

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



---

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

---

**Evaluación de *Trichoderma* spp. sobre hongos causantes de yesca en vid**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

Candelario Serrano Gómez

Ensenada, Baja California, México

2014

Resumen de la tesis de Candelario Serrano Gómez, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida con orientación en Microbiología.

Evaluación de *Trichoderma* spp. sobre hongos causantes de yesca en vid

Resumen aprobado por:

---

Rufina Hernández Martínez

## Resumen

Las enfermedades de la madera asociadas con *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pm*) y *Phaeoacremonium aleophilum* (*Ph*) son consideradas emergentes en los viñedos. El uso de fungicidas de síntesis química se ha restringido debido a la contaminación ambiental y a su toxicidad al hombre por lo que se buscan alternativas de control biológico, por ejemplo con hongos como *Trichoderma* spp. Se evaluó la tolerancia de tres cepas nativas de *Trichoderma* al fungicida azoxistrobin, se determinó la actividad quitinolítica, su prevalencia en viñedos comerciales, así como su uso potencial como control biológico sobre *Pm* y *Ph* en vid en condiciones de invernadero. En cuatro dosis de azoxistrobin: 0.03, 0.05, 0.3 y 1.5 g/L, *T. harzianum* SACH21-3 (T3) a 72 h de observación, presentó mayor crecimiento micelial en todas las concentraciones comparado con las cepas *T. gamsii* CCMT01 (T5) y *T. gamsii* SACH26-1 (T6), a las 40 h todas las cepas en los tratamientos llenaron de micelio las cajas Petri. La evaluación de quitinasas en medio sólido resultó positiva únicamente con las cepas T3 y T6. En medio líquido suplementado con quitina coloidal al 4.5 % las cepas T3 y T5 expresaron mayor nivel de quitinasas; sin embargo la cepa T6 presentó valores mayores al utilizar medio mineral. Se evaluó el porcentaje de recuperación de las cepas en campo a 40, 60 y 112 días después de la inoculación. Para T3 éstos fueron de 58, 33.3 y 8.3 %; para T5 de 8.3, 8.3 y 0 % y nulos para la cepa T6. De plantas inoculadas con la mezcla de *Trichoderma* spp., se obtuvieron aislamientos con características morfológicas y niveles de supervivencia correspondientes a la cepa T3. En invernadero las plantas de vid cv. Merlot, coinoculadas con esporas de *Pm* y *Ph* y con las diferentes cepas de *Trichoderma*, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a biomasa de raíz y tallo. En la evaluación de la longitud de la lesión en el tallo, como efecto del control biológico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas. Sin embargo las plantas inoculadas con la cepa T3 y *Pm-Ph*, presentaron lesiones de menor longitud. Debido a los porcentajes de supervivencia, la tolerancia al fungicida, los valores de quitinasas y disminución de las lesiones en presencia de los fitopatógenos, se recomienda a la cepa *T. harzianum* SACH21-3 para futuras investigaciones en control biológico.

Palabras clave: **control biológico, quitinasas, enfermedades de la madera**

Abstract of the thesis presented by Candelario Serrano Gómez as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology.

Evaluation of *Trichoderma* spp. causing esca fungus on grapevines

Abstract approved by:

---

Rufina Hernández Martínez

### Abstract

Grapevine trunk diseases associated with *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pm*) and *Phaeoacremonium aleophilum* (*Ph*) are considered emerging in vineyards worldwide. The use of chemical fungicides has been restricted due to pollution to the environment and toxicity to humans, then there is a continuous search for alternatives environmentally friendly methods such as the use of biological control with fungi such as *Trichoderma* spp. Tolerance of three native *Trichoderma* strains to the fungicide azoxystrobin, their chitinolytic activity, prevalence in commercial vineyards, and its potential use as a biological control of *Pm* and *Ph* were evaluated. At 72 hours of observation at four doses of azoxystrobin: 0.03, 0.05, 0.3 and 1.5 g / L, *T. harzianum* SACH21-3 (T3) exhibited higher mycelial growth than *T. gamsii* CCMT01 (T5), and *T. gamsii* SACH26-1 (T6), but at 40 h all strains in all treatments filled the Petri dishes. Evaluation of chitinases in solid medium was positive only with T3 and T6 strains. In liquid medium supplemented with 4.5 % chitin T3 and T5 strains expressed higher levels of chitinase, however T6 showed higher values when using a mineral medium. Percentage of recovery in cv. Merlot planted in the field 40, 60, and 112 days after inoculation, was 58, 33.3, and 8.3% for T3; 8.3, 8.3 and 0% for T5. T6 was never recovered. From plants inoculated with a mixture of *Trichoderma*, only strains with morphological and survival rates corresponding to T3 were obtained. Under greenhouse conditions, vines cv. Merlot, which were co-inoculated with spores of *Pm. chlamydospora* and *Ph. aleophilum* (*Pm.-Ph.*) and different strains of *Trichoderma* showed no statistically significant difference in root and stem biomass. The length of the lesion in the stem, as an effect of biocontrol, showed no significant difference between the strains, however the plants inoculated with T3 and *Pm.-Ph.* displayed shorter lesion length. For its survival rates, fungicide tolerance, chitinases production and the size of lesions in the presence of pathogens, *T. harzianum* SACH21-3 is recommended for future research.

Keywords: **biological control, chitinases, wood diseases.**

## Dedicatoria

יְהוָה

*In memoriam:*

*Felicio Gómez Torres y Patricio Serrano Ramírez*

A la familia Ojeda-Tavizón y mi papá Angel,

mis hermanas Narcisa, Lupe, Tolla y

hermanos Otilio y Román

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca otorgada 262384

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California  
CICESE

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP, Región Norte-Centro y al Campo Experimental Pabellón, por mi carrera profesional

A los miembros de comité de tesis por las sugerencias al trabajo experimental e impulsarme en los momentos de resultados negativos y correcciones al manuscrito. Gracias Horacio, Dr. Segovia y Dr. César

A la vitivinícola Château Camou “El arte de crear grandes vinos” por las facilidades otorgadas para el experimento en campo

Al Departamento de Microbiología del CICESE

A Rufina por la metamorfosis de jefa a líder del grupo de Fitopatología del CICESE  
a Rachel y Elodia porque nuestra amistad es mas allá de los meses queda bien

A los M. en C. Francisco Javier Morales Santos por su vigilancia y apoyo incondicional, Carla Cristina Uranga Solís, Marcos Paolinelli y Dra. Roxy Fajardo por sus críticas al diseño experimental a este proyecto de tesis

A la generación 2011 maestría en Ciencias de la Vida y tod@s los amigos de

Biología experimental y aplicada y, al laboratorio de fitopatología

A las asociaciones de Tae Kwon Do del estado de Baja California e Instituto Cárdenas Ensenada y Pelicarrones FC

## Contenido

Resumen.....	ii
Abstract.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	x
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. La viticultura en México.....	3
2.2. Enfermedades de la madera de vid.....	3
2.2.1. Enfermedad de Yesca.....	4
2.2.2. Incidencia de la enfermedad de yesca en viñedos.....	6
2.3.1. Características morfológicas de hongos asociados a yesca.....	6
2.3.2. <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> .....	6
2.3.3. <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	7
2.4.1. Dinámica infectiva en el desarrollo de las enfermedades vasculares en vid.....	7
2.4.2. Virulencia de hongos asociados a las enfermedades de la madera de vid.....	8
2.5.1. Control de las enfermedades de la madera.....	8
2.5.2. Uso de <i>Trichoderma</i> sp. para el control biológico de hongos fitopatógenos.....	10
2.5.3. <i>Trichoderma</i> sp. en el control biológico de hongos de la madera causantes de yesca en vid.....	11
2.5.5. Actividad quitinasa de <i>Trichoderma</i> sp. relacionadas a control biológico.....	12
2.6. Justificación.....	14
2.7. Hipótesis.....	15
2.8. Objetivos.....	15
2.8.1. General.....	15
2.8.2. Particulares.....	15
3. Materiales y métodos.....	16
3.1. Tolerancia a fungicida de aislamiento de <i>Trichoderma</i> sp. nativa.....	16
3.2.1.1. Evaluación de actividad cualitativa de quitinasa en medio sólido.....	16
3.2.1.2. Preparación de quitina coloidal.....	16
3.2.1.3. Preparación del medio sólido suplementado con púrpura de bromocresol.....	17
3.3. Inducción de quitinasas en medio líquido suplementado con quitina.....	17
3.4. Cuantificación de actividad quitinasa.....	18
3.5. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE).....	18
3.6.1. Tinción con Coomassie coloidal.....	19
3.6.2. Tinción con nitrato de plata.....	19
3.7.1. Área de estudio en campo.....	20
3.7.2. Evaluación de las plantas del viñedo.....	20
3.7.3. Producción de inóculo de <i>Trichoderma</i> spp.....	20
3.7.4. Aplicación de tratamientos en viñedo comercial.....	21
3.8.1. Producción de inóculo de <i>Phaeoconiella</i> y <i>Phaeoacremonium</i> .....	22

3.8.2. Tratamientos en condiciones de invernadero .....	22
3.8.3. Evaluación del experimento en condiciones de invernadero .....	24
3.9. Análisis estadísticos .....	24
4. Resultados .....	25
4.1. Evaluación in vitro de la inhibición del fungida Azoxistrobin hacia <i>Trichoderma</i> spp. ....	25
4.2. Actividad enzimática quitinasa .....	28
4.2.1. Evaluación cualitativa de quitinasa en medio sólido .....	28
4.2.2. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	29
4.2.3. Evaluación cuantitativa de quitinasas utilizando microplacas .....	31
4.4. Experimento de campo .....	33
4.4.1. Prevalencia de <i>Trichoderma</i> spp. como endófito de vid en condiciones de campo .....	33
4.3. Coinoculaciones de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Pm. chlamyospora-Ph. aleophilum</i> en invernadero.....	35
4.3.1. Biomasa de raíz y tallo .....	35
5. Discusión.....	41
Conclusiones .....	45
Recomendaciones .....	46
6. Referencias bibliográficas .....	47

## Lista de Figuras

---

- Figura 1. Infiltración de una suspensión conidios ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^5$ /ml de *Trichoderma* spp. y de *Pm. Chlamydospora* combinada con *Ph. aleophilum* (*Pm-Ph*) en madera de vid cv. Merlot en pie franco. Con la ayuda de una jeringa se inocularon 20  $\mu$ l de *Trichoderma* en el segundo entrenudo (a) y de *Pm-Ph* en el último entrenudo activo (b). ..... 24
- Figura 2. Inhibición del crecimiento de *Trichoderma* spp. en diferentes concentraciones del fungicida azoxistrobin después de 2 días de crecimiento: a) 0.03 g/L, b) 0.05 g/L, c) 0.3 g/L y d) 1.5 g/L. TT3, TT5 y TT6 son los tratamientos testigo sin fungicida. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes  $P > 0.05$ , según la prueba de Tukey. .... 26
- Figura 3. a) Inhibición del crecimiento de *T. gamsii* T5 en dosis de 0.3 g/L del fungicida azoxistrobin. b) crecimiento micelial en medio PDA sin fungicida. La fotografía de ambas cajas se tomó después de cuatro días de crecimiento. En líneas punteadas se marcó el crecimiento cada 24 h. .... 27
- Figura 4. Cuantificación de quitinasa en PDA suplementado con 4.5 g de quitina coloidal y 0.2 % de púrpura de bromocresol. En columnas *T. harzianum* SACH21-3 (a) y (b), *T. gamsii* CCMT01(c) y (d), *T. gamsii* SACH26-1 (e) y (f). La línea (b), (d) y (f) corresponde a los mismos hongos crecidos en PDA utilizados como testigos. .... 28
- Figura 5. Gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes de extractos crudos de cepas de *Trichoderma* spp. cultivadas en presencia de quitina coloidal al 4.5 % como inductor (quitina) o en medio mineral sin quitina (Min). Tinción con coomasie coloidal ..... 29
- Figura 6. Gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes de extractos crudos de cepas de *Trichoderma* spp. cultivadas en presencia de quitina coloidal al 4.5 % como inductor (quitina) o en medio mineral sin quitina (Min). Tinción con nitrato de plata. .... 30
- Figura 7. Curva de calibración utilizando diluciones seriadas de quitina azure de 0 a 2 mg/ml. 31
- Figura 8. Aislamientos de *Trichoderma* spp. recuperados de vides cv. Merlot plantadas en campo, en tres fechas de muestreo 40, 60 y 112 días después de la inoculación (ddi). Tratamientos: cepas T3, T5, T6; Testigo: agua corriente y Mix: mezcla de las tres cepas. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de 12 muestras por tratamiento. .... 34
- Figura 9. Biomasa del sistema radical de plantas de vid cv. Merlot en maceta inoculados con *Trichoderma* y *Ph. chlamydospora-Pa. aleophilum*. TT3, TT5 y TT6: tratamientos de *T. harzianum* SACH21-3, *T. gamsii* CCMT01 y *T. gamsii* SACH26-1 respectivamente. *Pm.-Ph*: doble inoculación con *Pm. aleophylum* y *Ph. chlamydospora*. T3+*Pm.-Ph.*, T5+ *Pm.-Ph.* y T6+ *Pm.-Ph.*, combinaciones de los patógenos con las *Trichoderma* spp. El testigo fue inoculado con agua. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro repeticiones por tratamiento. .... 36



Figura 10. Biomasa del tallo de plantas de vid cv. Merlot en experimentos en maceta. Las plantas fueron inoculados con *Trichoderma* spp. (T3, T5 y T6) y *Pm. chlamydospora-Ph. aleophilum*. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro repeticiones por tratamiento. . 37

Figura 11. Longitud de la lesión basipétala en madera de vid cv. Merlot, por inoculaciones de esporas de *Pm. chlamydospora* y *Ph. aleophilum* (*Pm.-Ph.*), después de cuatro meses. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro repeticiones por tratamiento. .... 39

Figura 12. Longitud de la lesión acropétala en la madera de vid cv. Merlot, en inoculaciones de esporas de *T. harzianum* T3, *T. gamsii* T5 y T6 después de cuatro meses. Testigos: agua esterilizada (TESTIGO) y cepas de *Trichoderma* (TT). Las barras representan la media  $\pm$  1 desviación estándar de cuatro muestras. .... 40

## Lista de Tablas

---

Tabla 1. Nomenclatura de quitinasas según el sustrato de reacción y de acuerdo con la Unión internacional de bioquímica y biología molecular.....	13
Tabla 2. Tratamientos usados para evaluar el establecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. en un viñedo comercial inoculados por aspersión a cuatro y seis días posteriores a la poda. ....	21
Tabla 3. Tratamientos usados para evaluar el efecto del hongo de control biológico <i>Trichoderma</i> spp. sobre los patógenos <i>Pm. chlamydospora</i> y <i>Ph. aleophilum</i> inoculados en el tallo de vid cv. Merlot en condiciones de invernadero. ....	23
Tabla 4. Producción de quitinasas en medio mineral suplementado con quitina coloidal y medio mineral en extractos crudos de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. posterior a cinco días de incubación. ....	32

## 1. Introducción

---

Los fitopatógenos provocan pérdidas económicas y materiales cuantiosas cuando se presentan condiciones ambientales y de cultivo apropiadas (Agrios, 2010). Algunos desordenes fisiológicos considerados de poco impacto económico tres décadas atrás, ahora son enfermedades emergentes; dentro de este grupo se encuentra la enfermedad de la madera conocida como yesca, la cual afecta viñedos de uno a nueve años de edad (Mugnai et al., 1999; Surico, 2001). Se ha observado que a partir de la restricción de uso del arsenito de sodio en el control de las enfermedades en los viñedos, el valor mundial aproximado sólo por concepto del replante de parras afectadas por enfermedades de la madera es de \$1,502,000,000 dólares EE.UU (Del Rivero y García-Marí, 1984).

Los fungicidas de síntesis química para el control de yesca son poco efectivos (Darrieutord y Lecomte, 2007; Serra et al., 2008), los ingredientes activos que contienen no tienen registro de uso en muchos países (Jaspers, 2001) y tienen poco efecto sistémico en la parra (Díaz y Latorre, 2013), por lo que el control biológico es una de las opciones con mayor potencial para sustituirlos. El control biológico es la inducción del crecimiento de organismos que inhiben una población considerada como patógena (Ochoa, 2002), favoreciendo alguna actividad económica como la agricultura (Guigón-López et al., 2010; Hermosa et al., 2012).

Se conocen aproximadamente 50 especies de hongos involucrados en las enfermedades de la madera, dependiendo de las condiciones ambientales de cada país algunos géneros pueden ser más o menos importantes, esto complica el manejo desde una perspectiva general (Úrbez-Torres, 2011). Los estudios que se han realizado en Baja California muestran la presencia de los patógenos de la madera *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pm*) y *Phaeoacremonium aleophilum* (*Ph*) y su asociación con plantas con síntomas de yesca. Este complejo se caracteriza por la presencia de patrones atigrados en las hojas, la producción de goma en las heridas de poda, lesiones necróticas en forma de puntos alrededor de la médula y el decaimiento progresivo en plantas de vid mayores de 25 años (Surico et al., 2004).

En otros países se han evaluado el uso de cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de la yesca. Entre los principales mecanismos del biocontrol que presenta sobresalen: a) antagonismo por la producción de metabolitos secundarios, sustancias antifúngicas volátiles y no volátiles; b) micoparasitismo por la producción de enzimas hidrolíticas y c) competencia por nutrimentos y espacio en la rizósfera o como endófitos (Mukherjee et al., 1992; Infante et al., 2009). Se ha observado que las *Trichoderma* spp. tienen diferentes modos de acción, por lo que se recomienda la evaluación de cepas locales antes de utilizarlas en el control de los hongos patógenos presentes en la zona (Gveroska y Ziberoski, 2011; Hofstetter et al., 2012).

