidyvino.org> (Acceso Junio 2009).

Sivasithamparam, K., y Ghisalberti, E. L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Pages 139-191 in: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1. C. P. Kubicek and G. E. Harman, eds. Taylor and Francis, London.

Sosnowski M., D. Shtienberg, M. Creaser, T. Wicks, R. Ladrner, E. Scott. 2005. Unlocking the secrets of annual variation in eutypa dieback symptoms. The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker. Annual Technical.

Sosnowski, M.R., Creaser, M y Wicks, T. 2004. Managing eutypa dieback of grapevines by remedial surgery. *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* 488: 35-39.

Sparapano, L., Bruno, G., Ciccarone, C., y Graniti, A. 2000. Infection of grapevines with some esca disease associated fungi. II. Interaction among *Fomitiporia punctata*, *Phaeoacremonium chlamydosporum* and *P. aleophilum*. *Phytopathol. Mediterr.* 39: 53-58.

Surico G., S. Di Marco, L. Mugnai y G. Marchi, 2006. Il mal dell'esca della vite: luci ed ombre delle ricerche sulla malattia. *Atti "Incontri fitoiatrici 2006"*. 21–27.

Surico G., L. Mugnai y Guido Marchi. 2008. The Esca Disease Complex. Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria. 3:119–136.

Tabacchi, R., Fkyerat, A., Poliart, C., y Dubin, G-M. 2000. Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 39:156-161

Taylor, A., Hardy, G. E. St. J., Wood, P., y Burgess, T. 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Aust. Plant Pathol.* 34:187-195.

Trocconi, L., Calamassi, R., Mori, B., Mugnai, L., y Surico, G. 2001. *Phaeomoniella chlamydospora* grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection. *Phytopathol. Mediterr.* 40:400-406.

Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., y Gubler, W. D. 2006a. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Dis.* 90:1490-1503.

Úrbez-Torres, J. R., Peláez, H., Santiago, Y., Martín, C., Moreno, C., y Gubler, W. D. 2006b. Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea*, and *B. parva* associated with grapevine trunk diseases in Castilla y León region, Spain. *Plant Dis.* 90:835.

Úrbez-Torres, J. R., G. M., Leavitt, J. C Guerrero, J., Guevara, y W. D. Gubler, 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Dis.* 92:519-529.

US EPA. 1996. List of Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential, US EPA Office of Pesticide Programs, Washington, US.

USDA, Californian Agricultural Statistics Service 2009. Californian agriculture overview. United States Department of Agriculture.

van Niekerk, J., P. Crous, J.Z. Groenewald. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*. 96: 781-798.

van Niekerk J., J.Z. Groenewald, D.F. Farr, P.H. Fourie, F. Hallen P. Crous. 2005. Reassessment of Phomopsis species on grapevines. *Australas. Plant Path.* 34: 27-39.

van Niekerk, J., P.H. Fourie, F. Hallen, P. Crous. 2005a. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 45: S43-S54.

van Niekerk, Crous P.W., J.M., Fourie, P.H., Groenewald, J.Z. y Hallen, P.H. 2002. *Botryosphaeria* canker and dieback of grapevines. Wynboer: A Technical Guide for Wine Producers. 112 p.

van Niekerk, J.M., Fourie, P.H., Hallen, P.H. y Crous P.W. 2006. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 45:S43-S54.

van Tilburg, A.-U., Thomas, M. D. 1993. Production of extracellular proteins by the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. *Appl. Environ. Microb.* 59: 236-242.

Velázquez, J. y Pineda, J. 1995a. Evaluación en campo de 5 aislamientos de *Trichoderma harzianum*, para el control de *Sclerotium rolfsii*. (Resumen). *Revista Forestal Venezolana* 1(1):32-39

Velázquez, J. y Pineda, J. 1995b. Antagonismo "In vitro" de 5 aislamientos de *Trichoderma harzianum* vs *Sclerotium rolfsii* Sacc. *gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycol. Prog.* 2:149-160.

Verma, M. Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli y J.R. Valero. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Bioch. Eng. J.* 37:1-20.

Vey, A, Hoagland RE, Butt TM 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. CAB International, Bristol. pp 311-346.

Waite, H. y May, P. 2005. The effects of hot water treatment, hydration and order of nursery operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars. *Phytopathol. Mediterr.*44:144-152.

Waite, H. y Mortom, L. 2007. Hhot water treatment, trunk disease and other critical factors in production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathol. Mediterr.*46:5-17.

Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B., Thomashow, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 40:309–348.

Wheatly, R.E., Hackett, C., Bruce, A., Kundzewicz, A. 1997. Effect of substrate composition on the production of volatile organic compound of *Trichoderma* spp. inhibitory to woody decay fungi. *Int. Biodeter. Biodegr.* 39:199-205

Whipps, J. M. 1987. Effect of Media on Growth and Interactions between a Range of Soil-Borne Glasshouse Pathogens and Antagonistic Fungi. *New Phytologist.* 107:1:127-142.

White, T.J., Bruns, S., Lee, y J., Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA. 50 p.

Whiting E. C., Khan A., Gubler W.D., 2001. Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaemoniella chlamydospora* and *Phaeacremonium* spp. *Plant Dis.* 85:195-201.

Wilson, M. 1997. Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: Current approaches and future prospects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:188-191.

Windels, C. E. y Lindow S.E. 1985. Biological Control on the phylloplane. *APS. St Paul, MN.* 6-30 p.