

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



Evaluación *in vitro* del potencial antagónico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de la familia Botryosphaeriaceae

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO
PRESENTA
RODRIGO MONTANA TORRES CHÁVEZ

Ensenada, Baja California, México

Abril de 2015

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

Votos aprobatorios del examen profesional de Biología

Evaluación *in vitro* del potencial antagónico de cepas nativas de
Trichoderma spp sobre hongos fitopatógenos de la familia
Botryosphaeriaceae

Presenta:

Rodrigo Montana Torres Chávez

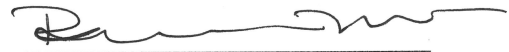
Jurado calificador:



Dra Rufina Hernández Marínez
Presidente



Dra. Amelia Portillo López
Sinodal



Dr. Rafael Bello Bedoy
Sinodal

Resumen

Las enfermedades causadas por hongos afectan numerosas especies vegetales. La vid (*Vitis vinifera*) es atacada por diferentes hongos de la madera, los cuales disminuyen el rendimiento y la longevidad de los viñedos. Entre las especies de hongos reportados como patógenos de la vid se encuentran diferentes géneros de la familia Botryosphaeriaceae; entre otros *Lasiodiplodia*, *Eutypella*, *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum* y *Diplodia*. En la actualidad no existen métodos de control para estas enfermedades que sean totalmente eficaces. En las últimas décadas se ha optado por utilizar agentes de control biológico. El hongo *Trichoderma* spp. ha sido utilizado como biocontrol, debido a sus estrategias de inhibición altamente exitosas contra una amplia variedad de hongos fitopatógenos. En el presente estudio se evaluó la capacidad de las cepas nativas *Trichoderma harzianum* T3, *T. gamsii* T5 y *T. gamsii* T6 de inhibir 23 aislados de los géneros *Lasiodiplodia*, *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum* y *Diplodia*. Todas las cepas de *Trichoderma* actuaron como antagonistas de los hongos patógenos, inhibiendo o afectando su crecimiento en cultivos duales en placa. Los porcentajes de inhibición causados por ambas especies de *Trichoderma* sp presentaron diferencias significativas. El análisis microscópico reveló algunas interacciones previamente reportadas, como enrollamiento, hinchazón y degradación de pared celular de las cepas patógenas. Adicionalmente se realizaron ensayos de actividad quitinolítica y de producción de sideróforos, donde solo *T. harzianum* resultó positivo para sideróforos. *T. harzianum* T3 y *T. gamsii* (cepa T5 y cepa T6) presentaron actividad quitinolítica positiva. Los resultados indican que las cepas nativas de *Trichoderma* sp poseen gran potencial antagónico, capaz de controlar distintos géneros de la familia Botryosphaeriaceae, causantes de enfermedades en las plantas de vid.

Palabras Clave: Biocontrol, *Trichoderma*, enfermedades de la madera, Botryosphaeriaceae

Índice

	Página
Resumen	III
Índice.....	III
Lista de figuras	V
Lista de tablas.....	VII
I. Introducción	1
II. Antecedentes	13
El cultivo de vid	13
Enfermedades de madera de vid	2
Especies de Botryosphaeriaceae que causan enfermedad en vid	4
<i>Botryosphaeriaceae</i> reportadas en vid en México.....	14
Control Biológico de hongos fitopatógenos	6
<i>Trichoderma</i> spp.....	9
Mecanismos de biocontrol de <i>Trichoderma</i> spp.....	10
Micoparasitismo	10
Antibiosis	10
Competencia	11
Estimulación del sistema de defensa de la planta	15
Estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal	16
Uso de <i>Trichoderma</i> en el control de <i>Botryosphaeria</i> sp.	18
III. Hipótesis.....	20
Objetivos	20
Objetivo general.....	20

Objetivos particulares	20
VI. Metodología	22
Cepas utilizadas en este estudio	22
Ensayos de inhibición	22
Detección de actividad quitinasa en placa	25
Detección de producción de sideróforos mediante el método CAS en placa	26
Análisis microscópico de las interacciones entre <i>Trichoderma</i> spp. y Botryosphaeriaceae .	27
Análisis estadísticos.....	27
V. Resultados	28
Evaluación del antagonismo de <i>Trichoderma harzianum</i> T3.....	28
Evaluación del antagonismo de <i>Trichoderma gamsii</i> T5.....	30
Evaluación del antagonismo de <i>Trichoderma gamsii</i> T6.....	32
Detección actividad quitinolítica y producción de sideróforos por <i>Trichoderma</i> sp.	33
Microscopia de las interacciones entre las cepas antagónicas de <i>Trichoderma</i> y las cepas patógenas de la familia Botryosphaeriaceae	34
VI. Discusión	37
VII. Conclusiones	41
VIII. Literatura citada	43