En este trabajo se evaluó la tolerancia de cepas de *Trichoderma* spp. nativas al fungicida Azoxistrobin; se cuantificó su producción de quitinasas o enzimas relacionadas con la habilidad de degradar la pared celular de hongos; se dedujo su persistencia en la madera de un viñedo comercial y, finalmente, se evaluó la disminución de necrosis en la madera de vides inoculadas con *Ph* y *Pm* en condiciones de invernadero.

## 2. Antecedentes

---

### 2.1. La viticultura en México

En México, 14 Estados se dedican a la producción de uva, entre los que destacan Sonora, Zacatecas, Baja California, Aguascalientes y Coahuila, contribuyendo con el 97.7% de la superficie sembrada a nivel nacional (SIAP, 2014). Los rendimientos de este cultivo están en un rango de 1-2 y de 5-10 ton/ha, en sistemas de temporal y de riego, respectivamente (Gaertner, 2008).

En el Estado de Baja California para el año 2012, se registraron 3,497.06 ha dedicadas a la actividad vitícola con un valor de producción de \$ 246,487.51, equivalentes al 12.08 y 3.47 % de la producción a nivel nacional (SIAP, 2014). La asociación de viticultores está formada por 148 productores, distribuidos en los municipios de Mexicali, Tecate, Tijuana y Ensenada. Del total de la superficie, el 80.3 % está dirigida a la producción de vino y un 18.3 % a uva para mesa y pasa. Actualmente se tienen identificados 49 varietales, de los cuales 41 son uva para vino y 8 para el consumo en fresco y de pasa (Sepulveda, 2009).

### 2.2. Enfermedades de la madera de vid

Las enfermedades de la madera provocan el deterioro de la planta y posteriormente la muerte de una parte o de su totalidad (Alaniz-Ferro, 2008). Algunas de estas enfermedades encontradas en vid son la eutipiosis, la yesca, el pie negro y la enfermedad del brazo muerto o muerte regresiva por *Botriosferia* (Punitthalingam y Waller, 1976; Punitthalingam, 1980; Úrbez-Torres, 2011). Los síntomas de las plantas que presentan estas enfermedades son diversos, entre los cuales se observa un decaimiento progresivo o muerte lenta del tejido vegetal (Pascoe, 1998).

### 2.2.1. Enfermedad de Yesca

El complejo de yesca es provocada por la presencia de varias especies de hongos que habitan el xilema, entre estos se encuentran: *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pm. chlamydospora*), *Phaeoacremonium* spp. y varias especies de basidiomicetos, siendo la más común *Fomitiporia mediterranea* (Fischer, 2002; Letousey et al., 2007). Este complejo se caracteriza por la presencia de patrones atigrados en las hojas, la producción de goma en las heridas de poda, lesiones necróticas en forma de puntos alrededor de la médula y el decaimiento progresivo en plantas de vid mayores de 25 años (Surico et al., 2004). Se han descrito varios síndromes involucrados en el complejo de yesca, llamados; veteados en la madera, enfermedad de Petri, yesca joven, yesca crónica y yesca (Mugnai et al., 1999; Surico et al., 2008). Estos se diferencian por la edad del viñedo, los síntomas observados en la planta y por los hongos asociados. Se propone que se presenta una sucesión de hongos en la colonización y conforme transcurren los años, la enfermedad recibe diferentes nombres comunes de acuerdo con la región en estudio (Crous y Gams, 2000; Fischer, 2002; Fischer et al., 2012). En inoculaciones experimentales las enfermedades no han expresado todos los síntomas observados en campo, no obstante en estudios llevados en diferentes países por Graniti et al., (2000) y Cobos-Román (2008), infieren que los basidiomicetos son los primeros colonizadores por su actividad ligninolítica y que después de estos se establecen otros grupos de hongos (Mugnai et al., 1999).

En los síndromes: veteados en la madera, enfermedad de Petri y yesca joven los hongos asociados son *Pm. chlamydospora* y *Ph. aleophilum*. Mientras que la yesca está asociada a *F. mediterranea* y otros basidiomicetos. Por otra parte, se ha indicado que la yesca no es otra cosa que la presencia de dos síndromes (yesca joven y yesca) en una misma planta (Bertsch et al., 2012).

En el caso de veteados en la madera, los síntomas son observados sólo en el tejido interno (Martínez et al., 2005). Pero en la enfermedad de Petri y en yesca se observan síntomas internos y externos en el tejido de la madera y la corona (Kakalíková et al., 2006). Los síntomas más comunes comprenden decoloración en uno o varios vasos del xilema, tejido con necrosis oscurificada o marrón en la médula (Mugnai et al., 1999).

La enfermedad de Petri (Mugnai et al., 1999) ocurre en plantas de vid de uno hasta cinco años de edad. Los síntomas observados son la pérdida de vigor, crecimiento débil, tallos delgados y una clorosis inespecífica o necrosis marginal de las hojas (Mugnai et al., 1999). En cortes longitudinales se observan franjas o veteados en la madera con tonalidades marrón-negro, y en cortes transversales, éstos mismos se presentan como un anillo de puntos negros. Con frecuencia son más severos en la parte injertada que sobre el portainjerto, provocando un gran número de injertos fallidos (Mugnai et al., 1999; Surico et al., 2004). Durante los primeros seis años del viñedo, las plantas pueden no presentar síntomas o exhibir el síntoma típico en la hoja de patrón atigrado, magnificándose cuando se presenta un déficit de agua (Surico et al., 2006).

En el caso de la yesca joven, se observan manchas cloróticas entre las nervaduras a lo largo del margen de la hoja, con una línea verde angosta, generando un patrón atigrado. La baya también puede aparecer manchada. Estos síntomas derivan del daño causado en la madera varios años antes y son más comunes después de las lluvias en ambientes secos (Surico et al., 2008). Después se presenta apoplejía, que es el marchitamiento repentino y el colapso de la vid, descrito originalmente como el síndrome agudo de la yesca (Letousey et al., 2010).

Los síntomas foliares se hacen visibles en verano y otoño (Mugnai et al., 1999). Es muy difícil correlacionar el daño foliar con síntomas internos, ya que éstos se ven influenciados por varios metabolitos secundarios producidos por los diferentes hongos implicados (Serra et al., 2008) y por diversos factores ambientales. Además, los vasos bloqueados dentro de las plantas dañadas podrían cambiar los procesos fisiológicos y contribuir a los síntomas foliares (Calzarano et al., 2009). Sosnowski et al. (2005) encontraron que la variación en la severidad de los síntomas foliares observada año a año podría estar influenciada por factores climáticos y no con las prácticas en los viñedos. Por ejemplo, una alta precipitación en el año anterior se vincula con un aumento en los síntomas foliares del próximo año y un aumento en las temperaturas de primavera se relaciona con su disminución.

Los fenómenos que provocan la apoplejía son los veranos calurosos, sobre todo cuando hay lluvia seguidas de estrés hídrico, poca humedad relativa y altas temperaturas (Surico et al., 2006). La sintomatología foliar se observa en la época de la fructificación a partir de la base hacia el brote. Esto es más evidente al inicio de la primavera, la planta expresa poco desarrollo, con retraso de la

brotación y concluye en otoño con la reducción de la lignificación en los sarmientos (Mugnai et al., 1999).

### **2.2.2. Incidencia de la enfermedad de yesca en viñedos**

Alrededor del mundo se presentan grandes pérdidas económicas asociadas con el remplazo de viñedos dañados por yesca. En toda Europa, la incidencia media varía de 1 a 50 % o más, y esto aumenta en los viñedos de más de 10 años (Mugnai et al., 1999; Surico, 2000). En Italia, la enfermedad se encuentra en todas las regiones de cultivo de la vid y en algunas áreas afecta hasta el 50 % de viñedos de más de 15 años de edad (Surico et al., 2006). Otros países con pérdidas millonarias son Australia y Estados Unidos, estimadas anualmente de 20 y 260 millones de dólares, respectivamente (Scheck et al., 1998; Sosnowski et al., 2005).

En la costa de Ensenada se ha encontrado la presencia de *Pm. chlamydospora* y *Ph. aleophyllum*, en plantas adultas con síntomas de enfermedad de Petri y yesca (Hernández-Martínez y Valenzuela-Solano, 2011).

### **2.3.1. Características morfológicas de hongos asociados a yesca**

La yesca es una enfermedad compleja, diferentes hongos pueden provocar los mismos síntomas (Mugnai et al., 1999), en la Costa de Ensenada se ha asociado a la presencia de dos especies (Morales-Pedraza, 2010) que a continuación se describen:

### **2.3.2. *Phaeomoniella chlamydospora***

*Phaeomoniella chlamydospora* (Chaetothyriales, Herpotrichiellaceae) fue aislado por primera vez en 1959, de vides con síntomas de yesca (Bertsch, et al., 2012). Chiarappa (1959) lo clasificó como un *Cephalosporium*, en trabajos posteriores se le designó como *Pm. chlamydospora* (Crous y Gams, 2000). En cultivo de laboratorio en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) se caracteriza por un micelio verde más o menos claro con un borde blanco. Las células conidiógenas tienen en el



extremo una forma que se estrecha como el cuello de una botella, de ellas salen conidios hialinos, elipsoidales de 2.4-6 x 1-2  $\mu\text{m}$ . En cultivos de más de un mes, las hifas se diferencian en células que se recubren de una pared gruesa formando las clamidosporas que son características de la especie (Crous y Gams, 2000).

### **2.3.3. *Phaeoacremonium aleophilum***

El género *Phaeoacremonium* (Diaporthales, Togniniaceae) (teleomorfo *Togninia minima*) nombrado por Crous et al., (1996), se caracteriza por conidióforos simples o ramificados, a veces pigmentados como lo suelen estar las células basales. Las células conidiógenas y las esporas no se distinguen de las de *Pm. chlamydospora*, sin embargo, se diferencian en medio de cultivo PDA, por ejemplo el micelio de *Ph. aleophilum* es de color gris aceitunado y tiñe de amarillo el medio. Otra especie *Ph. viticola*, torna violeta rojizo el medio de cultivo, presenta micelio aéreo y no forma clamidosporas (Martín et al., 2011).

### **2.4.1. Dinámica infectiva en el desarrollo de las enfermedades vasculares en vid**

El estudio de las interacciones de los hongos fitopatógenos de la madera continua en desarrollo (Saikkonen et al., 2004). Los hongos usualmente penetran a su hospedero por algún daño mecánico. Otra estrategia es usar actividad enzimática, que de no llegar a romper las paredes celulares lignificadas (Del Río et al, 2004), usan como ruta de infección alguna herida y secretan toxinas que afectan el metabolismo celular del hospedante reduciendo la síntesis de proteínas relacionadas a patogenicidad, provocando la muerte celular y necrosis (Abou-Mansour et al., 2004).

Se etiquetó con una proteína fluorescente una cepa de *Ph. chlamydospora*, observándose que invade principalmente en los vasos xilemáticos y se propaga a los espacios intracelulares (Mutawila et al., 2011a). Otras especies de hongos de la madera como *L. theobromae*, se desarrollan preferencialmente desde tráqueas y traqueidas hasta colonizar el floema (Biggs y Britton, 1988; Obrador-Sánchez, 2011). Generalmente, las vides más susceptibles y con mayor tasa de muerte son las plantas más jóvenes (Scheck, et al., 1998), de acuerdo con la alta

incidencia, se señala a la reproducción clonal como el principal medio de dispersión del inoculo en las enfermedades de la madera (Gramaje y Armengol, 2011).

En Francia Surico et al. (2008) observaron que la dispersión de esporas de *Pm. chlamydospora* ocurre durante todo el año, en tanto que para *Ph. aleophilum*, se registraron capturas en dos periodos, marzo-abril y mayo-junio, cuando las temperaturas promedio oscilaron entre 7-15 °C y las máximas entre 12-18 °C, después de lluvias. Por lo cual, una actividad importante consiste en proteger las heridas en la parra después de la poda (Eskalen et al., 2007).

#### **2.4.2. Virulencia de hongos asociados a las enfermedades de la madera de vid**

Las enfermedades de la madera en la vid se consideran como altamente infecciosas, principalmente por la propagación clonal del cultivo y por las prácticas culturales que deben realizarse como parte del manejo del viñedo, especialmente la poda (Hidalgo, 2002). La poda origina heridas que constituyen puntos de infección de patógenos y del desarrollo de enfermedades. Conforme transcurren los ciclos productivos o senescencia de los cultivos (Harman et al., 2004) la incidencia y la severidad de la enfermedad puede aumentar (Saikkonen et al., 2004).

En lo que respecta a la virulencia de las cepas aisladas en México, en un estudio en donde se evaluaron cinco cepas, de *Pm. chamydospora* y tres de *Ph. aleophyllum*, todas fueron capaces de producir necrosis en tejido verde de vid seis semanas posterior de haber sido inoculadas, sin embargo las que provocaron la mayor lesión necrótica fueron las cepas de *Pm. chamydospora* (Morales-Pedraza, 2010).

#### **2.5.1. Control de las enfermedades de la madera**

Actualmente las prácticas de control para las enfermedades de la madera son meramente culturales, como la eliminación de las partes enfermas de la planta o la remoción de la planta completa. También se sugiere el uso de productos químicos o biológicos que sellen o cubran las heridas de poda para reducir la propagación de estas enfermedades (Fourie y Halleen, 2004).

Otros métodos incluyen el uso de fungicidas que se utilizan para disminuir la cantidad de inóculo primario y evitar el contacto entre el fitopatógeno y el hospedero (Agrios, 2010). Por ejemplo, Rolshausen et al., (2010) evaluaron cuatro ingredientes activos: pyraclostrobin, tiofanato de metilo, iodocarb y boro en condiciones de campo durante dos años y encontraron que la formulación de pasta del boro tuvo mejor efecto para *Pm. chlamydospora* y *Tognina minima*, pero no mostró efecto contra Botryosphaeriaceae. En este trabajo también se enfatizaron las dificultades de no contar con un producto de amplio espectro y el que se hayan retirado algunos ingredientes activos del mercado por su toxicidad.

Otro método de control utilizado para las enfermedades de la madera es la termoterapia. Ésta se fundamenta en que los órganos vegetativos en latencia toleran temperaturas relativamente altas y en algunas condiciones de esterilización llega a erradicar al patógeno (Agrios, 2010). La termoterapia se utiliza principalmente en los viveros y se emplean temperaturas promedio de 50 °C durante 30 minutos. Los estudios en estas condiciones han logrado reducir la incidencia de *Pm. chlamydospora* en España (Gramaje y Armengol, 2011), no obstante sigue abierta la discusión en cuanto a pérdidas de esquejes principalmente en climas frescos como Australia y Nueva Zelanda (Gramaje et al., 2009)

Se requiere de un sistema integral para el manejo de las enfermedades de la madera que combine tratamientos físicos, químicos y biológicos, y que inicie desde la propagación de material vegetal en los viveros y a través de las diferentes etapas de crecimiento de las plantas. El control biológico ha dado resultados importantes, por lo que existe un incremento significativo en investigación en esta área (Andolfi et al., 2011).

Otra estrategia de manejo de las enfermedades de la madera incluye una combinación de tratamientos químicos y biológicos por ejemplo, el uso de fungicidas en combinación con aislamientos de hongos de biocontrol tolerantes a las dosis sugeridas por los fabricantes (Fourie y Halleen, 2004; Díaz y Latorre, 2013). Con este manejo es posible reducir al mínimo la incidencia de las enfermedades (Gubler and Eskalen, 2008, Gubler et al., 2012).

### 2.5.2. Uso de *Trichoderma* sp. para el control biológico de hongos fitopatógenos

El control biológico es el uso de organismos que son enemigos naturales de un patógeno con el fin de reducir sus efectos dañinos en algún hospedero de interés económico. Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades (Infante et al., 2009). La finalidad del control biológico es favorecer la resistencia del hospedante y el crecimiento de los microorganismos antagonistas del patógeno. Esta protección potencial ocurre en la naturaleza con poca frecuencia y su tasa de desarrollo es lenta, por lo que resulta imperativo inducirla en condiciones experimentales y de campo (López-Mondéjar et al., 2011).

El género *Trichoderma* comprende organismos de fácil aislamiento y cultivo, desarrollo rápido en varios sustratos y usados como controladores biológicos de una amplia gama de fitopatógenos del suelo como *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp., y *Rhizoctonia* spp. (Shalini et al., 2006). Las especies de *Trichoderma* generalmente son aisladas de ambientes terrestres (Ahmad y Baker, 1988) y en algunos casos de sistemas acuáticos marinos (Gal-Hemed et al., 2011). Entre los principales mecanismos del biocontrol que presenta, sobresalen: a) antagonismo por la producción de metabolitos secundarios, sustancias antifúngicas volátiles y no volátiles; b) micoparasitismo por la producción de enzimas hidrolíticas y c) competencia por nutrientes y espacio en la rizósfera o como endófitos (Mukherjee et al., 1992; Infante et al., 2009).

La actividad de micoparasitismo en *Trichoderma* está mediada por el ambiente, las fuentes de carbono disponibles y la producción de enzimas hidrolíticas (Kredics et al., 2003). Este tipo de control biológico lo conforman una serie de pasos consecutivos, previo al contacto directo entre *Trichoderma* spp. y algún hongo fitopatógeno inicia con la exploración por parte del hongo micoparasitico acompañado de enzimas secretadas, tales como quitinasas, glucanasas y proteasas (Benítez et al., 2004). Posteriormente, inicia la formación de estructuras tipo apresorios y el enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* spp. sobre el hospedero como respuesta a la identificación de lectinas (Mukherjee et al., 2012) que en sinergismo con las enzimas, degradan las paredes celulares del hospedero (Qualhato et al., 2013) obteniendo nutrientes del lumen del fitopatógeno.

Estudios recientes han demostrado la capacidad endófitra de *Trichoderma harzianum*, confiriendo una protección sistémica (Harman et al., 2004) o en el sistema radical (Sharfuddin y Mohanka, 2012). Esto permite a la planta responder más rápido al momento de la penetración de otro tipo de hongo (Yoshioka et al., 2011).

### **2.5.3. *Trichoderma* sp. en el control biológico de hongos de la madera causantes de yesca en vid**

La capacidad de biocontrol de *Trichoderma* spp. se ha evaluado en diferentes ambientes desde sistemas urbanos, sistemas forestales y el de mayor desarrollo, en sistemas agrícolas (Fourie y Halleen, 2004).

En evaluaciones del efecto del biocontrol en condiciones *in vitro* contra hongos fitopatógenos de la madera, se encontró que aislamientos nativos de *T. harzianum* (SACH21-3), *T. gamsii* (CCMT01) y *T. gamsii* (SACH26-1) inhibieron el crecimiento total de *Pm. chlamydospora*. El efecto se redujo frente a *Ph. aleophilum*, ya que se observó inhibición parcial con SACH21-3 y completa por SACH26-1 y CCMT01. Por otro lado, al evaluar el efecto de compuestos no volátiles, los tres aislamientos de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento de *Ph. aleophilum*, pero *Pm. chlamydospora* sólo se vio parcialmente limitado por las cepas de *Trichoderma gamsii* (Plata-Caudillo, 2010).

En ensayos realizados en invernadero con vid cultivar (cv.) Montuni inoculados con Trichodex®, un producto comercial a base de *T. harzianum*, se comparó con una cepa nativa de *T. longibrachiatum*. Después de dos años de injertado, se encontró que Trichodex® disminuyó la longitud de la necrosis ocasionada por *Pm. Chlamydospora*. En el mismo trabajo, en condiciones de campo, se evaluó la colonización de Trichodex® en cultivares Riesling y Sauvignon y se observó que la cantidad de inóculo decreció desde 85 hasta 60% después de 60 días. Los niveles de sobrevivencia de *Trichoderma* spp. al inicio de las evaluaciones generalmente son altos y disminuyen al finalizar los experimentos (Di Marco et al., 2004).

En otro trabajo, se evaluó la prevalencia de una cepa comercial de *T. harzianum* (Eco-77®), dos especies nativas de *T. atroviride*: USPP-T1 y USPP-T2, y la combinación USPP-T1+USPP-T2, en ocho cultivares para vinificación: Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Chenin Blanc, Colombar, Merlot, Pinotage, Sauvignon Blanc, Shiraz y cuatro de mesa Globo rojo, Prime, Thompson Seedless y Victoria, en condiciones de campo. Después de ocho meses, la prevalencia media resultó estadísticamente significativa en todos los tratamientos. El mejor hospedero fue el cv. Chenin Blanc, en donde se observaron porcentajes de prevalencia para Eco-77 de 71.4%, para USPP-T1 de 75%, para USPP-T1+T2 de 76.9% y para USPP-T2 de 82.5%. Sólo en el cv. Chardonnay se observó que el tratamiento USPP-T1+T2 no mostró incidencia. Respecto a los cultivares de mesa, el mejor tratamiento se obtuvo en el cv. Thompson Seedless con la mezcla de USPP-T1+T2, con la media de 76.7 %. En general, los tratamientos con *T. atroviride* fueron mejores que los de *T. harzianum*, excepto en el cv. Globo rojo (Mutawila et al., 2011b).

#### **2.5.5. Actividad quitinasa de *Trichoderma* sp. relacionadas a control biológico**

Los polisacáridos que se encuentran en la pared celular de los hongos son glucanos, quitina y en menor proporción, otros polisacáridos (Latgé y Calderone, 2006; Latgé, 2007). Los glucanos son el componente mayoritario de la pared celular, constituyen entre el 20-30 % del total de los polisacáridos (Bowman y Free, 2006). La quitina es uno de los polímeros más abundante después de la celulosa, está compuesta de cadenas de N-acetilglucosamina (Rudall y Kenchington, 1973) y constituye del 10-20% en hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* (Bartnicki-García, 1968; Bernard y Latgé 2001; Riquelme et al., 2011). Este material es sensible a la degradación de la actividad enzimática secretada por otros hongos (Pedraza-Reyes y López-Romero 1989).

Las quitinasas degradan polímeros en N-acetilglucosamina y su función está directamente relacionada con el lugar de síntesis o secreción (Tabla 1). En los hongos, las quitinasas cumplen funciones en la división y diferenciación celular (Adams, 2004). En las especies del género *Trichoderma*, estas enzimas participan en el micoparasitismo. Del complejo enzimático secretado por cepas de este género, una fracción corresponde a endoquitinasas y otro componente

son exoquitinasas (Kovacs et al., 2004), también conocidas como N-acetilhexosaminidasas o quitibiosidasas y N-acetil- $\beta$ -D-glucosamidasas (Lorito et al., 2010).

Tabla 1. Nomenclatura de quitinasas según el sustrato de reacción y de acuerdo con la Unión internacional de bioquímica y biología molecular.

Modo de acción	Enzimas quitinolíticas
Hidrólisis aleatoria de la cadena	1,4- $\beta$ -poli- <i>N</i> -acetilglucosaminidasa CE 3.2.1.14
Hidrólisis del azúcar terminal no reductor	$\beta$ -D-Acetilglucominidasa CE 21.03.30
Eliminación sucesiva de unidad de azúcar desde el extremo no reductor	$\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasa CE 21.03.52
Eliminación sucesiva de azúcar dímero desde el extremo no reductor	Quitobiohidrolasa

Fuentes Patil et al., 2000; Taylor et al., 2002

Estudios *in vitro* con microscopia, mostraron que en la interacción entre las hifas de *Trichoderma* sp. y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici*, el efecto de inhibición se relacionó como la pérdida de turgencia cuando las hifas están próximas entre sí, sugiriendo la secreción de metabolitos secundarios (Kovacs et al., 2004).

## 2.6. Justificación

La presencia de los hongos de la madera de vid se extiende y agudiza en Baja California, y representa una situación adversa a la producción vitivinícola. Los estudios que se han realizado en Baja California muestran la presencia de los patógenos de la madera *Pm. chlamydospora* y *Ph. aleophilum*. En otros países se han evaluado diferentes fungicidas con resultados prometedores. No obstante, la dependencia de la agricultura a estos insumos daña el medio y afecta la salud humana. Con las constantes regulaciones y restricciones en el uso de fungicida y la demanda de productos inocuos, crece el interés por el uso de alternativas al manejo de estas enfermedades, particularmente, el del uso de microorganismos benéficos con amplio espectro de control biológico como *Trichoderma* spp. El control biológico con hongos es una opción con beneficios a largo plazo, ecológicamente amigable con el medio y a los usuarios de esta tecnología. Por esto, se propone el uso del control biológico para inhibir a los hongos fitopatógenos y reducir la severidad del daño de las enfermedades de la madera.



## 2.7. Hipótesis

- a) Cepas de *Trichoderma* spp. aplicadas en heridas de poda de vid son capaces de colonizar y prevalecer en la madera.
- b) La presencia de *Trichoderma* spp. limita la incidencia de *Pm. chlamydospora* y *Ph. aleophilum* en tejido de vid.
- c) Las cepas nativas de *Trichoderma* spp. tienen alta actividad enzimática quitinasa.

## 2.8. Objetivos

### 2.8.1. General

Evaluar *Trichoderma* spp. nativas de Baja California para el control de *Pm. chlamydospora* y *Ph. aleophilum* en vid.

### 2.8.2. Particulares

- Determinar el establecimiento y supervivencia de *Trichoderma* spp. como endófito en vides establecidas en campo para la protección contra hongos patógenos de la madera.
- Determinar el efecto de control biológico de *Trichoderma* spp. coinoculado con *Pm. chlamydospora* y *Ph. aleophilum* en plantas de vid en condiciones de invernadero para conocer si se puede aplicar en un programa de manejo de la enfermedad.
- Cuantificar *in vitro* la producción de la enzima quitinasa en cepas de *Trichoderma* spp. para pronosticar su efecto como biocontroladores.

### 3. Materiales y métodos

---

#### 3.1. Tolerancia a fungicida de aislamiento de *Trichoderma* sp. nativa

Se evaluó la tolerancia de la cepa de *Trichoderma harzianum* T3 al fungicida azoxistrobin. El producto comercial utilizado fue Amistar® (azoxistrobin, 50 % de ingrediente activo). El modo de acción de este fungicida es la restricción de la respiración mitocondrial en los hongos. Tomando como dosis mínima la sugerida en la etiqueta con registro para podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) y mildiu en vid (*Plasmopora viticola*). Se consideró una concentración alta a 10X y se evaluaron cuatro dosis del fungicida a: 0.03, 0.3, 1.0 y 1.5 g/L. Para evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* del crecimiento micelial, primero se realizaron los cálculos para determinar el peso de los productos comerciales para cada concentración del ingrediente activo, se pesó y se preparó una mezcla madre que se agitó hasta obtener una suspensión homogénea. Se preparó medio de cultivo PDA con la concentración ajustada del fungicida y se vertió en cajas de Petri de plástico de 85 mm de diámetro. Una vez solidificado el medio, en el centro de cada caja Petri, se inocularon discos miceliales de 5 mm de diámetro de la cepa de *Trichoderma harzianum* T3 provenientes de cultivos en PDA de cinco días de incubación. Como controles negativos se usaron las cepas crecidas en PDA sin fungicida. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento. Las cajas se incubaron a 28°C en oscuridad hasta que los controles alcanzaron el borde de la caja Petri. Se marcó el crecimiento cada 24 h y se midieron 5 radios por día en cada caja.

##### 3.2.1.1. Evaluación de actividad cualitativa de quitinasa en medio sólido

##### 3.2.1.2. Preparación de quitina coloidal

La quitina coloidal se preparó a partir de hojuelas de quitina (Sigma®) por el método de Roberts y Selitrennikoff (1988). En la primera etapa, y para realizar la hidrólisis ácida, se preparó una suspensión de 10 g de quitina en 120 ml de HCl concentrado, que se mantuvo en agitación constante usando un agitador magnético orbital (Denville Modelo 110) a 4 °C durante 12 h. Posteriormente, la quitina se recuperó por filtración al vacío a través de papel filtro Whatman No.

1 usando un embudo de porcelana y se realizó un segundo filtrado del extracto con un embudo Büchner. El segundo paso consistió en la extracción de la quitina coloidal por neutralización con etanol. Para ello, la masa resultante se suspendió en 2000 ml de etanol al 95% y se mantuvo en agitación constante a 4 °C durante 12 h. Después se centrifugó a 3000 rpm (Thermo Fisher) durante 20 min a 4 °C, se decantó. El sedimento resultante se lavó cuidadosamente con agua destilada estéril, se resuspendió en agua destilada estéril, nuevamente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C. El lavado de la pastilla se llevó a cabo hasta que el olor a alcohol desapareció. Una vez obtenida la quitina coloidal se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

### **3.2.1.3. Preparación del medio sólido suplementado con púrpura de bromocresol**

El medio de cultivo para la detección de actividad quitinasa de acuerdo al protocolo de Agrawal y Kotasthane (2012) consistió en 4.5 g de quitina coloidal, 0.3 g de sulfato de magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  Sigma®), 3 g de sulfato de amonio ( $(NH_4) SO_4$  Fisher®), 2 g fosfato de potasio monobásico ( $KH_2PO_4$  Fisher®), 1 g de ácido cítrico, 15 g de agar Difco®, 0.15 g de púrpura de bromocresol (Sigma®) y 0.2 ml de Tween-80 (Sigma®); se ajustó el pH a 4.7. El medio de cultivo se aforó a un litro con agua bidestilada y luego se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. Una vez frío el medio, se vertió en placas de Petri y se dejó solidificar. Se inoculó un disco micelial de cuatro días de crecimiento en el centro de cada caja y se incubó a 28 °C durante 2-3 días. Las cepas cuyos medios de cultivos viraron de color amarillo a violeta, se consideraron positivas para actividad quitinasa. Como control negativo se usó medio PDA. Cada cepa se evaluó por triplicado.

### **3.3. Inducción de quitinasas en medio líquido suplementado con quitina**

El inóculo de cada especie de *Trichoderma* T3, T5 Y T6, se cultivó en medio líquido mineral basal (MBS) estéril que consistió en: 10 g de  $KNO_3$  (Fisher®), 5 g de  $KH_2PO_4$ , 2.5 g de  $MgSO_4 H_2O$ , 2 mg de  $FeCl_3$  (Baker®), 150 ml de jugo V8 (Campbell's®) y 10 g de polivinilpirrolidona, se suplementó con 4.5 g de quitina coloidal y se aforó a 1000 ml de agua bidestilada según González et al (2010). En frascos de vidrio vertidos 50 mL de MBS se agregaron dos discos del micelio de cinco mm de diámetro, colectados del borde de una colonia de cuatro días de

crecimiento. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 180 rpm, a 30 °C por cinco días. Para la obtención de los extractos crudos, se filtraron a través de papel filtro Whatman No. 1 y se repitió el paso usando un embudo Büchner. El sobrenadante recuperado se consideró como extracto crudo, la mitad del mismo se liofilizó y el otro volumen se guardó -20 °C para su posterior uso. Cada cepa se trabajó por triplicado.

#### **3.4. Cuantificación de actividad quitinasa**

La actividad de quitinasa se midió con un espectrofotómetro Epoch Biotek®. Se utilizaron 35 µl de extracto crudo. Cada alícuota se llevó a un volumen de 175 µl con PMB (50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5 ajustado con NaOH, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>), se adicionaron 175 µl del sustrato Quitina Azure (SIGMA® #C-3020) (2 mg en 1 ml de DMSO), se incubaron a 30°C por 1 h. El sobrenadante se recuperó y posteriormente se midió la absorbancia a 575 nm. Se calculó una curva de calibración de 0.0-2 mg/ml. Como control experimental negativo se utilizaron 35 µl de extracto crudo del medio mineral con 315 µl de PMB. La actividad se expresó como actividad específica en U/mg proteína/h. Una unidad (U) de actividad corresponde a 0.01 absorbancia a 575 nm (Gómez et al., 2004).

#### **3.5. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE)**

Con el objetivo de identificar quitinasas por peso molecular se realizó un SDS- PAGE. Para ello se elaboraron geles de poliacrilamida con SDS al 10.5% (gel separador) y de 4.5% (gel concentrador). Se utilizó el buffer Tris-glicina a pH 8.3, con desnaturalizante. Alícuotas de 23 µl de cada uno de los extractos crudos de las tres cepas de *Trichoderma* spp. incubadas en medio MBS y medio MBS suplementado con quitina coloidal, se mezclaron con 7 µl de buffer de carga y se cargo una muestra por carril. Las proteínas se hicieron migrar a través de la matriz de poliacrilamida a un flujo eléctrico de 88 V en el gel concentrador por aproximadamente 1 h y a 100 V en el gel separador por aproximadamente 3.5 h. Como control negativo se utilizó el extracto crudos de la cepas cultivadas en MBS en las mismas condiciones que las muestras y para identificar las bandas se utilizó un marcador de peso molecular de proteína PageRuler® Prestained Protein Ladder (10–170 kDa).

### **3.6.1. Tinción con Coomassie coloidal**

Después de realizar la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se incubó el gel en una solución de fijación que contenía 10% (v/v) ácido acético, 40% (v/v) metanol aforado a 0.5 L con agua destilada. El periodo de incubación fue de 60 minutos en agitación orbital, una vez concluido, se retiró el gel de la solución de fijación y se lavó tres veces consecutivas durante diez minutos con agua destilada. La solución de Coomassie coloidal se realizó mezclando cuatro partes de la solución de tinción stock Oriole Fluorescent Gel Stain® (BIORAD® #161-0495) con una parte de metanol. Después, 50 ml de ésta solución se vertieron sobre el gel y se dejó tiñendo toda la noche en agitación orbital. Por último, para decolorar el gel, se lavó con agua destilada a temperatura ambiente y en agitación orbital (Denville Modelo 110) durante seis horas.

### **3.6.2. Tinción con nitrato de plata**

Para aumentar la sensibilidad en el gel y detectar el mayor número de bandas, después de correr el gel en condiciones nativas, se incubó en solución para permearlo (40 % etanol, 10 % ácido acético y 50 % de agua) durante 60 minutos. Se lavó el gel en agua destilada y se dejó sobre un agitador orbital por 30 minutos. Se realizaron cambios sucesivos cada 60 minutos durante las siguientes cuatro horas y se mantuvo en agitación hasta 12 h, esto permitió reducir la tinción de la corrida e incrementar la sensibilidad. Después se permeó con tiosulfato de sodio al 0.02 % durante un minuto. Se repitió el lavado tres veces con intervalos de 20 minutos. La tinción se realizó con una solución de nitrato de plata al 0.1 %, al cual se le agregó formaldehído al 35 % segundos previos a la incubación a 4 °C durante 20 minutos. El gel se lavó nuevamente con agua destilada en un recipiente limpio durante un minuto. Se continuó el proceso agregando una solución de carbonato de sodio al 3 % y formaldehído al 0.05%. La solución se cambió una vez que viró a color amarillo y el tiempo necesario para visualizar bandas en los carriles. Se repitió el lavado del gel en agua destilada durante 20 minutos. La tinción concluyó con la incubación en ácido acético al 5 % durante 5 minutos (Rabilloud et al., 1992).