Lista de figuras

Página

- Figura 1. Planta de vid mostrando brazos muertos y crecimiento raquítico en primavera..... 3
- Figura 2. Planta de vid afectada por el hongo de la madera *Diplodia seriata*. A) Planta mostrando síntoma de muerte regresiva en campo. B) Se puede observar un cancro en forma de cuña en el xilema de la planta. B) Picnidio, estructura de reproducción de forma piriforme que contiene las esporas. C) Esporas del patógeno..... 4
- Figura 3. Cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas en los ensayos duales de inhibición. A. *T. harzianum*. B. *T. gamsii* cepa T5. C. *T. gamsii* cepa T6. D. Hifas, conidióforos y esporas de *Trichoderma harzianum*. 23
- Figura 4. Diagrama que muestra cómo se realizaron los ensayos de inhibición de los hongos patógenos por *Trichoderma* sp. y se determinó de la distancia mayor (r1) y la distancia menor (r2) alcanzada por el patógeno en un cultivo dual con *Trichoderma* sp. para aplicar la fórmula de Royse Y Ries (1978). 25
- Figura 5. A) Crecimiento detenido del patógeno *N. australe* por *T. harzianum*, y B) Control de *N. australe* crecido en ausencia de *Trichoderma*. La letra P indica el sitio de inoculación del patógeno y T el sitio de *Trichoderma*..... 30
- Figura 6. Interacción macroscópica observada en medio PDA. A) Sobre crecimiento de *T. gamsii* T5 sobre *N. australe*. B) Inhibición de crecimiento del patógeno *N. luteum*, por *T. gamsii* T5. C) Control *N. australe*, D. Control de *N. luteum*. La letra P indica el sitio de inoculación del patógeno y T el sitio de *Trichoderma*. 31
- Figura 7. Inhibición del crecimiento de *B. dothidea* por *T. gamsii* T6. A. Crecimiento de *T. gamsii* T6 sobre el micelio del patógeno *N. australe*. B. Control de *B. dothidea*. La letra P indica el sitio donde se inoculo el patógeno y T el sitio de *Trichoderma*. 32
- Figura 8. Ensayo cualitativo para evidenciar la actividad quitinolítica de las cepas antagonicas. A. Control, B. *T. harzianum*, C. *T. gamsii* T5, D. *T. gamsii* T6. El cambio en la coloración de amarillo a morado-purpura fue considerado como positivo para el ensayo. A la derecha se muestran réplicas de cada tratamiento..... 33
- Figura 9. Ensayo en placa con medio CAS para evaluar la capacidad de producción de sideróforos de las cepas antagonicas. A. Control, B. *T. harzianum*, C. *T. gamsii* T5, D. *T. gamsii* T6. El aislado *T. harzianum* T3 se detectó como positivo para la producción de sideróforos. El desarrollo de un cambio de color en torno a la colonia indica que el

hongo utiliza el Fe del complejo colorante CAS-Fe, provocando un cambio en la coloración en el medio de azul a rosa. 34

Figura 10. Micrografías (100x) mostrando las interacciones entre *Trichoderma* spp. y la cepas UCD256Ma y MXL-28 de *L. theobromae*. (A) Hifas de *T. gamsii* T5 (flecha) adheridas a hifas de *L. theobromae* UCD256Ma. (B) Hifa de *T. gamsii* enrollándose sobre el patógeno *L. theobromae* USD256Ma. (C y D) Hinchazón de las hifas de *L. theobromae* MXL-28 por *T. harzianum*. (E y F) Desintegración y lisis de pared celular de *L. theobromae* USD256Ma (pagina anterior). 36

Figura 11. Cepas de Interacción temprana (4 días) entre *T. harzianum* y *L. theobromae* MXL-28 teñida con el colorante vital Fluorescein Y; las hifas tenidas son las hifas vivas, pues el colorante tiene afinidad al citoplasma; las hifas que no retuvieron el colorante se consideraron muertas..... 236

Lista de tablas

Tabla I. Especies de la familia Botryosphaeriaceae aisladas de plantas de vid en distintas regiones del mundo.....	5
Tabla II. Cepas de hongos patógenos de la familia Botryosphaeriaceae utilizadas en los ensayos duales.	24
Tabla III. Porcentaje de inhibición promedio de tres réplicas de ante los antagonistas <i>Trichoderma harzianum</i> T3, <i>Trichoderma gamsii</i> T5 y <i>Trichoderma gamsii</i> T6..	29
Tabla IV. Eficacia de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en la producción de sideróforos en medio CAS y en la capacidad de producir enzimas con actividad quitinolítica.	34

I Introducción

La vid (*Vitis vinifera*) es uno de los frutales cultivados de mayor importancia a nivel mundial. En la actualidad se le puede encontrar en los 5 continentes. En México, su cultivo se remonta a la llegada de los españoles durante el siglo XV. Hoy en día es un cultivo distribuido en todo el país, principalmente en seis Estados: Baja California, Sonora, Durango, Coahuila, (La zona de la laguna) Aguascalientes, Guanajuato y Querétaro. En conjunto se producen hasta 324 t, en 26,914 ha cultivadas (SIAP, 2013). En Baja California, la vid representa un cultivo importante, pues se produce aproximadamente el 90% del vino nacional, siendo el municipio de Ensenada la región que contribuye con el 90% de la producción de Baja California (Sepúlveda-Betancourt, 2009).

Como toda planta cultivada, la vid es afectada por distintos agentes patógenos, como son: virus, bacterias y hongos. Estos últimos causan pérdidas millonarias en los viñedos (Siebert, 2001), disminuyendo las cosechas y la longevidad. Algunos de los hongos más comunes son aquellos que afectan a la madera, entre otros: *Eutypa lata* causante de la Eutipiosis; *Cylindrocarpon* spp., causante del pie negro, *Phaemoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* causantes del complejo de la enfermedad de yesca (Edwards y Pascoe, 2004) y múltiples integrantes de la familia Botryosphaeriaceae, causantes de muerte regresiva o decaimiento por Botryosphaeria (Úrbez-Torres., 2006; Bertsch et al., 2012). Los integrantes de la familia Botriosferia han tomado mayor importancia a nivel

mundial, pues se han aislado de viñedos en las principales zonas vitícolas del mundo (Úrbez-Torres et al., 2008)

En el presente trabajo, se evaluó la capacidad antagónica de las cepas de *T. harzianum* T3, *T. gamsii* T5 y *T. gamsii* T6 frente a 23 cepas de la familia Botryosphaeriaceae empleando ensayos duales de competencia *in vitro*, con el fin de reafirmar su potencial como agentes de control biológico. Adicionalmente las cepas antagónicas fueron sometidas a dos ensayos cualitativos en placa; el primero utilizando el medio CAS para evidenciar su capacidad de producir sideróforos, y el segundo para evaluar la capacidad de los antagonistas para producir enzimas quitinolíticas.