### 3.7.1 Área de estudio en campo

El área de estudio se encuentra ubicada en la casa vitivinícola Chateau Camou, en el Valle de Guadalupe, Baja California. Las plantas de vid utilizadas corresponden a un viñedo en desarrollo del varietal Merlot clon 14 injertado sobre 1103P, de aproximadamente cinco años. El lote utilizado está compuesto de cuatro líneas, con 62, 62, 64 y 72 plantas, respectivamente, de las cuales se usaron 60 en el experimento.

### 3.7.2 Evaluación de las plantas del viñedo

Previo al experimento y para determinar la presencia de *Trichoderma* sp., *Phaeoconiella* sp. y *Phaeoacremonium* sp. en las parras, se cortaron trozos de madera de los cordones, de entre 5 y 15 cm de largo y se analizaron en el laboratorio. Para lo anterior, se cortaron secciones transversales de 5 cm de largo, se removió la corteza con una navaja estéril, se sumergieron en alcohol al 95 % y se flamearon para el secado y la esterilización del material vegetal. De estos trozos, se realizó un segundo corte para obtener cuatro secciones de menos de 0.5 cm que se sembraron en cajas de Petri que contenían medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) suplementado con cloranfenicol (15 mg/ml) para evitar el crecimiento bacteriano. Las cajas se mantuvieron a 28 °C y en oscuridad, hasta que se observó crecimiento micelial alrededor de la madera. Posteriormente, con la ayuda de un palillo de dientes estéril, se transfirió micelio del borde de crecimiento a una caja nueva. La identificación de los hongos se realizó por la observación de estructuras reproductivas utilizando microscopía estereoscópica y de campo claro. La determinación de las especies de *Trichoderma* se hizo utilizando las claves del sitio interactivo: <http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> (Samuels et al., 2012).

### 3.7.3. Producción de inóculo de *Trichoderma* spp.

Las cepas de *T. harzianum* SACH21-3, *T. gamsii* SACH26-1 y *T. gamsii* CCMTO1 utilizadas pertenecen al cepario de Fitopatología del CICESE, fueron aisladas de plantas de vid en el Valle de Guadalupe y caracterizadas en trabajos previos (Plata-Caudillo, 2010; Nieblas-Nuñez, 2012).

Para simplificar, en este trabajo nos referiremos a ellas como T3, T5 y T6, respectivamente. Para la reactivación de las cepas, se inocularon discos miceliales en cajas Petri con medio PDA y se incubaron durante siete días a 28 °C en oscuridad.

Con la intención de usar la misma concentración de esporas de las cepas en todos los experimentos, para las cepas se *Trichoderma* se utilizaron cajas de PDA en donde había crecido el hongo durante siete días. Para colectar las esporas, se vertieron 10 ml de agua destilada estéril sobre la caja y se raspó la colonia con una espátula estéril dentro de una campana de flujo laminar vertical. Los conidios se cuantificaron y ajustaron a una concentración a  $10^6$  conidios/ml utilizando una cámara de Neubauer®. Esta suspensión se utilizó para realizar aspersiones directamente a las heridas de poda de las plantas del viñedo seleccionado.

#### 3.7.4. Aplicación de tratamientos en viñedo comercial

El experimento inició el 8 de febrero de 2013 con la temporada de poda. Los tratamientos utilizando la suspensión de esporas, se aplicaron dos veces por la tarde, a los cuatro y seis días después de la poda.

Tabla 2. Tratamientos usados para evaluar el establecimiento de *Trichoderma* spp. en un viñedo comercial inoculados por aspersion a cuatro y seis días posteriores a la poda.

No.	Tratamiento
1	<i>T. harzianum</i> SACH21-3 (T3) + APP*
2	<i>T. gamsii</i> SACH26-1 (T5) + APP.
3	<i>T. gamsii</i> CCMTO1 (T6)+ APP.
4	T3, T5 y T6 + APP
5	Testigo agua

\*APP: adherente Polyether–Polymethylsiloxane

La unidad experimental constó de cinco plantas injertadas. Se uso un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Para eliminar el sesgo por efecto orilla, en cada unidad se analizaron las tres plantas centrales En cada muestreo se recolectó la primera o segunda yema a

partir del brazo o la base del cargador. Se realizaron tres muestreos, el primero a los cuarenta, el segundo a los noventa y el último a los ciento veinte días después de la inoculación (ddi). Para verificar la presencia de *Trichoderma* sp. se siguió el mismo procedimiento descrito en la sección 3.7.2 para la evaluación de plantas del viñedo.

### **3.8.1. Producción de inóculo de *Phaeoconiella* y *Phaeoacremonium***

Las cepas de *Pa. chlamydospora* y *Ph. aleophilum* que se utilizaron en este trabajo pertenecen al cepario de Fitopatología del CICESE. Fueron aisladas de plantas de vid en la Costa de Ensenada y caracterizadas por técnicas moleculares previamente (Morales-Pedraza 2010). Para su reactivación se inoculó un disco micelial en una caja Petri con PDA y se incubó a 28 °C en oscuridad, durante siete días para *Phaeoacremonium* y aproximadamente por 28 días para *Phaeoconiella*. Para la inoculación en invernadero se utilizó una suspensión  $10^4$  esporas/ml, en partes iguales de esporas de los dos patógenos ajustada con la ayuda de una cámara de Neubauer®.

### **3.8.2. Tratamientos en condiciones de invernadero**

Se utilizaron plantas del cultivar Merlot en pie franco de aproximadamente 18 meses, establecido en macetas de 4 L, con una mezcla de arena esterilizada-turba en proporción 2:3 (V:V). La inoculación las cepas de *Trichoderma* se hizo en el tercer entrenudo a partir de la base y la de los patógenos en el segundo entrenudo activo a partir del ápice, como se indica en la Figura 1 paneles a y b, respectivamente. La inoculación se realizó utilizando jeringas de un mililitro para infiltrar la suspensión de esporas en la madera de cada varetta. La inoculación todas las cepas se realizaron el mismo día. Los tratamientos se describen en la Tabla 3.

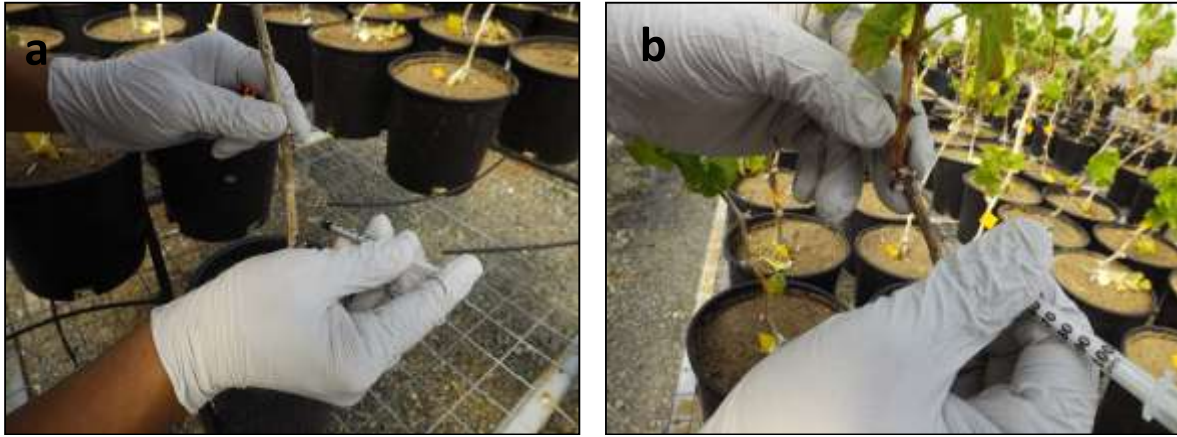


Tabla 3. Tratamientos usados para evaluar el efecto del hongo de control biológico *Trichoderma* spp. sobre los patógenos *Pm. chlamydospora* y *Ph. aleophilum* inoculados en el tallo de vid cv. Merlot en condiciones de invernadero.

No.	Tratamiento
1	<i>Trichoderma harzianum</i> SACH21-3 (T3)
2	<i>Trichoderma gamsii</i> SACH26-1 (T5)
3	<i>Trichoderma gamsii</i> CCMTO1 (T6)
4	<i>Pm. chlamydospora</i> y <i>Ph. aleophilum</i>
5	T3 + <i>Pm. chlamydospora</i> y <i>Ph. aleophilum</i>
6	T5 + <i>Pm. chlamydospora</i> y <i>Ph. aleophilum</i>
7	T6 + <i>Pm. chlamydospora</i> y <i>Ph. aleophilum</i>
8	Testigo agua esterilizada

Las macetas se fertilizaron una vez por semana y se regaron manualmente con una manguera. El diseño experimental fue en bloques al azar con cuatro repeticiones. La unidad experimental se consideró una planta por maceta.

La inoculación en invernadero se hizo con una mezcla en suspensión de  $10^4$  conidio/ml, con los dos fitopatógenos *Pm. chlamydospora* y *Ph. aleophilum*. La suspensión de las cepas de *Trichoderma* fue de  $10^5$  conidios/ml. Los tratamientos se aplicaron en el tallo, las cepas de control biológico en el tercer entrenudo a partir de la base (Figura 1a) y las cepas de los patógenos en el segundo entrenudo activo a partir del ápice apical (Figura 1b). Para infiltrar las esporas en la madera, se usaron jeringas de 1 ml. La inoculación de las cepas se realizó el mismo día en cada vareta de todos los tratamientos.



**Figura 1. Infiltración de una suspensión conidios ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^5$ /ml de *Trichoderma* spp. y de *Pm. Chlamydospora* combinada con *Ph. aleophilum* (*Pm-Ph*) en madera de vid cv. Merlot en pie franco. Con la ayuda de una jeringa se inocularon 20  $\mu$ l de *Trichoderma* en el segundo entrenudo (a) y de *Pm-Ph* en el último entrenudo activo (b).**

### **3.8.3. Evaluación del experimento en condiciones de invernadero**

El establecimiento del experimento se hizo en 21 de marzo y las evaluaciones se hicieron cuatro meses después (23 de agosto de 2013), la colecta fue destructiva. Para la recuperación del inóculo, los trozos de madera se procesaron siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección 3.7.2. Las variables de estudio para cada tratamiento fueron: biomasa de raíces y parte aérea de la planta, ambos estimados calculado el peso fresco expresado en gramos. Para evaluar lesión producida por el patógeno, se midió en el tamaño en centímetros a partir del punto de inoculación en sentido acropétalo y basipétalo.

### **3.9. Análisis estadísticos**

Para determinar las diferencias estadísticas entre experimentos: la sensibilidad al fungicida y el peso de la biomasa; se usó el análisis de varianza de una vía y la comparación *a posteriori* de medias de Tukey, en todos los casos  $\alpha = 0.05$ . Todos los análisis se realizaron con el programa Statistica® versión 7.0.

## 4. Resultados

---

### 4.1. Evaluación in vitro de la inhibición del fungida Azoxistrobin hacia *Trichoderma* spp.

En el experimento con cuatro dosis del fungicida azoxistrobin: 0.03, 0.05, 0.3 y 1.5 g/L, se encontraron diferencias estadísticamente significativas del crecimiento micelial entre las tres cepas de *Trichoderma* solamente a los dos días. En este momento, se observó mayor crecimiento del aislamiento *T. harzianum* (T3) en todas las concentraciones evaluadas. Se observó mayor inhibición en las cepas de *T. gamsii* (T5 y T6) que en la cepa de *T. harzianum*, en las concentraciones de 0.03 g/L (F=268.186, P<0.05, Gl= 5), de 0.05 g/L (F=252.693, P<0.05, Gl= 5), 0.3 g/L (F=183.672, P<0.05, Gl= 5) y 1.5 g/L (F=202.769, P<0.05, Gl= 5) (Figura 2).

El efecto de inhibición del fungicida permaneció visible a los tres días de observación, mientras que los controles ya habían llenado las cajas. Al cuarto día, todas las cepas en todas las concentraciones llenaron las cajas. En la Figura 3, se muestra un ejemplo. Así, el efecto del fungicida no fue dependiente de la dosis.

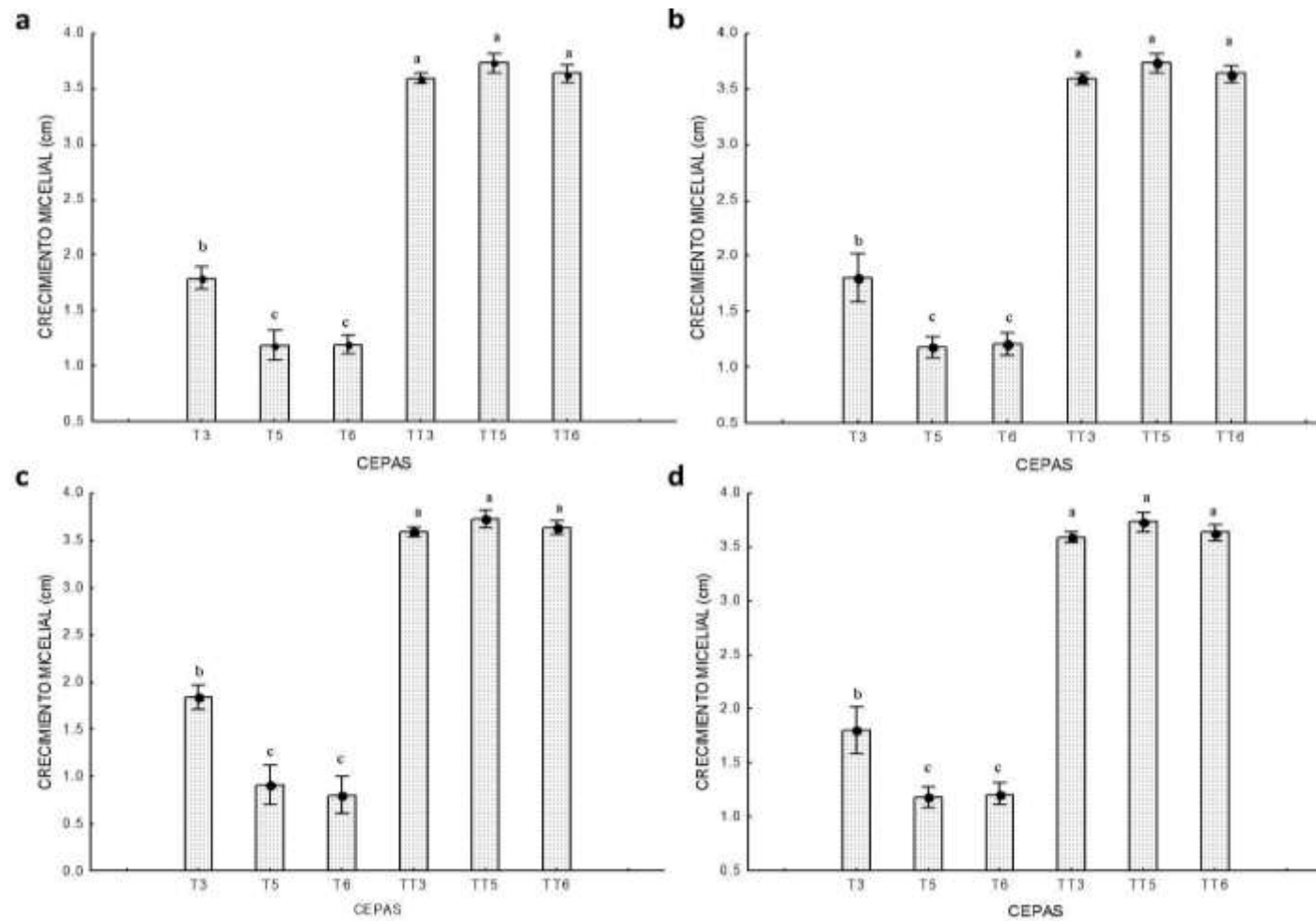
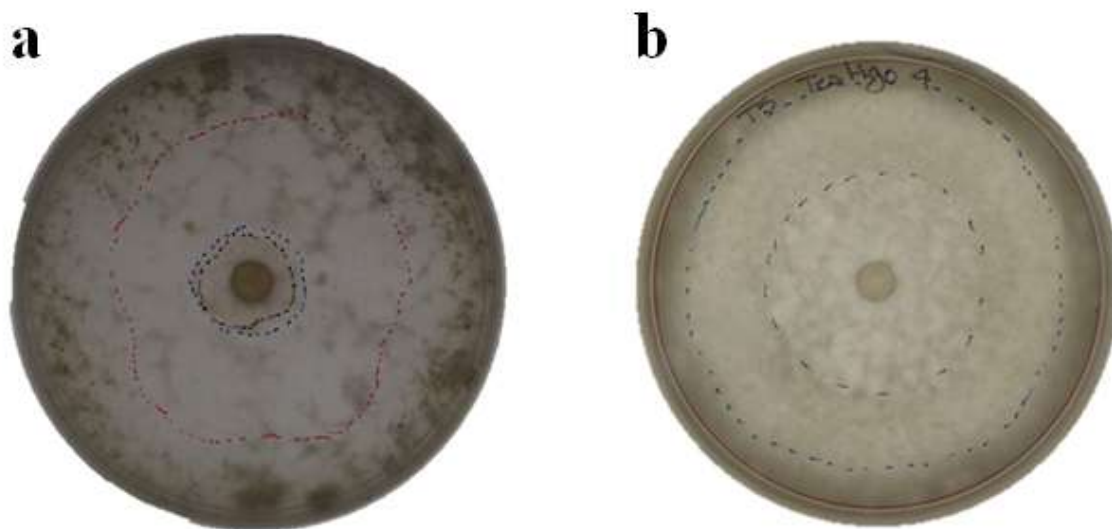


Figura 2. Inhibición del crecimiento de *Trichoderma* spp. en diferentes concentraciones del fungicida azoxistrobin después de 2 días de crecimiento: a) 0.03 g/L, b) 0.05 g/L, c) 0.3 g/L y d) 1.5 g/L. TT3, TT5 y TT6 son los tratamientos testigo sin fungicida. Las barras indican la desviación estándar. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes  $P > 0.05$ , según la prueba de Tukey.