Enfermedades de madera de vid

Las plantas de vid son afectadas por numerosas enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus que reducen las cosechas e incrementan los costos de producción anuales. Dentro de las principales enfermedades, se encuentran las enfermedades de la madera, ocasionadas por distintos hongos patógenos. Los más comunes son *Eutypa lata* (Rappaz 1984), causante de la Eutipiosis; *Phaemoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. causantes del complejo de la enfermedad de yesca (Edwards Y Pascoe, 2004); y múltiples integrantes de la familia Botryosphaeriaceae, causantes de muerte regresiva o decaimiento por Botriosferia (Úrbez-Torres., 2006; Bertsch et al., 2012). Generalmente estos patógenos afectan los órganos perennes de plantas mayores a 7 años, causando síntomas en hojas, frutos y tallos, provocando eventualmente la muerte de la planta. La esporulación asexual del hongo es favorable durante la época de poda, ya que coincide con la época de lluvias en la zona vitícola del norte de México; el hongo utiliza las heridas de poda para penetrar e infectar los tejidos vasculares. Muchos de los síntomas manifestados en la planta son el

resultado de la interrupción del flujo de savia en los conductos xilemáticos, así como por las toxinas producidas por el hongo (Figura 1) (Van Niekerk et al., 2006; Amposah et al., 2009).

Los síntomas de las enfermedades varían según la ubicación geográfica, la edad de la planta, el cultivar y la susceptibilidad del mismo; además de los factores ambientales como el tipo de suelo, la disponibilidad de nutrientes, y la cantidad y calidad del agua. Se ha demostrado que las infecciones por hongos de la familia *Botryosphaeriaceae*, suelen ser más severas cuando la planta huésped ha sido afectada por algún tipo de estrés (Bertsch, 2012).



Figura 1. Planta de vid mostrando brazos muertos y crecimiento raquítrico en primavera. Foto: Archivo Laboratorio de Fitopatología del CICESE.

Ningún varietal, ya sea silvestre o cultivado, ha sido reportado como resistente a enfermedades de la madera. En las últimas décadas, se ha reportado un considerable incremento en la frecuencia de síntomas relacionados con estas enfermedades en las zonas vitícolas del mundo (Edwards Y Pascoe, 2004; Bertsch, 2012).



Figura 2. Planta de vid afectada por el hongo de la madera *Diplodia seriata*. A) Planta mostrando síntoma de muerte regresiva en campo. B) Se puede observar un cancro en forma de cuña en el xilema de la planta. B) Picnidio, estructura de reproducción de forma piriforme que contiene las esporas. C) Esporas del patógeno. Foto: Archivo Laboratorio de Fitopatología del CICESE.

2.3. Especies de Botryosphaeriaceae que causan enfermedad en vid

Los hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae son importantes patógenos de regiones tropicales y subtropicales. Han sido reportados como fitopatógenos en más de quinientas plantas de interés comercial (Úrbez-Torres et al., 2008). En la vid, la enfermedad

causada por *Botryosphaeria* spp. es conocida como muerte regresiva por Botriosferia. Las especies de *Botryosphaeria* aisladas de plantas con síntomas, son miembros de los géneros *Fusicoccum*, *Neofusicoccum*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia* y *Dothiorella* en su fase asexual, entre otros. Estos hongos han sido reportados en la mayoría de las áreas vitícolas del mundo (Tabla 1), incluyendo América del norte y sur, Australia, Europa y Asia (Úrbez-Torres et al., 2011). Varios integrantes de este género, junto con *E. lata* son responsables de pérdidas millonarias en cultivos de vid (Siebert, 2001; Úrbez-Torres et al., 2006).

Tabla I. Especies de la familia Botryosphaeriaceae aisladas de plantas de vid en distintas regiones del mundo (Modificados de Úrbez-Torres, 2011).

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

Una especie de *Botryosphaeria* fue asociada por primera vez a canchros en vid en 1972, en Egipto, y 15 años después, integrantes del mismo género fueron aislados en viñedos de California (Úrbez-Torres et al., 2008).

Las principales patologías causadas por estos hongos son representadas por síntomas vasculares y foliares; canchros perennes en forma de cuña sobre los tallos; muerte de brotes, brazos y cordones; decoloración y necrosis de tejidos vasculares, clorosis según el estado de la infección sobre la madera, marchitamiento y caída de hojas; y deshidratación y marchitez de los racimos de frutos. Estos síntomas pueden variar en su severidad, según la región geográfica donde se desarrolle el patógeno y el varietal cultivado (Urbez-Torres Y Gubbler, 2009; Epstein, 2008; Bertsch et al., 2012). Los síntomas se expresan lentamente, alternando síntomas año con año, dificultando su identificación en los viñedos. Existe una fuerte relación entre su expresión y las condiciones climáticas, las cuales pueden favorecer o no, el crecimiento y dispersión de los hongos patógenos. Así mismo, algunos fenómenos climatológicos pueden llegar a provocar un estrés en las plantas de vid, incrementando su susceptibilidad a enfermedades de la madera (Van Niekerk et al., 2006).

La dispersión de los hongos es a través de la liberación de conidios durante todo el año, predominando en épocas de lluvia y primavera; los hongos penetran la planta de vid mediante heridas naturales y heridas de poda (Amponsah et al., 2009).