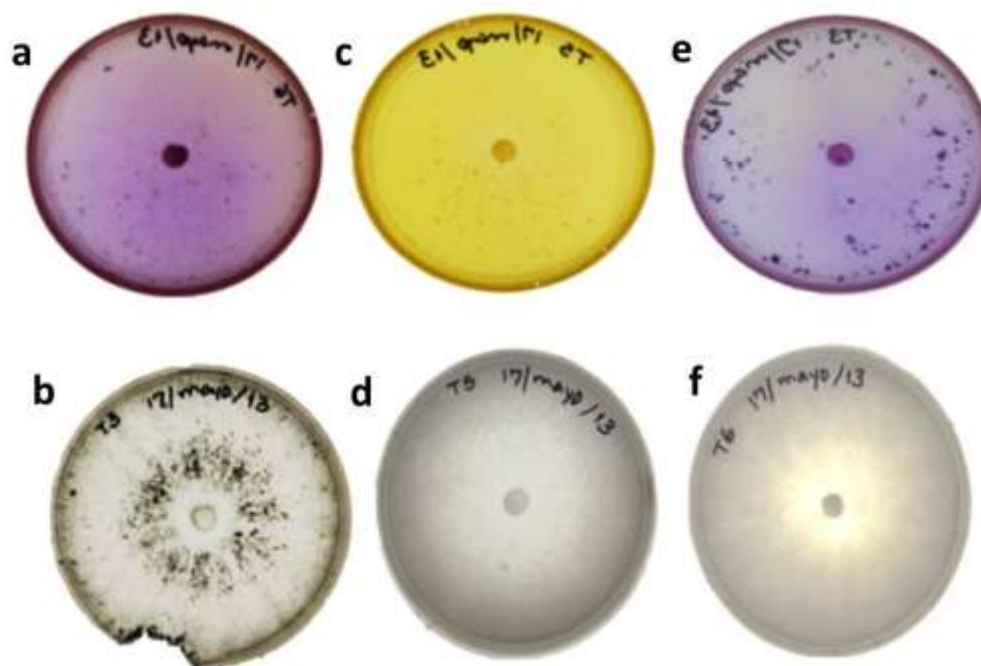


**Figura 3.** a) Inhibición del crecimiento de *T. gamsii* T5 en dosis de 0.3 g/L del fungicida azoxistrobin. b) crecimiento micelial en medio PDA sin fungicida. La fotografía de ambas cajas se tomó después de cuatro días de crecimiento. En líneas punteadas se marcó el crecimiento cada 24 h.

## 4.2. Actividad enzimática quitinasa

### 4.2.1. Evaluación cualitativa de quitinasa en medio sólido

Después de 48 h de incubación se observó el vire del medio de cultivo de amarillo a violeta en los aislamientos *T. harzianum* (SACH21-3) y *T. gamsii* (SACH26-1) (Figuras; 4a y 4e). En el aislamiento *T. gamsii* (CCMT01) (Figura 4c) no se observó cambio de color en el medio de cultivo, indicando actividad quitinasa nula. No se observó cambio de color en los testigos que contenían solamente PDA (Figura 4b, 4d y 4f).

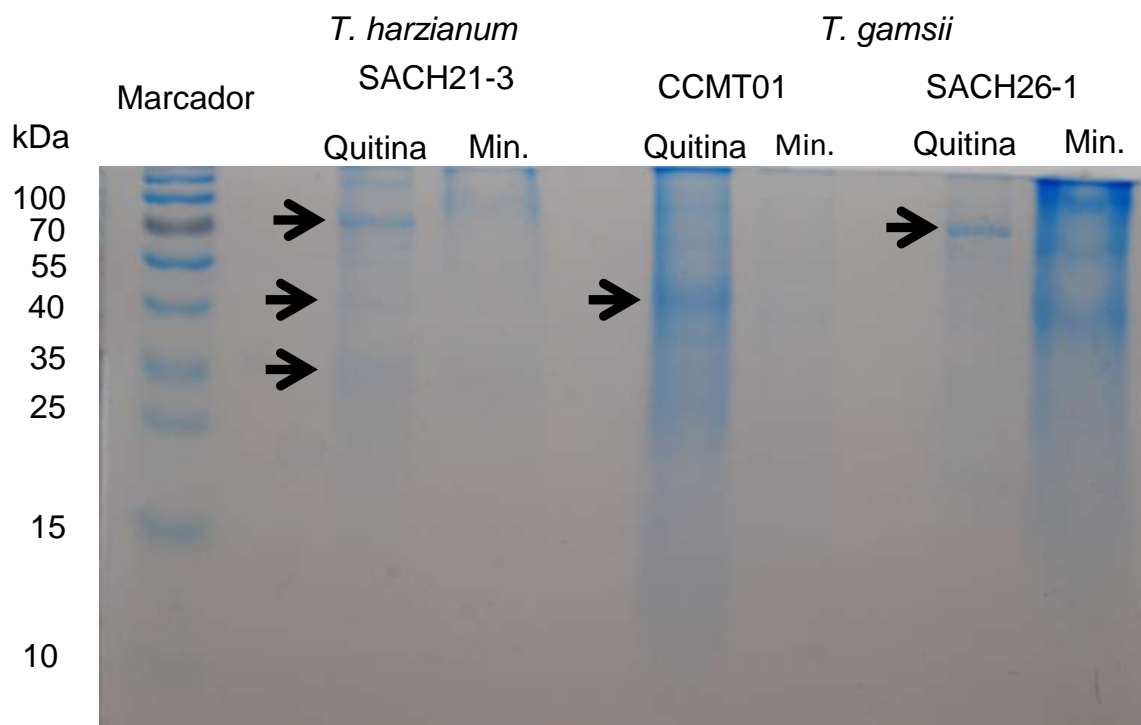


**Figura 4.** Cuantificación de quitinasa en PDA suplementado con 4.5 g de quitina coloidal y 0.2 % de púrpura de bromocresol. En columnas *T. harzianum* SACH21-3 (a) y (b), *T. gamsii* CCMT01(c) y (d), *T. gamsii* SACH26-1 (e) y (f). La línea (b), (d) y (f) corresponde a los mismos hongos crecidos en PDA utilizados como testigos.

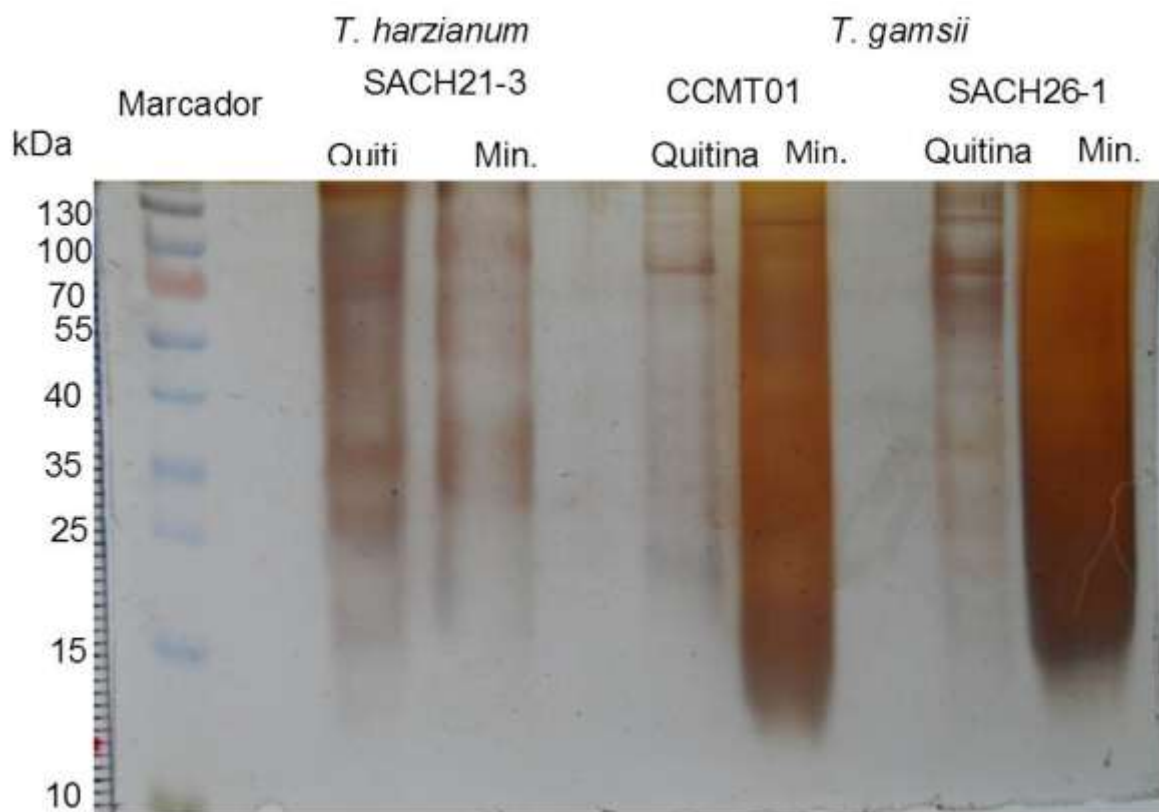
#### 4.2.2. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

En condiciones desnaturizantes con tinción de coomasie coloidal y con extractos crudos de las tres cepas de *Trichoderma* sp., se detectaron varias bandas, algunas de las cuales podrían corresponder a quitinasas. Los tamaños de las bandas oscilaron entre 70 a 35 kDa y no se observaron en el sobrenadante del hongo crecido en medio mineral sin quitina coloidal. En la cepa *T. harzianum* SACH21-3 las bandas que se observaron fueron de alrededor de 35, 40 y 75 kDa. Los aislamientos de *T. gamsii* sólo mostraron una banda y de diferente tamaño entre sí, en la cepa CCMT01 de ~ 40 kDa y en la SACH26-1 de ~ 70 kDa (Figura 5).

Las bandas observadas en *T. gamsii* SACH26-1, cultivado en medio mineral (Testigo) observadas con la tinción de coomassie, no se observaron con la tinción de plata (Figura 6). En general se observó la presencia de una mayor cantidad de bandas en los extractos del hongo cultivado en presencia de quitina.



**Figura 5.** Gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturizantes de extractos crudos de cepas de *Trichoderma* spp. cultivadas en presencia de quitina coloidal al 4.5 % como inductor (quitina) o en medio mineral sin quitina (Min). Tinción con coomasie coloidal

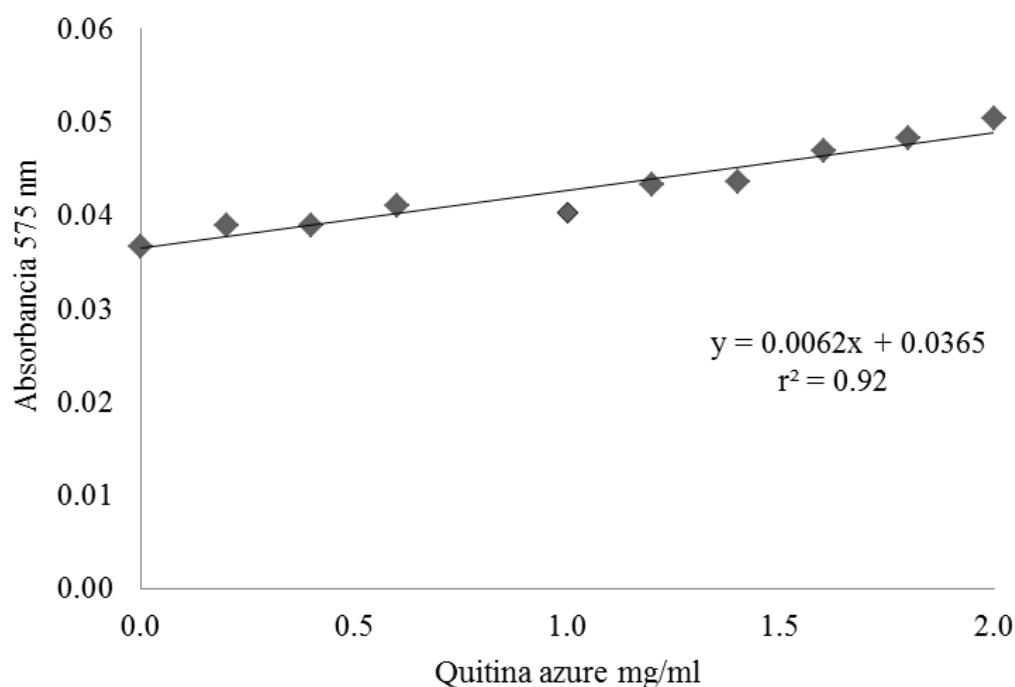


**Figura 6.** Gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes de extractos crudos de cepas de *Trichoderma* spp. cultivadas en presencia de quitina coloidal al 4.5 % como inductor (quitina) o en medio mineral sin quitina (Min). Tinción con nitrato de plata.



### 4.2.3. Evaluación cuantitativa de quitinasas utilizando microplacas

De acuerdo con la curva de calibración utilizada (Figura 7), la producción de quitinasas fue estadísticamente significativa en medio líquido suplementado con quitina coloidal al 4.5 % (Tabla 4) comparado con el medio mineral ( $F=58.91$   $P < 0.05$ ). Entre las cepas este incremento fue estadísticamente significativo, en *T. harzianum* T3 y en *T. gamsii* T5 se observó un incremento en presencia de quitina coloidal en el medio, por lo contrario, la cepa *T. gamsii* T6, mostró un valor más alto en medio mineral (Tabla 4).



**Figura 7.** Curva de calibración utilizando diluciones seriadas de quitina azure de 0 a 2 mg/ml.

Tabla 4. Producción de quitinasas en medio mineral suplementado con quitina coloidal y medio mineral en extractos crudos de cepas de *Trichoderma* spp. posterior a cinco días de incubación.

Cepa (Extracto crudo liofilizado)	Quitina coloidal U/mg/h *	Medio mineral U/mg/h
<i>T. harzianum</i> SACH21-3 T3	9.06 (a)	6.37 (b)
<i>T. gamsii</i> SACH26-1 T5	5.08 (a)	4.65 (b)
<i>T. gamsii</i> CCMTO1 T6	5.78 (b)	6.96 (a)

\*Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey,  $P > 0.05$ .

#### 4.4. Experimento de campo

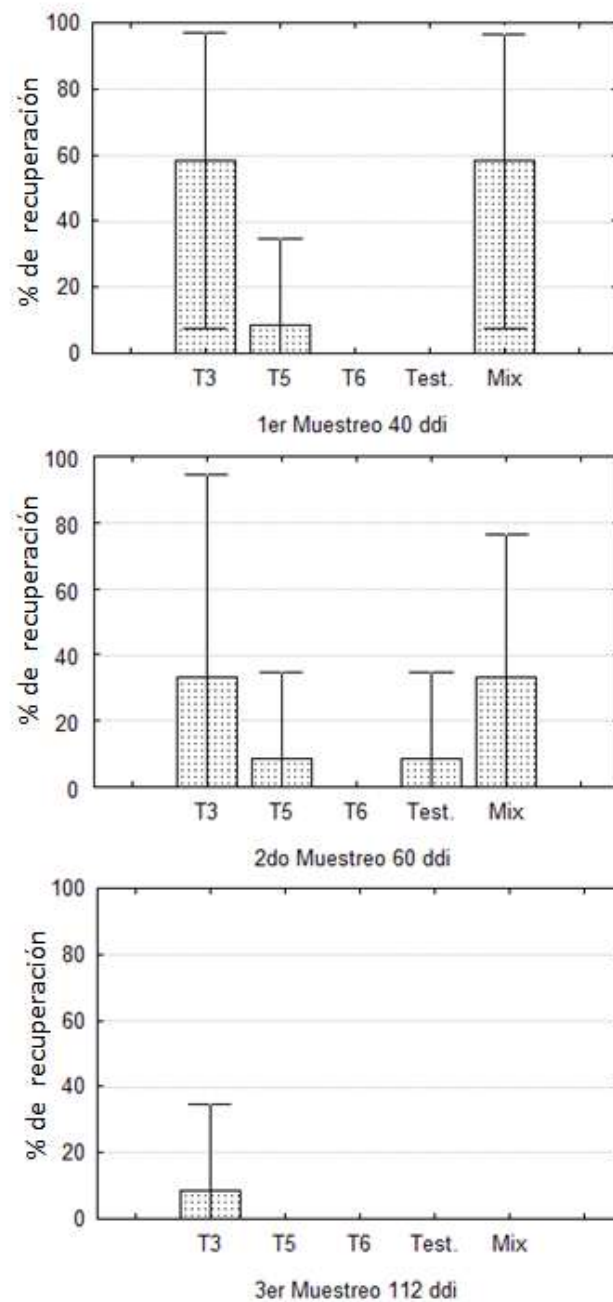
##### 4.4.1. Prevalencia de *Trichoderma* spp. como endófito de vid en condiciones de campo

Las plantas se muestrearon después de 40 días de haber sido inoculadas (ddi). Se recuperó el inóculo de la cepa *T. harzianum* T3 en el 58 % de las plantas y la cepa *T. gamsii* T5 sólo en 8.3 % de plantas (Figura 8).