2.5. Control Biológico de hongos fitopatógenos

La necesidad de producir suficiente alimento y productos derivados del campo aumenta a la par con la población mundial. Para asegurar dicha demanda de producción, es necesaria la protección de los cultivos contra plagas y enfermedades. Sin duda, durante el siglo pasado y en la actualidad, el uso de plaguicidas sintéticos ha sido una práctica muy efectiva en el control de enfermedades; sin embargo los costos ambientales son enormes, pues representan una gran fuente de contaminación de suelos y aguas, así como a la salud humana; así mismo, el mal uso de los mismos y su constante aplicación, ha ocasionado que algunos patógenos desarrollen cierto grado de resistencia hacia los pesticidas (Harman et al., 2004; Pal Y Gardener, 2006; Gilbert Y Gill, 2010).

El término de biocontrol hace referencia al uso de organismos vivos para suprimir la densidad de población o el impacto de un organismo en específico, haciéndoles menos abundantes o destructivos de lo que pudiesen ser (Eilenberg, 2006). Los microorganismos utilizados en la práctica de biocontrol, difieren de los agentes químicos en que, éstos necesitan desarrollarse y proliferar para ser efectivos; al establecerse en los ecosistemas agrícolas, protegen a las plantas contra patógenos durante períodos favorables para la infección (Lo et al., 1998).

Los microorganismos utilizados en la práctica de biocontrol, difieren de los agentes químicos en que, éstos necesitan desarrollarse y proliferar para ser efectivos; al establecerse en los ecosistemas agrícolas, protegen a las plantas contra patógenos durante períodos favorables para la infección (Lo et al., 1998). Algunos de los agentes biológicos más utilizados han sido bacterias como *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*; y diferentes

hongos filamentosos como *Fusarium*, *Cladosporium*, *Verticilium* y *Trichoderma*. El género de *Trichoderma* ha demostrado tener un efecto antagónico o supresor de enfermedades, tanto *in vitro* como en el campo (Highley, 1997; Harman, 2004; John et al., 2005; Pal Y Gardener, 2006; Halleen et al., 2010; Kotze et al., 2011).

Los hongos utilizados en el biocontrol, ejercen mecanismos directos e indirectos para suprimir a los agentes patógenos. Uno de los mecanismos directos es el micoparasitismo hacia otros hongos; Los mecanismos indirectos son: la competencia por nutrientes y espacio, la capacidad de solubilizar compuestos no asimilables para la planta y la inactivación de enzimas de los agentes patógenos. Además de inducir la resistencia sistémica de la planta, se ha reportado un aumento la tolerancia al estrés mediante un crecimiento inducido de raíces y partes aéreas. Por último un mecanismo mixto, donde los hongos antagónicos producen antibióticos y enzimas líticas degradadoras de la pared celular (CWDEs por el término en inglés Cell Wall Degradation Enzymes) que actúan sinérgicamente en contra de los organismos patógenos (Harman et al., 2004).

Actualmente el uso de agentes de biocontrol es una tendencia bien establecida; esta práctica se ha convertido en un fuerte complemento o reemplazo de compuestos químicos. Los microorganismos más aceptados como agentes biocontroladores son los hongos, debido a su amplio espectro antagónico en contra de distintos organismos fitopatógenos (Verma et al., 2007). Además, presentan algunas ventajas sobre los agentes químicos, como: como posibles aplicaciones periódicas o preventivas, sin riesgo de contaminación ambiental; estos hongos tienen la capacidad de permanecer en suelos y materia vegetal durante largos periodos de tiempo, debido a que forman estructuras de resistencia como clamidosporas que permiten su prevalencia en campo (Kotze et al., 2011; John et al., 2005).

2.6. *Trichoderma* spp.

Trichoderma es un género de hongos de vida libre, simbioses de plantas; algunos autores los clasifican como hongos endófitos avirulentos (Harman et al., 2004; Hoyos-Carbajal et al., 2009). Son residentes del suelo en la mayoría de las zonas climáticas y se aíslan frecuentemente de la rizósfera de diversas especies vegetales; son invasores oportunistas de rápido crecimiento, presentan reproducción asexual y una alta producción de esporas. Producen una amplia variedad de CWDEs como: celulasas, quitinasas y glucanasas (Vinale et al., 2008), lo que les confiere capacidad de parasitar otros hongos (Harman et al., 2004).

Los organismos del género *Trichoderma* sp. cumplen su función antagónica empleando diversos mecanismos, como el micoparasitismo, la producción de metabolitos secundarios antibiosis y la competencia por espacio y nutrientes en la rizósfera. Además inducen resistencia sistémica y localizada contra una variedad de patógenos en plantas (Howell, 2003). Existe evidencia contundente acerca de los efectos inhibitorios de *Trichoderma* sp. contra varios patógenos del suelo, incluyendo hongos, invertebrados y bacterias (Verma et al., 2007). En trabajos donde se han utilizado cepas de *Trichoderma* como agentes de biocontrol, se ha demostrado su efecto antagónico contra varios patógenos, tales como: *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Botryosphaeria berengiana*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium oxysporum* (Kexiang et al., 2002; Harman et al., 2004; Verma et al., 2007; Vinale et al., 2008; Alabouvette et al., 2009; Seema Y Devaki., 2012).

2.7. Mecanismos de biocontrol de *Trichoderma* spp.

2.7.1. Micoparasitismo

El micoparasitismo causado por *Trichoderma* sp. es un conjunto de eventos complejos, que comienza por la detección remota de otros hongos, seguido de un crecimiento dirigido hacia ellos. Cuando se da el contacto físico, *Trichoderma* sp. se adhiere a las lectinas del patógeno (Harman et al., 2004). Las hifas de *Trichoderma* se enrollan al micelio del hongo patógeno, formando apresorio que son una punta engrosada de una hifa o tubo germinal que facilita la adhesión y penetración al hospedero por el hongo. Una vez que *Trichoderma* ha formado el apresorio, el micelio puede penetrar hacia el lumen del hongo patógeno, y mediante la producción de enzimas, comienza a disolver la pared celular. Las CWDEs trabajan mediante la destrucción de moléculas como polisacáridos, quitina y beta-glucanos, las cuales son responsables de la rigidez de la pared celular de los hongos. Las CWDEs liberan oligómeros de la pared celular del hongo diana; y esto a su vez, induce la expresión de endoquitinasas fungitóxicas, las cuales se difunden y atacan al hongo patógeno (Harman et al., 2004). Otros metabolitos secundarios sintetizados por *Trichoderma* spp son polipéptidos lineales anfipáticos, con capacidad de desorganizar de las membranas lipídicas, dado que tienen actividad antimicrobial (Verma et al., 2007).

2.7.2. Antibiosis

La antibiosis es uno de los mecanismos de algunos microorganismos utilizados en la práctica del control biológico. Según Infante, (2009) la antibiosis es la *acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a*

estos. Pal Y McSpadden–Gardener (2006) definieron la antibiosis como: “*toxinas microbiales que pueden envenenar o eliminar otros microorganismos en pequeñas cantidades.*”

El fenómeno de antibiosis ha sido reportado en diferentes cepas de hongos del género *Trichoderma* spp. Weindling (1934), reportó que el hongo *T. virens* excretaba un “principio letal” que le permitía al agente de control biológico, actuar como parásito. La molécula se caracterizó en 1941, y fue nombrada gliotoxin. Weindling demostró su toxicidad sobre *R. solani* y *Sclerotinia* (Howell, 2003). Estudios posteriores han elucidado una gran diversidad de compuestos, así como su importancia en el proceso de control biológico. Se han reportado diversas moléculas con actividad antibiótica tal como alquilas pironas, isonitrilos, policétidos, peptaiboles, dicetopiperazinas y sesquiterpenos (Harman et al., 2000).

Los metabolitos secundarios reportados presentan diversas formas químicas y por ende, diversos mecanismos de acción. La producción de metabolitos secundarios depende de la especie de *Trichoderma*, pues existen por lo menos tres tipos de compuestos con actividad: a) compuestos volátiles, del tipo pironas, 2) compuestos solubles en agua, como el ácido heptelídico y kognínico y 3) oligopéptidos pequeños con un grupo OH en la extremo C de los aminoácidos conocidos como peptaiboles, (Vinale et al., 2008).

2.7.3. Competencia

La competencia es uno de los mecanismos descritos clásicamente en las prácticas de control biológico. Los mecanismos utilizados por los agentes de biocontrol son la competencia por espacio y nutrientes, principalmente carbón, nitrógeno y carbohidratos no

esenciales como almidón, celulosa, quitina entre otros. *Trichoderma* sp. tiene la capacidad de movilizar y tomar iones y nutrientes del suelo, esenciales para complejos no-enzimáticos de patógenos, mediante la secreción de ligandos llamados sideróforos, los cuales tienen gran afinidad hacia el hierro, tomándolo del microambiente, haciéndolos más competentes que otros microorganismos del suelo (Vinale et al., 2008; Verma et al., 2007).

La competencia por un sustrato o espacio depende de si está libre de patógenos o si presenta una micro fauna bien establecida, además de factores externos como el tipo de suelo, el pH, la temperatura y la humedad; *Trichoderma* sp. ha desarrollado importantes ventajas ante diversas condiciones, como una gran plasticidad ecológica, agresiva y rápida colonización de una amplia gama de sustratos, alta tasa de esporulación y capacidad de sobrevivir en condiciones adversas, en forma de clamidosporas, convirtiéndole en un excelente agente de control biológico. Las capacidades como agentes de control biológico difieren entre las distintas especies del género *Trichoderma*, (Infante et al., 2009; Samuels, 2006).

II. Antecedentes

2.1. El cultivo de vid

La vid (*Vitis vinifera*) es uno de los frutales más importantes económicamente en todo el mundo; la planta pertenece a la familia Vitaceae, la cual se caracteriza por presentar un tronco leñoso, y la producción frutos en racimos tipo baya, conocidos como uvas, apreciados en todo el mundo. Los frutos tienen forma y tamaño variable según el varietal. Sirven como alimento fresco, para la producción de pasas y la elaboración de vinos, entre otros productos. Es una de las plantas más antiguas utilizados por el hombre, siendo la uva uno de los primeros frutos en ser domesticados. Aunque el centro de origen sigue en debate, algunas evidencias arqueobotánicas basadas en la morfología de semillas, sugieren al Sureste de Asia, como el sitio donde comenzó la domesticación de la vid, durante el periodo Neolítico, aproximadamente 7000 A.C Otras evidencias demuestran la elaboración de vino en la zonas montañosas del norte de Irán y el Sudeste de Armenia (Bouby et al., 2013).

Actualmente, es un cultivo extendido en la mayor parte del mundo y los principales países exportadores son: Chile, Italia, Estados Unidos, Países bajos, Sudáfrica, Brasil y Argentina (<http://www.inv.gov.ar>, 2010). En México, el cultivo se remonta a la llegada de los colonizadores españoles en el siglo XV. En Baja California la producción vitícola está dividida en los municipios de Mexicali, Tecate, Tijuana y Ensenada, sumando un aproximado de 3,326 ha cultivadas. El 80% de la cosecha se destina a la elaboración de vinos y el 20%

corresponde a uva de mesa y pasas. Las principales zonas productoras de Ensenada son el valle de Guadalupe, el Valle de ojos Negros, el ejido Uruapan, Santo Tomás y San Vicente (Sepúlveda-Betancourt, 2009; Infoaserca, 2002; Merchan, 2011).