Para los 60 ddi, los porcentajes de recuperación disminuyeron a 33.3 % y 8.3 % para T3 y T5, respectivamente. En uno de los testigos se aisló, de una planta una cepa con características morfológicas similares a *T. harzianum* T3, por lo que se sospecha de una inoculación cruzada, aunque no se descarta la posibilidad de que estuviera presente en la planta antes de la inoculación.

En el último muestreo a 112 ddi sólo se recuperó *T. harzianum* T3 en 8.3 % de las plantas. La cepa T6 no se recuperó en ninguno de los muestreos.

En la triple inoculación se obtuvieron resultados similares que con la cepa T3. Debido a que esta cepa presenta diferentes características morfológicas que las de la especie *T. gamsii* y a que las cepas recuperadas de este tratamiento fueron morfológicamente pertenecientes a *T. harzianum*, se sospecha que sólo la cepa T3 pudo establecerse.



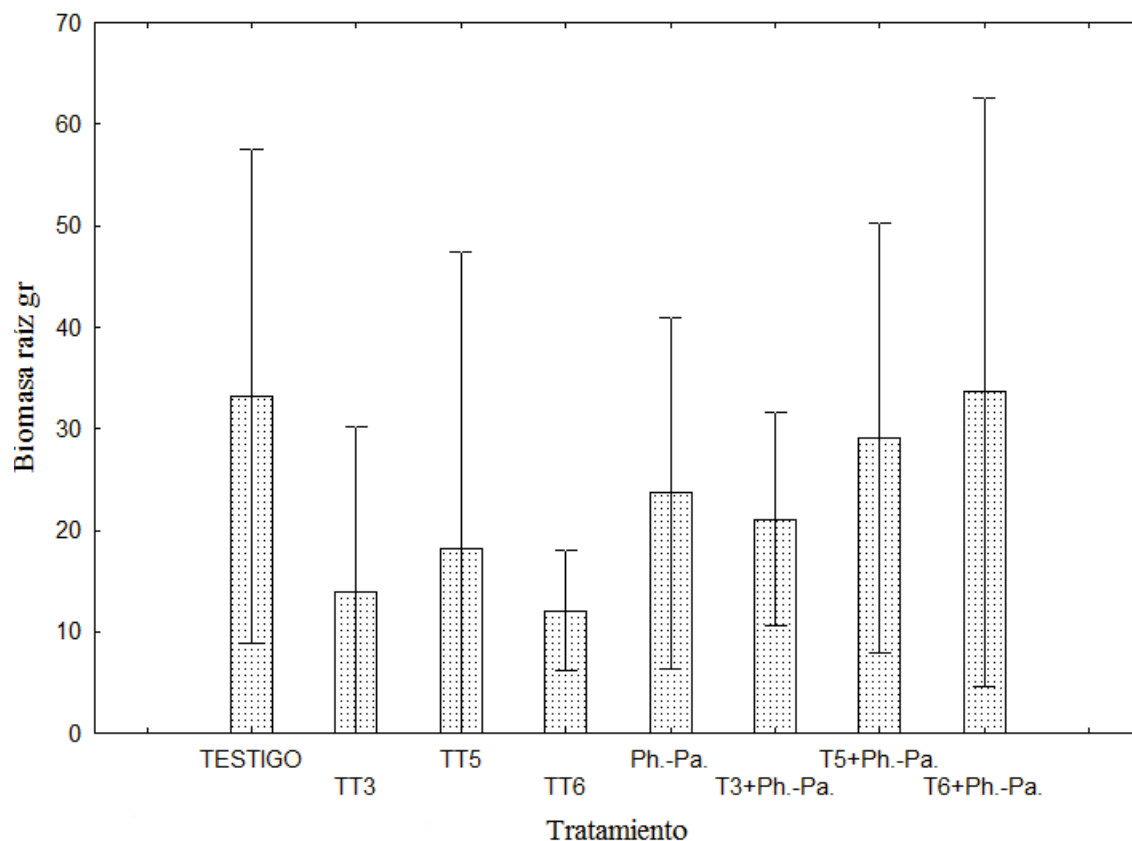
**Figura 8.** Aislamientos de *Trichoderma* spp. recuperados de vides cv. Merlot plantadas en campo, en tres fechas de muestreo 40, 60 y 112 días después de la inoculación (ddi). Tratamientos: cepas T3, T5, T6; Testigo: agua corriente y Mix: mezcla de las tres cepas. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de 12 muestras por tratamiento.

### 4.3. Coinoculaciones de *Trichoderma* spp. y *Pm. chlamydospora-Ph. aleophilum* en invernadero

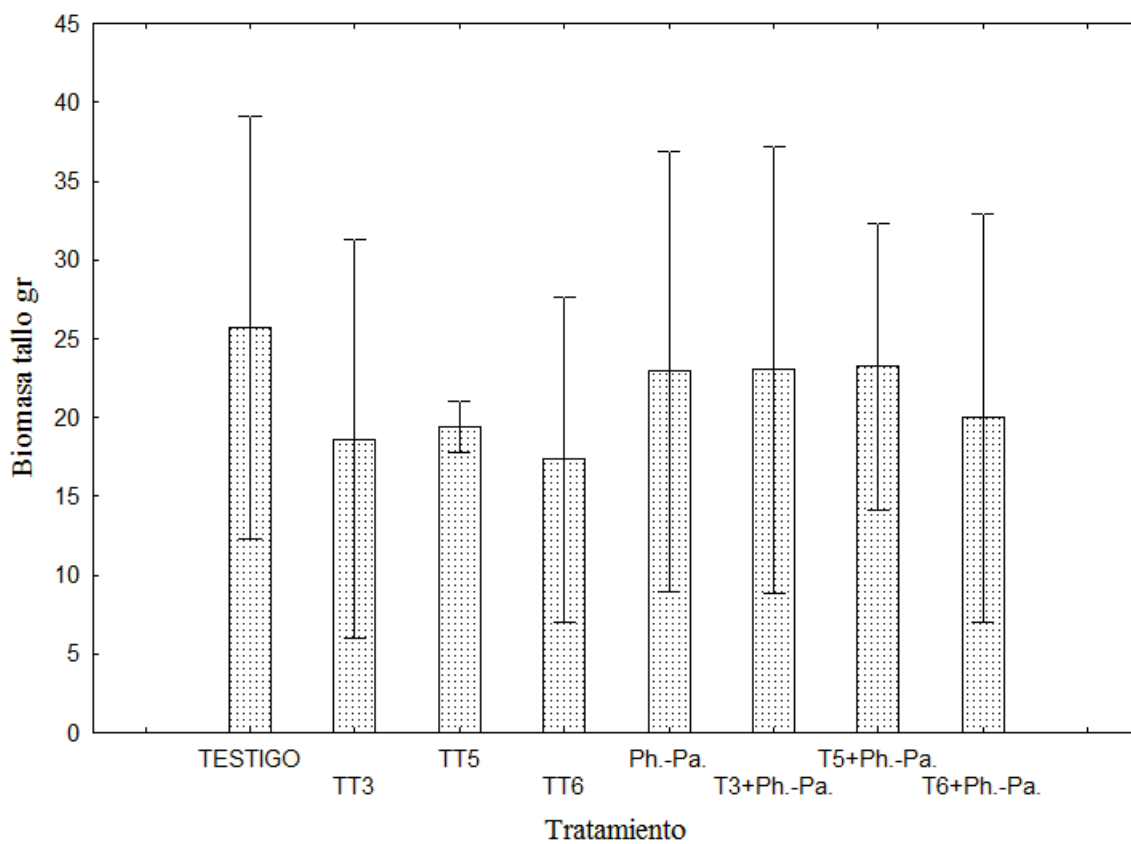
#### 4.3.1. Biomasa de raíz y tallo

El peso promedio de raíz de las plantas de vid cv. Merlot en el macetas coinoculadas osciló entre 12.06 y 33.65 g pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $F=103.29$ ,  $P<0.05$ ,  $Gl=7$ ) entre los tratamientos. El tratamiento con menor biomasa fue el inoculado con *T. gamsii* T6 (Figura 9)

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la biomasa de tallo ( $F=0.55$ ,  $P<0.05$ ,  $Gl=7$ ). Sin embargo, los tratamientos coinoculados con *Trichoderma* y *Pm.-Ph.* mostraron biomasa ligeramente superiores, excepto en el tratamiento *T. gamsii* T6 + (*Pm.* y *Ph.*) que presentaron promedios similares a las de inoculaciones simples (Figura 10).



**Figura 9.** Biomasa del sistema radical de plantas de vid cv. Merlot en maceta inoculados con *Trichoderma* y *Ph. chlamydospora-Pa. aleophilum*. TT3, TT5 y TT6: tratamientos de *T. harzianum* SACH21-3, *T. gamsii* CCMT01 y *T. gamsii* SACH26-1 respectivamente. *Pm.-Ph.*: doble inoculación con *Pm. aleophilum* y *Ph. chlamydospora*. T3+*Pm.-Ph.*, T5+ *Pm.-Ph.* y T6+ *Pm.-Ph.*, combinaciones de los patógenos con las *Trichoderma* spp. El testigo fue inoculado con agua. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro repeticiones por tratamiento.



**Figura 10. Biomasa del tallo de plantas de vid cv. Merlot en experimentos en maceta. Las plantas fueron inoculados con *Trichoderma* spp. (T3, T5 y T6) y *Pm. chlamydospora-Ph. aleophilum*. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro repeticiones por tratamiento.**

### 4.3.2. Longitud de la lesión en madera de vid

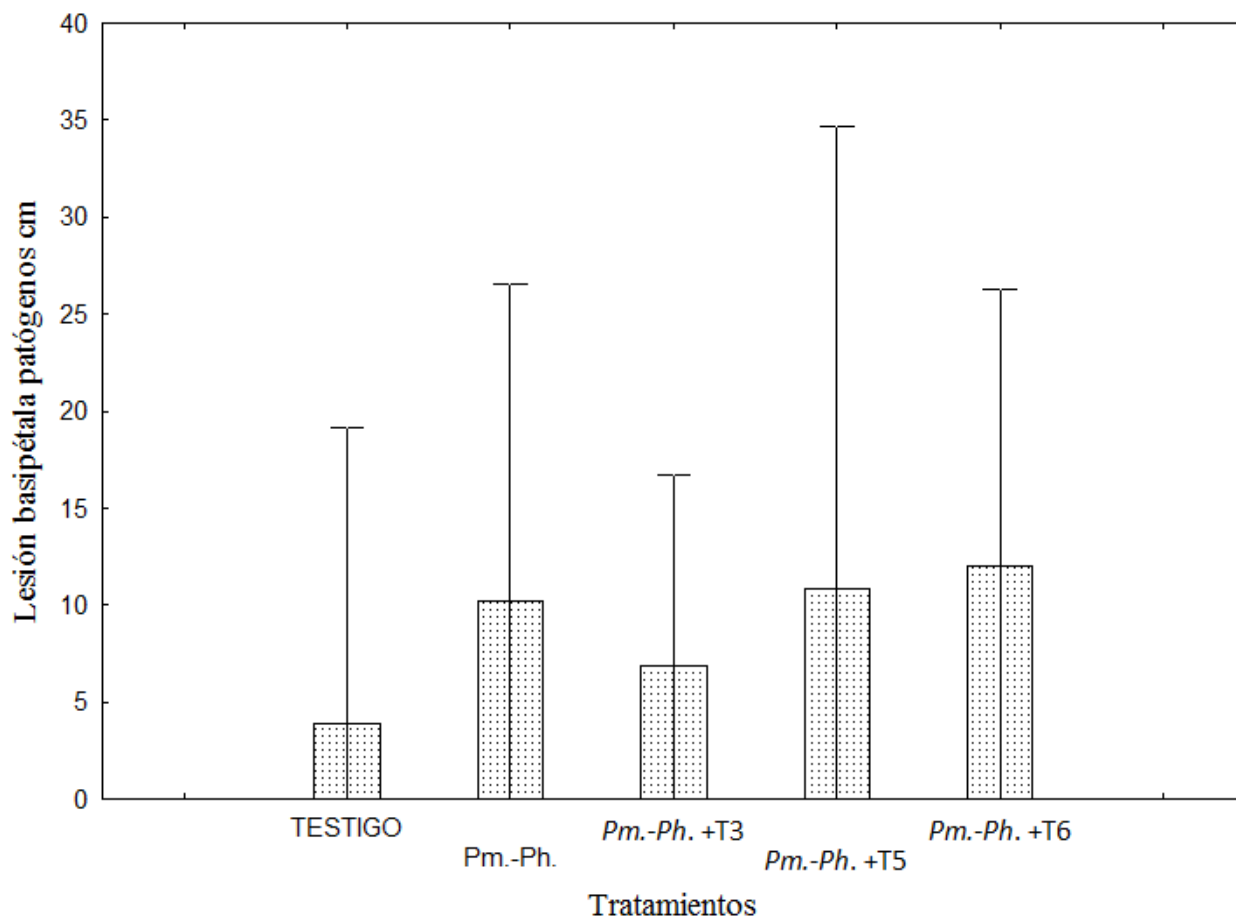
El análisis de varianza no mostró diferencias estadísticamente significativas en la extensión de la lesión total en el punto de inoculación de los hongos ( $F=0.64$ ,  $P>0.64$ ,  $Gl=4$ ), entre las inoculaciones simples. El tratamiento *T. gamsii* TT5 mostró la menor lesión 4.66 cm y el de mayor lesión se observó en el tratamiento *Pm.-Ph.* 11.7 cm. En las inoculaciones dobles, en el tratamiento *T. gamsii* T5 no se observó lesión en el punto de inoculación de la *Trichoderma*, pero cuando se evaluó en el punto de inoculación de los fitopatógenos el tratamiento *Pm.-Ph.+T5* fue el que mostró mayor lesión 13.35 cm.

En cuanto a las interacciones entre los hongos de control biológico y los patógenos, la menor longitud de lesión se observó en el tratamiento T5+ *Pm.-Ph.* con una media de 8.32 cm y la mayor longitud en el tratamiento T5+ *Ph.-Pa.* con una media de 17.8 cm. Los hongos que se reaislaron del experimento fueron: *T. harzianum* y *Pm. chlamydospora*. Se observaron como hongos contaminantes: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp.

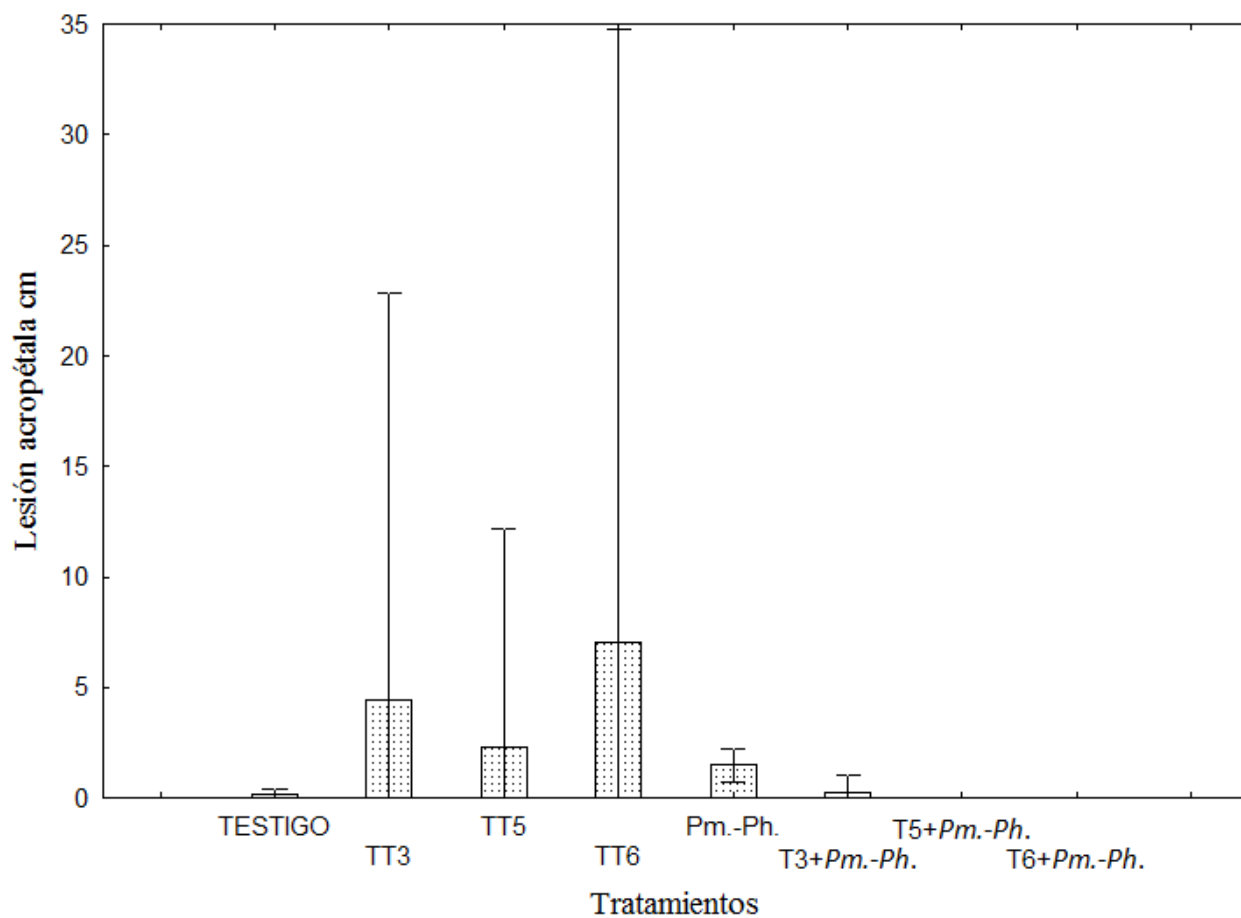
El análisis de varianza no mostró diferencias estadísticamente significativas en la extensión de la lesión en sentido basipétalo en el tratamiento *Pm.-Ph.* cuando este se inoculó en el mismo tallo que las *Trichoderma* spp. ( $F=0.171$ ,  $P>0.91$ ,  $Gl=3$ ). Los tamaños de la lesión disminuyeron en el siguiente orden: T6, 12.02 cm; T5, 10.87 cm; Testigo *Pm-Ph.*, 10.22 cm y T3, 6.92 cm. Es importante señalar en el punto de inoculación del patógeno (Figura 1), este tratamiento no hubo espacio para avanzar en sentido acropétalo, por lo que no se analizó.