2.4. *Botryosphaericeae* reportadas en vid en México

Los primeros reportes de muerte regresiva y canchros en plantas vid en México fueron en 1979, en unos viñedos olvidados en las regiones vinícolas de Aguascalientes y Coahuila-Durango, y fueron atribuidas al hongo *E. lata*, el principal agente al cual se le atribuía el decline de las plantas de vid en aquella época, no solo en México, sino en todo el mundo (Úrbez-Torres et al., 2008). Diez años después, en la región de Hermosillo-Sonora, se encontraron hongos del género *Botryosphaeria* afectando variedades de uva de mesa. En el 2008, Úrbez-Torres y colaboradores detectaron la presencia de *L. theobromae* y *D. seriata* en las regiones vitícolas de Baja California y Sonora. Candolfi-Arballo (2009) realizó muestreos en el área de Ensenada, Baja California, incluyendo las zonas vitícolas de San Vicente, Santo Tomas y el Valle de Guadalupe, y reportó especies de distintos géneros de la familia Botryosphaereacea, que no habían sido registradas previamente en la región, como *D. corticola*, *Neofusicoccum australe* y *N. vitifusiforme*.

2.7.4. Estimulación del sistema de defensa de la planta

La inducción del sistema de defensa de las plantas es una serie de eventos fisicoquímicos que ocurren en la mayoría de las plantas como respuesta a diferentes estímulos, como ataques por microorganismos patógenos, presencia de rizobacterias, daño físico por insectos o por la presencia de inductores químicos (Harman et al., 2004). La inducción de resistencia en plantas por *Trichoderma* sp fue reportada por primera vez en 1997 por Bigirimana, quién demostró que al inocular plantas de frijol con una cepa de *T. harzianum*, las hojas de la planta fueron más resistentes a enfermedades posteriores causadas por *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum*, aun cuando *T. harzianum* sólo fue inoculado en la raíz. La capacidad para inducir resistencia a un rango de enfermedades, en una variedad de plantas, parece ser un rasgo común del género *Trichoderma* (Harman et al., 2004).

El trabajo realizado por Yedidia y colaboradores (1999), demostró como al inocular plantas con *T. harzianum*, se iniciaron respuestas de defensa en las plantas tratadas. Las respuestas fueron evidentes como un incremento de la actividad de las peroxidasas (asociada a compuestos antifúngicos muy tóxicos), en la estimulación de actividad de quitinasas y β -1,3 glucanasas, así como en la acumulación de depósitos ricos en calosa en las superficies internas de la pared celular. Esto evita que hongos patógenos penetren los tejidos vasculares de la planta (Yedidia et al., 1999).

Se conocen tres clases de compuestos sintetizados por cepas de *Trichoderma* sp. que inducen resistencia a enfermedades en plantas: proteínas con actividad enzimática, las cuales pueden inducir la biosíntesis de fitoalexinas y la actividad de la peroxidasa; homólogos de proteínas sintetizadas por genes de avirulencia (AVG homólogos), las cuales inducen reacciones hipersensibles de defensa en la planta; y oligosacáridos y moléculas de bajo peso molecular, que funcionan como moléculas inductoras, activando la cascada de genes antagónicos de *Trichoderma*. Estos compuestos provocan cambios metabólicos en plantas, incrementando su resistencia contra un amplio espectro de virus y microorganismos patógenos (Harman et al., 2004).

Es claro que en el sistema *Trichoderma* - planta interactúan diferentes moléculas que finalmente protegen a la planta contra organismos patógenos. Cuando las esporas o algunas estructuras propagativas de *Trichoderma* germinan cerca de la raíz de las plantas, expresan algunas moléculas inductoras como proteínas y compuestos de bajo peso molecular, que inducen la expresión de genes relacionados con la defensa en las plantas; aunque este proceso es transitorio, potencia la expresión de dichas proteínas al momento de la infección por un agente patógeno, aun en sitios lejanos a la ubicación de *Trichoderma* sp.

2.7.5. Estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal

Desde hace algunas décadas se reconoce que algunas rizobacterias y hongos no patógenos colonizadores de raíz, inducen el crecimiento de plantas. Diferentes estudios han demostrado que la presencia de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en la rizósfera,

mejoran el crecimiento y productividad de plantas como maíz, tomate, lechuga y pimiento; esto se debe a un aumento en el crecimiento y desarrollo de raíces y partes aéreas de la planta (Howell et al., 2003; Harman et al., 2004). Además de mejorar el crecimiento, la presencia de *Trichoderma* sp. parece contribuir mediante la reducción de la micro flora patógena en la rizosfera y la inactivación de compuestos tóxicos en la zona (Harman et al., 2004; Vinale et al., 2008). Trabajos por Yedidia y colaboradores (2001), demostraron que, al inocular plantas de pepino con *T. harzianum*, la longitud de las raíces y brotes aumentaron un 45%, y 60% respectivamente, así como los pesos secos en 24% y 40%. Además se reportó un incremento del área foliar y del contenido de clorofila, comparados con los controles (Yedidia et al., 2001).

Algunos micronutrientes son esenciales para funciones fisiológicas, pues forman parte de complejos enzimáticos, son parte estructural y funcional de proteínas y funcionan como cofactores de procesos metabólicos (Vittone, 2008). *Trichoderma* spp aumenta la capacidad de tomar micronutrientes y la eficiencia en el uso del nitrógeno en las plantas (Harman et al., 2004). Mediante procesos de reducción, quelación y producción de sideróforos, es capaz de solubilizar nutrientes del suelo, que se encuentran en formas no disponibles para las plantas, como fosfato de rocas, Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{4+} y Zn^0 , contribuyendo a un mejor crecimiento (Howell, 2003; Hoyos-Carbajal et al., 2009; Harman et al, 2004).