El análisis de varianza no mostró diferencias estadísticamente significativas en la extensión de la lesión en dirección acropétala de los tratamientos con *Trichoderma* spp. tanto en las inoculaciones sencillas como en las dobles ( $F=1.07$ ,  $P>0.41$ ,  $Gl=7$ ), las lesiones con mayor longitud se observaron en los testigos siendo T6 7.0 cm el de la media más alta y en las inoculaciones dobles el tratamiento T3 0.25 cm.





**Figura 11.** Longitud de la lesión basipétala en madera de vid cv. Merlot, por inoculaciones de esporas de *Pm. chlamydospora* y *Ph. aleophilum* (*Pm.-Ph.*), después de cuatro meses. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro repeticiones por tratamiento.



**Figura 12.** Longitud de la lesión acropétala en la madera de vid cv. Merlot, en inoculaciones de esporas de *T. harzianum* T3, *T. gamsii* T5 y T6 después de cuatro meses. Testigos: agua esterilizada (TESTIGO) y cepas de *Trichoderma* (TT). Las barras representan la media  $\pm$  1 desviación estándar de cuatro muestras.

## 5. Discusión

---

El uso de *Trichoderma* spp. en el control de las enfermedades reduce la aplicación de fungicidas de síntesis química sobre los cultivos (Singh y Singh, 2012), la parte crítica de este manejo es verificar que en la aplicaciones se utilicen las dosis que recomienda el fabricante. Para el manejo de yesca no se cuenta con fungicidas registrados en vid. Los productos que se comercializan, en el mejor de los casos son utilizados para otra enfermedad que presenta la parra (Bester et al., 2007), o se realizan los experimentos en búsqueda de alternativas químicas que se utilizaban en décadas pasadas y que se retiraron por su alto nivel de toxicidad al humano y al ambiente (Groenewald et al., 2000; Díaz y Latorre, 2013). En este trabajo se evaluó la tolerancia de cepas de *Trichoderma* al fungicida azoxistrobin en dosis de 300 (0.03 g/L) a 500 g (0.05 g/L) de producto comercial por hectárea que representan las sugeridas por el fabricante para controlar hongos del follaje en vid (Nandeeshia et al., 2013). Azoxistrobin es un fungicida de amplio espectro usado para el control de mildiu y cenicilla en vid con actividad preventiva y antiesporulante. Aun cuando se observó inhibición del crecimiento, este no fue permanente, por lo que sería posible su utilización combinada en estrategias de manejo integrado de enfermedades (Kredics et al., 2003).

Los componente extracelulares en las cepas *Trichoderma* lo constituyen endoquitinasas y exoquitinasas (Kovacs et al., 2004) y se expresan en mayor proporción cuando las fuentes de carbono incluyen quitina o residuos de pared celular en el hongo *Rhizopus nigricans* (Žnidaršič et al., 1995). En este trabajo se identificó por evaluación cualitativa en medio sólido la presencia de quitinasas en dos cepas nativas T3 y T6. En la cepa T5 no se detectaron, probablemente debido a que los niveles secretados son bajos (Agrawal y Kotasthane, 2012). Por otro lado, utilizando un gel de poliacrilamida, se observó que el patrón de bandeo en las tres cepas fue mayor en los extractos suplementados con quitina coloidal. La actividad enzimática fue similar a la reportada en los trabajos de los grupos de Lopes (2008) y Sreedevi (2012), donde suplementando el medio de cultivo con fuentes de carbono y nitrógeno la expresión de la quitinasa se optimiza. Por otro lado, los pesos aproximados de las bandas observadas corresponden a la masa de quitinasas reportada en otros trabajos (Vinusha et al., 2013).

En la actualidad es relativamente sencillo encontrar marcas comerciales cuyo ingrediente activo sea alguna especie de *Trichoderma* o mezclas de ellas. No obstante, se debe tener precaución con el uso del producto, ya sea por el método de aplicación, las dosis, el lavado del producto por lluvias o la deshidratación. Las experiencias exitosas por fechas de aplicación y finalmente la habilidad de la cepa fúngica para colonizar la madera después de la poda (John et al., 2010); además un factor preponderante es el ambiente, que determina la adaptación del hongo de control biológico y la sustitución por especies nativas (Guédez et al., 2012). En condiciones de campo se evaluó la prevalencia de tres *Trichoderma* spp. nativas en vid cv. Merlot. En todas las cepas, disminuyó el inóculo recuperado con el paso del tiempo. Siendo *T. harzianum* la que mostró la mejor supervivencia. Estos resultados coinciden con lo reportado por Di Marco et al. (2004) que observaron que la cantidad de inóculo persistente y viable decrecía desde 85 hasta 60 % después de 60 días de la aplicación de *T. harzianum*.

El tiempo oportuno de la aplicación después de la poda es un factor determinante en la protección y para facilitar el establecimiento del inóculo de *Trichoderma* en campo (Bailey et al., 2008), sobre todo considerando que la herida es la ruta de entrada más común para la mayoría de los microorganismos. Algunas condiciones climatológicas como la lluvia favorecen la dispersión de conidios de *Trichoderma* spp. Esta idea se basa en observaciones realizadas en hojas de vid en donde pueden encontrarse conidios junto con agregados de suelo tanto en el envés como en el haz de la hoja (Longa et al., 2009). En este trabajo se realizaron las aspersiones a los cuatro días de la poda como sugieren Harvey y Hunt (2006) y aunque la incidencia de las cepas de *Trichoderma* usadas en este trabajo fue baja, comparándolo con el 75 % reportado en los primeros 40 días después de la inoculación en cv. Chardonnay, no obstante se cubre el periodo crítico para las infecciones de hongos fitopatógenos como *Eutypa lata*, que puede infectar las superficies de los cortes después de cuatro semanas de la poda (Di Marco, et al. 2004).

McLean et al. (2009), utilizaron la cepa transformante de *T. harzianum* T77 que emite fluorescencia verde GFP (Green fluorescent protein GFP, por sus siglas en inglés) y rojo (Red fluorescent protein DsRed-Express, por sus siglas en inglés) en los cv. Chenin Blanc y Merlot. En el ensayo de colonización, los porcentajes de recuperación fueron de 61.8 % en TGFP y 50.7

% en TDRE, en apenas 3 cm de distancia del punto de inoculación. En este trabajo se encontró a las *T. harzianum* a 0.5 cm de distancia. Tomando en cuenta que este grupo inoculó con discos miceliares por lo que pudo haber mejor colonización, es necesario continuar los estudios con la cepa aplicando pre-tratamientos que lo favorezcan como el principal endófito como se ha sugerido para otras cepas (Lu et al., 2004). Otros aspectos a considerar son la concentración del inóculo, el vehículo de la suspensión y la fuente de carbono que facilite la germinación de las esporas en condiciones de su hospedero (Schubert et al., 2008).

En condiciones de invernadero no se observó efecto con la doble inoculación de las cepas nativas de *T. harzianum* SACH21-3 y *T. gamsii* CCMT01 y SACH26-1 junto con los patógenos de *Pm. chlamydospora-Ph. aleophilum*. Por otro lado, la biomasa del tallo no presentó diferencias estadísticamente significativas pero se pudo observar una ganancia de biomasa mayor en las coinoculaciones de *Trichoderma* y *Pm. chlamydospora+Ph. aleophilum*. Valores similares se obtuvieron en tratamientos con *Glomus intraradices*, *T. gamsii* SACH26-1 y *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma (Nieblas-Nuñez, 2012). Sin duda, es importante la respuesta del hospedero a la inoculación y la habilidad diferencial en la colonización de las *Trichoderma* sp. en los cultivares de vid, como ya se ha reportado en otros cultivos (Harman, 2006).

La biomasa de raíz fue superior en todos los tratamientos coinoculados excepto al testigo absoluto y la inoculación de *Pm. chlamydospora* y *Ph. aleophilum*. El mejor promedio se encontró en los tratamientos de *T. gamsii* SACH26-1+ *Pm. chlamydospora-Ph. aleophilum*. Este mismo efecto positivo fue reportado por Nieblas-Nuñez (2012) en tratamientos con *Glomus intraradices*, *T. gamsii* SACH26-1 y *Lasiodiplodia theobromae* UCD256Ma, donde se observó la mayor ganancia de peso en el tratamiento *T. gamsii* SACH26-1+*L. theobromae* UCD256Ma. Esto sugiere que la cepa *T. gamsii* SACH26-1 influye en el vigor en la parra que se inoculó. Otras cepas de la especie como *T. atroviride* SC1 tienen la habilidad de colonizar y crecer asociadas al sistema radicular, en tanto que otros aislamientos tienen la capacidad de permanecer en latencia hasta dos años después de haber sido inoculados en suelos, manteniendo una densidad de  $10^3$  unidades formadoras de colonias  $g^{-1}$  de suelo (Ahmad y Baker, 1988; McLean et al., 2005; Longa et al., 2009).

En condiciones de invernadero, la reducción de la lesión necrótica por *Trichoderma* spp. en el punto de inoculación de los patógenos no tuvo diferencias estadísticamente significativas. El mejor tratamiento fue *T. harzianum* T3+*Pm.*-*Ph.*, con la menor longitud en la lesión a partir del punto de inoculación. Esto difiere con Di Marco et al. (2004), quienes utilizaron el cv. Montuni después de dos años de injertado, se asperjó con Trichodex®, 400 g h<sup>-1</sup> y *T. longibrachiatum* 1.8x10<sup>6</sup> UFC ml<sup>-1</sup>, después de un día se inoculó con *Ph. chlamydospora*. En ese trabajo se encontró que el tratamiento de *T. harzianum* comercial fue mejor, con la menor longitud promedio de necrosis de 2.1 cm. Otro aspecto a considerar es el punto de inoculación. En este experimento se infiltraron las esporas directamente en la madera y con una distancia promedio de 22 cm entre el hongo de control biológico y el patógeno, en tanto que en el experimento de Di Marco et al. (2004), se asperjó sobre la herida de poda. La concentración de esporas también fue diferente. En el trabajo de Di Marco et al. (2004) se usaron 10<sup>6</sup> esporas/ml, mientras que en esta evaluación se usaron 10<sup>5</sup> esporas/ml. Finalmente las variedades de vid fueron distintas del material utilizado; en este trabajo se utilizó el cv. Merlot pie franco, a diferencia del cv. Mountani injertado en el trabajo de Di Marco et al. (2004). No obstante, las cepas de *T. harzianum* son las que sobresalen como agentes de control biológico.

Se ha reportado que las inoculaciones con *Trichoderma* tienen una correlación negativa al aplicarse al mismo tiempo que el organismo patógeno (Michel-Aceves et al., 2013) y que eventualmente alguna especie de *Trichoderma* puede desencadenar un efecto adverso en la planta (Schwarze et al., 2012). Sin duda, la selección de cepas nativas permitirá disminuir este riesgo y encontrar cepas que impidan el desarrollo vegetativo, parasiten las hifas y eviten la formación de estructuras de resistencia de los hongos fitopatógenos (Vera et al., 2005).

## Conclusiones

---

El ingrediente activo azoxistrobin, con registro para el control de cenicienta (*Uncinula necator*) en vid, en la dosis de mínima sugerida por el fabricante 0.3 g/L, retarda el crecimiento micelial de las cepas *T. harzianum* SACH21-3 y *T. gamsii* CCMT01 y SACH26-1 respectivamente pero no lo elimina. Por lo que puede ser considerado en un paquete de manejo integrado de enfermedades.

El aislamiento *T. harzianum* SACH21-3 en concentraciones de  $10^6$  conidios, es el que presentó mayor prevalencia después de aplicarse sobre la herida de poda en viñedos comerciales.

En medio de cultivo mineral suplementado con quitina coloidal al 4.5 %, los aislamientos producen mayor cantidad de proteínas asociadas con la habilidad de micoparasitismo y entre las cepas *T. harzianum* SACH21-3 mostró el nivel más alto.

La cepa *T. harzianum* SACH21-3 podría contrarrestar el efecto de los fitopatógenos *Pm. chlamydopora* y *Ph. aleophilum* en vid, ya que fue la que restringió más la lesión en la madera y fue la que se aisló del tallo de la vid posterior a cuatro meses de haber sido aplicada en invernadero.

## **Recomendaciones**

---

Utilizar la pared celular del hongo fitopatógeno blanco como fuente de carbono para inducir la producción y secreción de enzimas hidrolíticas, verificar la actividad de las enzimas hidrolíticas en PAGE nativo con cromogénicos específicos para quitinasas, realizar experimentos de inhibición del extracto crudo hacia los conidios del fitopatógeno.

En las aplicaciones de conidios de *Trichoderma* spp. en campo, se sugiere agregar una fuente de carbono como urea al 2 % y realizar aplicaciones bimestrales.



## 6. Referencias bibliográficas

---

- Abou-Mansour, E., Couché, E., and Tabacchi, R. 2004. Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms?. *Phytopathologia Mediterranea*. 43: 75-82
- Adams, J. D. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150: 2029-2035. Doi: 10.1099/mic.0.26980-0
- Agrawal, T., and Kotasthane, S. A. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springer Plus*. 1: 73. Recuperado de: <http://www.springerplus.com/content/1/1/73>
- Agrios, N. G. 2010. *Fitopatología*. 2ª ed. Limusa. México, D. F. 838 p.
- Ahmad, J.S., and Baker, R. 1988. Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 34: 229-234.
- Alaniz-Ferro, S. M. 2008. Caracterización y control de *Cylindrocarpon* spp. agente causal del pie negro de la vid. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València. 164 p.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A. and Evidente, A. 2011. Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins*. 3: 1569-1605.
- Bailey, A. B., Bae, H. A., Strem, D. Crozier, J. M., Thomas, E. S., G.J. Samuels, B.T. Vineyard, T. B., and Holmes, A. K. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*. 46: 24-35. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>
- Bartnicki-García, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology*. 22: 87-107.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, A. M., and Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma strains*. *International Microbiology*. 7: 249-260.
- Bernard, M., and Latgé, J. P. 2001. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Medical Mycology*. 39: S9-18. Doi: 10.1080/mmy.39.1.9.17
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C., and Fontaine, F. 2012. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *PlantPathology*. 1-23. Doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x
- Bester, W., Crous, P. W., and Fourie, P. H. 2007. Evaluations of fungicide as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology*. 36: 73-77.
- Biggs, A., and Britton, O. 1988. Presymptom histopathology of peach trees inoculated with *Botryosphaeria obtusa* and *B. dothidea*. *Phytopathology*. 78: 1109-1118.

- Bowman, M. S., and Free, J. S. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. 28:799-808. Doi: 10.1002/bies.20441
- Calzarano, F., Amalfitano, C., Seghetti, L., and Cozzolino, V. 2009. Nutritional status of vines affected with esca proper. *Phytopathologia Mediterranea*. 48: 20-31.
- Chiarappa, L. 1959. Wood decay of the grapevine and its relationship with black measles disease. *Phytopathology*. 49: 510-519.
- Cobos-Román, R. 2008. Los decaimientos de la vid en Castilla y León: aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*). Tesis doctoral. Universidad de Salamanca-Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL). 166 p.
- Crous, W. P., and Gams, W. 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a casual organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea*. 39:112-118.
- Crous, W. P.; Gams, W.; Winfield, M. J., and Van Wyk P. S. 1996. *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia*. 88: 786-796.
- Darrietortd, G., and Lecomte, P. 2007. Evaluation of a trunk injection technique to control grapevine wood diseases. *Phytopathologia Mediterranea*. 46: 50-57.
- Del Río, A. J., Gómez, P., Báidez, A., Fuster, D. M., Ortuño, A., and Frías, V. 2004. Phenolic compounds have a role in the defense mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea*. 43: 87-94.
- Del Rivero, J. M. y García-Marí, F. 1984. Ensayo de productos contra la yesca de la vid y la piral de la vid en tratamientos de invierno. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*. 10: 17-30.
- Díaz, A. G., and Latorre, A. B. 2013. Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection*. 46: 106-112.
- Di Marco, S., Osti, F., and Cesari, A. 2004. Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea*. 43: 108-115.
- Eskalen, Y., Feliciano, A., and 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: 1100-1104.
- Fischer, M. 2002. A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress*. 1: 315-324.
- Fischer, M., Bierner, E., Merz, M., Rether, J., Antelo, L., Opatz, T., and Thines, E. 2012. Secondary metabolite production in esca associated fungi and impact of fungicides on the biosynthesis rate. *In: Book of abstracts 8th International workshop on grapevine trunk diseases*. Valencia, Spain. 180 p.
- Fourie, P. H., and Halleen, F. 2004. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease*. 88: 1241-1245.