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular, producto primario de enzimas sintetasas no ribosomales; presentan gran afinidad al hierro y son considerados como el sistema más exitoso para la obtención de hierro de los microorganismos. Se conocen

alrededor de 150 estructuras distintas, destacando los ferrocromos, coprogenos y fusarininas (Vittone, 2008). Se conocen sideróforos intracelulares y extracelulares; los primeros funcionan como almacén del hierro dentro de las células de los hongos; los extracelulares son secretados al medio, generalmente en condiciones pobres de hierro, donde lo capturan mediante quelación, lo que contribuye a la agresividad para colonizar las raíces de las plantas, evitando la posible colonización por organismos patógenos (Pal Y Gardener., 2006; Vittone, 2008).

Adicionalmente, Hoyos-Carbajal reportó la producción de metabolitos con actividad hormonal. En su estudio encontró que 59 cepas de *Trichoderma spp*, produjeron ácido indol-3-acético (IIA) y compuestos análogos; estas moléculas son compuestos fitohormonales del tipo auxinas, que influyen directamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Hoyos-Carbajal, et al 2009).

2.8. Uso de *Trichoderma* en el control de *Botryosphaeria sp.*

Desde la década de los ochenta, se han utilizado diferentes cepas *Trichoderma spp* en ensayos para el control de patógenos obteniéndose resultados exitosos. Se ha reportado que estas especies son capaces de controlar el desarrollo de hongos causantes de enfermedades de la madera, como *Botryosphaeria* y *Phaemoniella chlamydospora* (Abada, 1994; Highley, 1997; Kexiang et al., 2002; John et al., 2005; Di Marco y Osti., 2007).

En el 2006, Fourie y Halleen demostraron los efectos benéficos de un producto comercial elaborado a base de *T. harzianum*. Al aplicar el producto a material de propagación,

lograron reducir en gran medida, la incidencia de los patógenos. Hallen y colaboradores (2010) demostraron que la aplicación de los productos comerciales Eco77®, Vinevax® y Trichoseal-Spray® elaborados a base de cepas de *Trichoderma spp*, fueron efectivos en reducir la incidencia natural de patógenos de vid como *Botryosphaeria spp*. En campo, Kotze et al., (2011) aplicaron distintas cepas de *Trichoderma spp* sobre heridas de poda en vid, encontrando que una cepa nativa del sitio de estudio, identificada como *T. harzianum* disminuyó significativamente la incidencia de hongos como *L. theobromae*, *Neofusicocum australe*, *N. parvum*, *D. seriata*, *E. lata* y *P. chlamydospora* (Kotze et al., 2011).

Plata-Caudillo (2010) utilizó cepas nativas de *Trichoderma spp*. del área vitícola de Ensenada B.C., para evaluar sus efectos antagónicos sobre hongos patógenos de la vid, tales como *Botryosphaeria spp*. En el ensayo, todos los aislados nativos de *Trichoderma spp*. presentaron efectos inhibitorios sobre las especies *D. corticola*, *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme* y *L. theobromae* en mayor o menor grado. Nieblas-Núñez (2012), reportó el efecto antagónico de cepas de *Trichoderma spp*. de la misma zona, contra tres aislamientos de *L. theobromae*, además realizó ensayos en invernadero para evaluar su efecto en combinación con *Glomus intraradices*, encontrando efectos sinérgicos en el control de *L. theobromae* en plantas de vid. Asimismo, reportó que es eficaz utilizar fungicidas como el tiofanato de metilo en conjunto con algunas cepas de *Trichoderma spp*., por la capacidad de *Trichoderma* para tolerar niveles de éstos fungicidas, que para el hongo fitopatógeno *L. theobromae* resultaron inhibitorias; de ésta manera sugiere un posible manejo integrado de enfermedades causadas por *L. theobromae*. Serrano-Gómez, (2014) evaluó el ingrediente activo Azoxistrobin, utilizado para controlar cenicilla (*Uncinula necátor*) en vid, manejando

la dosis mínima recomendada, demostrando un retraso en el crecimiento micelial de los antagonistas *T. harzianum* y *T. gamsii*, mas no su inhibición total, proponiendo un posible esquema de manejo integrado de enfermedades a base del fungicida y agentes antagonistas. De acuerdo con estos reportes, es posible utilizar cepas nativas de las mismas regiones donde se aplicarán, pues las cepas están adaptadas evolutivamente a las condiciones climáticas y ya se ha comprobado su efectividad como importantes agentes biocontroladores.

III. Hipótesis

Las cepas de *Trichoderma spp.* nativas de la región de Ensenada B.C tienen un amplio espectro antagónico contra miembros fitopatógenos de la familia *Botryosphaeriaceae*.

3.1. Objetivos

3.1.1. Objetivo general

Evaluar el efecto *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma spp.* en el control de hongos patógenos de la familia *Botryosphaeriaceae*.

3.1.2. Objetivos particulares

1. Evaluar el porcentaje de inhibición de la cepa de *Trichoderma harzianum* T3, *Trichoderma gamsii* T5 y *T. gamsii* T6 hacia *L. theobromae*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *N. australe*, *N. luteum*, *N. vitifusiforme*, *Diplodia mutila* y *D. seriata*.

2. Evaluar cualitativamente la producción de sideróforos de las cepas antagonistas de *T. harzianum* T3) y *T. gamsii* (T5 y T6).
3. Evaluar cualitativamente la capacidad de las cepas antagonistas de *Trichoderma harzianum* T3, *Trichoderma gamsii* T5 y *T. gamsii* T6 de producir enzimas quitinolíticas.

IV. Metodología

4.1 Cepas utilizadas en este estudio

Se usaron tres cepas nativas de *Trichoderma*: *T. harzianum* T3, *T. gamsii* T5 y *T. gamsii* T6. Las cepas de los patógenos de la familia Botryosphaeriaceae usadas fueron: *L. theobromae*, *B. dothidea*, *N. parvum*, *N. australe*, *N. luteum*, *N. vitifusiforme* y *Diplodia seriata* (Tabla 2). Las cepas de *Trichoderma* utilizadas, son aislamientos nativos de Baja California. Las cepas patógenas aisladas de California fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Douglas Gubler de la Universidad de California, Davis. Todas forman parte del cepario del laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Todas las cepas se reactivaron en medio de agar papa dextrosa (PDA Difco®) a 28°C, en oscuridad por 3 días.