- Gaertner, C. 2008. Baja California región vitivinícola, ¿Necesita una denominación de origen? *In: Memorias del V seminario internacional de vitivinicultura. INIFAP-SAGARPA. 25-34.*
- Gal-Hemed, I., Atanasova, L., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, S. I., Viterbo, A. and Yarden, O. 2011. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and Environmental Microbiology. 15: 5100-5109. Doi:10.1128/AEM.00541-11*
- Gómez R. M., Rojas A. L. I., Rojas A. N. G. y Cruz Camarillo, R. 2004. Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue RR, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of Microbiological Methods. 56: 213-219. Doi: 10.1016/j.mimet.2003.10.011*
- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N. y Miranda, I. 2010. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico I. expresión de actividad quitinasa. *Revista Protección Vegetal. 25: 58-63.*
- Gramaje, D., and Armengol, J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources detection, identification, and management strategies. *Plant Disease. 9:1040-1055. Doi: 10.1094 / PDIS-01-11-0025*
- Gramaje, D., Armengol, J., Salazar, D., López-Cortés, I., and García-Jiménez, J. 2009. Effect of hot-water treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. *Crop Protection. 28: 280-285.*
- Graniti, A., Surico G. and Mugnai L. 2000. Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? *Phytopathologia Mediterranea. 39: 16-20.*
- Groenewald, M.; Denman, S.; and Crous, P. W., 2000: Fungicide sensitivity of *Phaeoconiella chlamydospora*, the causal organism of Petri grapevine decline. *South African Journal for Enology and Viticulture. 21: 59-61*
- Gubler, W. D., and Eskalen, A. 2008. Grapevine nursery practices and effects on Petri disease and young esca. *In: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Annual National Viticulture Research Conference. University of California, at Davis.*
- Gubler, W. D., Costadone, L., and Peduto, F. 2012. Control of grapevine trunk diseases in California. *In: Book of abstracts 8th international workshop on grapevine trunk diseases. Valencia, Spain. 180 p.*
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., Olivar, R. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamiento de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 32: 44-49.*
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millan, E., Ávila-Quezada, G.D., Bravo-Luna, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S., and Lorito, M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología. 28: 87-96.*

- Gveroska, B., and Ziberoski, J. 2011. The influence of *Trichoderma harzianum* on reducing root rot disease in tobacco seedlings caused by *Rhizoctonia solani*. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*. 2: 1-11.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 2: 190-4. Doi: 10.1094/PHYTO-96-0190.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., and Chet, I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews*. 2: 43-56.
- Harvey, I. C., and Hunt, S. J. 2006. Penetration of *Trichoderma harzianum* into grapevine wood from treated pruning wounds. *New Zealand Plant protection*. 59: 343-347.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., and Monte, E. 2012 . Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 158: 17-25.
- Hernández-Martínez, R. y Valenzuela-Solano, C. 2011. Enfermedades de la madera en la costa de Ensenada, Baja California. CICESE-INIFAP. Folleto técnico No. 1. 22 p.
- Hidalgo, L. 2002. Tratado de viticultura general. Madrid. Mundi-Prensa. 3ra ed. 1241 p.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A. and Gindro, K. 2012. What if esca disease of grapevine were not a fungal disease?. *Fungal Diversity*. 54: 51-67. Doi: 10.1007/s13225-012-0171-z
- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 24: 14-21.
- Jaspers, M.V., 2001. Effect of fungicides, *in vitro*, on germination and growth of *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*. 40: S453-S458.
- John, P. R., Tyagi, D. R., Prévost, D., Brar, K. S., Pouleur, S., and Surampalli, Y. R. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection*. 29: 1452-1459. Doi:10.1016/j.cropro.2010.08.004
- Kakalíková, L., Jankura, E. and Šrobárová, A. 2006. *Phaeoconiella chlamydospora*: causal agent of vine decline (*Vitis vinifera*) in the vineyards of Slovakia. *Plant Pathology*. 55: 815. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01465.x
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., and Nagy, E. 2003. *Food Technology Biotechnology*. 41: 37-42.
- Kovacs, K., Szakacs, G., Pusztahelyi, T., and Pandey, A. 2004. Production of chitinolytic enzymes with *Trichoderma longibrachiatum* IMI 92027 in solid substrate fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*. 118: 189-204.
- Latgé, J. P. 2007. The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. 66: 279-290.
- Latgé, J. P., and Calderone, R. 2006. The fungal cell wall. *In: The Mycota. Growth, differentiation and sexuality*. (eds.). Kües, U., and Fischer, R. Springer. Berlin. Pp. 73-104.

- Letousey, P., Baillieul, F., Perrot, G., Rabenoelina, F., Boulay, M., Vaillant-Gaveau, N., Clément, C., and Fontaine, F. 2010. Early events prior to visual symptoms in the apoplectic form of grapevine esca disease. *Phytopathology*. 100: 424-431. Doi:10.1094/PHYTO-100-5-0424
- Letousey, P., de Zelicourt, A., Dos Santos, C. V., Thoiron, S., Monteau, F., Simier, P., Thalouarn, P., and Delavault, P. 2007. Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. *Plant Pathology*. 56: 536-546.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., and Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*. 48: 395-417. Doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114314
- Lopes, A. M., Gomes, S. D., Bello K. M. G., Pirovani, P. C., de Mattos C. J. C., Goés-Neto, A., and Micheli, F. 2008. Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*. *Mycological Research*. 112: 399-406. Doi:10.1016/j.mycres.2007.10.017
- López-Mondéjar, R., Blaya, J., Obiol, M., Ros, M., and Pascual, J. A. 2011. Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: *in vitro* and greenhouse nursery experiments. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 103: 1-8. Doi:10.1016/j.pestbp.2012.02.001
- Longa, C. M. O., Savazzini, F., Tosi, S., Elad, Y., and Pertot, I. 2009. Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 1549-1557. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04117.x
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M., and Jansson, K. J. 2004. *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 3073-3081. Doi: 10.1128/AEM.70.5.3073-3081.2004
- Martín, L., Cuesta, M. J., and Martín, M. T. 2011. A new report of *Phaeoacremonium viticola* and *P. hispanicum* causing grapevine trunk disease in Castilla y Leon, Spain. *New Disease Reports*. 23:27. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2011.023.027>
- Martínez, T. A., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, J. M., Gutiérrez, A., and del Río, C. J. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8:195-204.
- McLean, T., Fourie, H. P., and McLeod, A. 2009. Reporter gene transformation of the trunk disease pathogen *Phaeoacremonium chlamydospora* and biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Australasian Plant Pathology*. 38: 153-167.
- McLean, L. K., Swaminathan, J., Frampton, C. M., Hunt, J. S., Ridgway, H. J., and Stewart, A. 2005. Effect of formulation on the rhizosphere competence and biocontrol ability of *Trichoderma atroviride* C52. *Plant Pathology*. 54: 212-218.

- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A. y Alarcón-Cruz, N. 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuete. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 17: 89-107.
- Morales-Pedraza, L. G. 2010. Caracterización de hongos asociados a la enfermedad de Petri y esca en el valle de Guadalupe, Baja California. Tesis de maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 74 p.
- Mugnai, L., Graniti, A., and Surico, G. 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive disease of grapevine. *Plant Disease*. 83: 404-418.
- Mukherjee, K. G., Tewari, J. P., Arora, D. K., and Saxena, G. 1992. Regulatory aspects in chemical control of fungal diseases: impact on efficient plant production *In: Recent development in biocontrol of plant diseases*. (eds) Backhaus, F. G., Ulrich Gisi, U., Chet, I., and Lodovica, G. M. Springer. New York, New York. Pp 47-55. Doi: 10.1007/978-1-4020-8804-9
- Mukherjee, M., Mukherjee, P. K., Horwittz, B. A., Zachow, C., Berg, G., and Zeilinger, S. 2012. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions in genetic biological control. *Indian Journal of Microbiology*. 52: 522-529.
- Mutawila, C., Fourie, P. H., Halleen, F., and Mostert, L. 2011a. Histopathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeoemoniella chlamydospora*, and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds. *Phytopathologia Mediterranea*. 50: S46-S60.
- Mutawila, C., Fourie P. H., Hallen, F., and Mostert, L. 2011b. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*. 50: S264-S276
- Nandeesh, S. B., Kumar, R. M., and Reddy, E. P. N. 2013. Evaluation of different fungicides and their compatibility with potential *Trichoderma* spp. for the management of *Aspergillus niger*, Incitant of collar rot of groundnut. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*. 1: 59-63.
- Nieblas-Núñez, N. 2012. Evaluación del potencial de *Trichoderma* sp. y *Glomus intraradices* para controlar a *Lasioidiplodia theobromae*, uno de los agentes causales de la muerte regresiva por Botriosferia en vid (*Vitis vinifera* L.). Tesis de maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 127 p.
- Obrador-Sánchez, J. A. 2011. Comportamiento de *Botryosphaeria* spp. en presencia de madera de vid: inicio de la colonización y características microscópicas. Tesis de maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 117 p.
- Ochoa, M. M. E. 2002. Antibiosis y micoparasitismo de cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Hyphomycetes:Hyphales) sobre *Mycophaerella fijensis* (Loculoascomycetes:Dothideales). Tesis de doctorado. Universidad de Colima. 99 p.
- Patil, R. S, Ghormade, V. V, and Deshpande, M. V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 473-483.
- Pascoe, I. 1998. Trunk diseases of grapevines- perspectives from a tour of California. *The Australian Grapegrower & Winemaker*. 417: 68-71

- Pedraza-Reyes, M., and López-Romero, E. 1989. Purification and some properties of two forms of chitinase from mycelial cells of *Mucor rouxii*. *Journal of General Microbiology*. 135: 211-218.
- Plata-Caudillo, J. A. 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. Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 96 p.
- Punitthalingam, E. 1980. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae*. In: *Biblioteca Mycologica*. J. Cramer, Berlin. 123 p.
- Punitthalingam, E., and J. M. Waller. 1976. *Botryosphaeria obtusa*. description of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 394 p.
- Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandão, R. S., Jesuino, R. S. A. and Ulhoa, C. J. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letter*. 35: 1461-1468.
- Rabilloud, T., Brodard, V., Peltre, G., Righetti, P. G., and Ettori, C. 1992. Modified silver staining for immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 13: 264-266.
- Riquelme Perez, M., Yarden, O., Bartnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, J. S., Fleibner, A., Freitag, M., Lew, R. R., Mouriño-Pérez, R. R., Plamann, M., Rasmussen, C., Richtnammer, C., Roberson, W. R., Sánchez -León-Hing, E. F., Seiler, S., and M. K. Watters, K. M. 2011. Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha a model cell for polarized growth. *Fungal Biology*. 115: 446-474. Doi:10.1016/j.funbio.2011.02.08
- Roberts, W. K., and Selitrennikoff, C. P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology*. 134: 169-176.
- Rolshausen, P. E., Urbez-Torrez, J. P., and Rooney-Latham, S. 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*. 61: 113-9.
- Rudall, K. M., and Kenchington, W. 1973. The chitin system. *Biological Reviews*. 4: 597-633. Doi: 10.1111/j.1469-185X.1973.tb01570.x
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., and Faeth, S. H. 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends Plant Science*. 9: 275-280.
- Samuels, G. J., Chaverri, P., Farr, F., and McCray, E. 2012. *Trichoderma*. *Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Recuperado de: <http://taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>
- Scheck, H. S., Vazquez, S. J. Gubler, W. D., and Fogle D. 1998. Young grapevine decline in California. *Practical Winery & Vineyard journal*. 3: 32-38.
- Schubert, M., Siegfried Fink, S., and Schwarze, W. M. R. F. 2008. Field experiments to evaluate the application of *Trichoderma* strain (T-15603.1) for biological control of wood decay fungi in trees. *Arboricultural Journal*. 31: 249-268.

- Schwarze, F. W. M. R., Jauss, F., Spencer, C. Hallamb, C., and Schubert, M. 2012. Evaluation of an antagonistic *Trichoderma* strain for reducing the rate of wood decomposition by the white rot fungus *Phellinus noxius*. *Biological Control*. 61: 160-168.
- Sepúlveda, B. J. I. 2009. Aspectos geográficos y estadísticos de la viticultura del estado de Baja California. Recuperado de: [http://vidyvino.org/docs/Geografia\\_y\\_estadist\\_vid\\_2008.pdf](http://vidyvino.org/docs/Geografia_y_estadist_vid_2008.pdf)
- Serra, S., Mannoni, M. A., and Ligios, V. 2008. Studies on the susceptibility of pruning grounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*. 47: 234-246.
- Shalini, K. P., Narayan, L., and Kotasthane, A.S. 2006. Genetic relatedness among *Trichoderma* isolates inhibiting a pathogenic fungi *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Biotechnology*. 5: 580-584. Doi: 10.5897/AJB05.379
- Sharfuddin, C., and Mohanka, R. 2012. *In vitro* antagonism of indigenous *Trichoderma* isolates against phytopathogen causing wilt of lentil. *International journal of Life science & Pharma Research*. 3: 195-202.
- Shoresh, M., Harman, G. E., Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*. 48: 21-43.
- SIAP. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. 2014. Disponible en: <http://www.uva.gob.mx/index.php?portal=uva>
- Singh, S. P., and Singh, H. B. 2012. Effect of consortium of *Trichoderma harzianum* isolates on growth attributes and *Sclerotinia sclerotiorum* rot of brinjal. *Vegetable Science*. 39: 144-148.
- Sosnowski, K., Shtienberg, D., Crease, M., Wicks, R., and Scott, E. 2005. Unlocking the secrets of annual variation in *Eutypa dieback* symptoms. *Annual Technical Issue*. 7-12. Recuperado de: [http://www.sardi.sa.gov.au/\\_data/assets/pdf\\_file/0007/89458/eu\\_seasonal\\_variation.pdf](http://www.sardi.sa.gov.au/_data/assets/pdf_file/0007/89458/eu_seasonal_variation.pdf)
- Sreedevi, B., Charitha Devi, M., and Saigopal, D. V. R. 2012. Production and optimization of chitinase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *M. phaseolina*. *Agricultural Science Digest a Research Journal*. 32: 224-228.
- Stasoft®. 2011. Recuperado de: [https://www.statsoft.com/Portals/0/Support/Download/STATISTICA\\_Quick\\_Reference.pdf](https://www.statsoft.com/Portals/0/Support/Download/STATISTICA_Quick_Reference.pdf)
- Surico, G. 2000. The grapevine and wine production through the ages. *Phytopathologia Mediterranea*. 39: 3-10.
- Surico, G. 2001. Towards commonly agreed answers to some basic questions on esca. *Phytopathologia Mediterranea*. 40: S487-S490.
- Surico, G., Bandinelli, R., Braccini, P., Di Marco, S., Marchi, G., Mugnai, L., and Parrini, C. 2004. On the factors that may have influenced the esca epidemic in Tuscany in the Eighties. *Phytopathologia Mediterranea*. 43: 136-143.
- Surico, G., Mugnai, L., and Marchi, G. 2006. Older and more recent observations on esca: a critical review. *Phytopathologia Mediterranea*. 45: 68-86.



- Surico, G., Mugnai, L., and Marchi, G. 2008. The esca disease complex. A. Ciancio, K.G. Mukerji (Eds.) *In: Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria*, Springer, Heidelberg. Pp 119-136.
- Taylor, G., Jabaji-Hare, S., Charest, P. M., and Khan, W. 2002. Purification and characterization of an extracellular exochitinase,  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase, from fungal mycoparasite *Stachybotrys elegans*. *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 311-319.
- Úrbez-Torres, J. R. 2011. The status of *Botriosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*. 50: 5-45
- Vera, R., Moreno, B., Acevedo, R. y Trujillo, E. 2005. Caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp. por tipo de antagonismo y electroforesis de isoenzimas. *Fitopatología Venezolana*. 18: 2-8.
- Vinusha, B., Kumar, K. U., Rao, N. M., Srihari, V., Raveendra, A., and Naidu, M. P. 2013. Production of chitinase by using *Acremonium sporosulcatum* from shrimp biowaste . *Journal of Medical Science & Technology*. 2: 28-35.
- Yoshioka, Y., Ichikawa, H., Naznin, A. H., Kogure, A., and Hyakumach, M. 2011. Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1, a microbial pesticide of seedborne diseases of rice. *Pest Management Science*. 68: 60-66 Doi: 10.1002/ps.2220
- Žnidaršič, P., Pauko, A., and Komel, R. 1995. The growth form of the inducing microorganism and chitin addition affect mycolytic enzyme production by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Industrial Microbiology*. 15: 397-400.