4.2. Ensayos de inhibición

Para los ensayos de inhibición, se realizaron cultivos duales entre el agente antagonista (*Trichoderma* spp.) y las cepas patógenas, utilizando cajas de Petri de plástico de 85 mm de diámetro, en medio PDA (Difco®). Con un sacabocados estéril se obtuvieron discos miceliales de 5mm de diámetro del borde de cultivos crecidos por 3 días. El inóculo de *Trichoderma* sp. se colocó en el borde de la caja Petri, y el patógeno se colocó en el extremo contrario como se muestra en la Figura 3. Se realizaron 3 réplicas de cada combinación *Trichoderma* – patógeno y como controles positivos se sembraron 3 réplicas de cada

patógeno sin el agente antagonista. Además se cultivó un control positivo del agente antagonista. Todos los ensayos se incubaron en oscuridad a 28°C por 7 días.

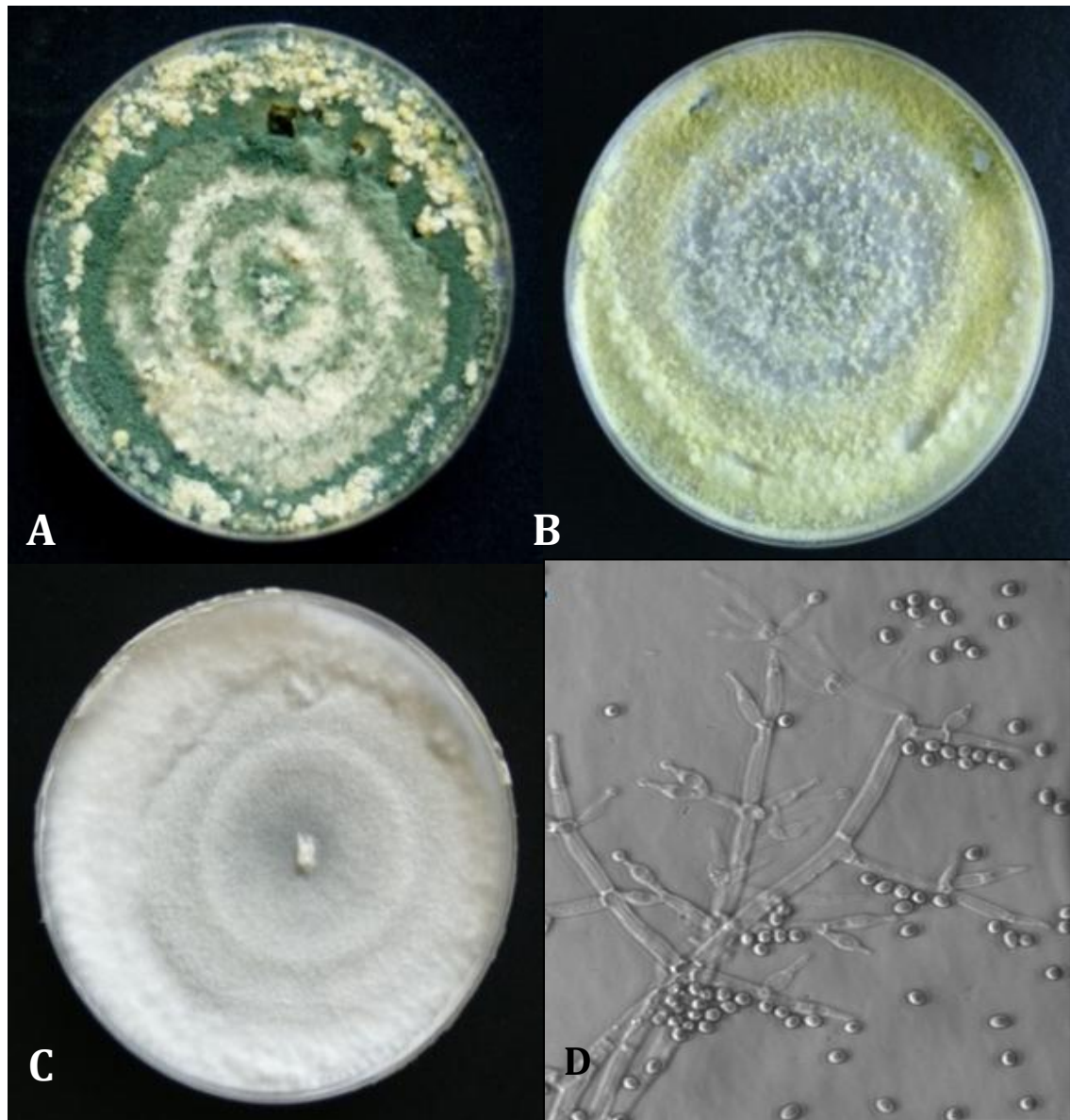


Figura 3. Cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas en los ensayos duales de inhibición. A. *T. harzianum*. B. *T. gamsii* cepa T5. C. *T. gamsii* cepa T6. D. Hifas, conidióforos y esporas de *Trichoderma harzianum*.

Tabla II. Cepas de hongos patógenos de la familia Botryosphaeriaceae utilizadas en los ensayos duales.

ID	Especie	Sitio de colecta
UCD256Ma	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Madera,CA
UCD181Md	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Merced,CA
MXL28	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Ensenada B.C
UCD1064So	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Sonoma,CA
UCD1556Me	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Mendocino,CA
UCD2324Mar	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Marin,CA
UCD1125Na	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Napa,CA
UCD646So	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Sonoma,CA
UCD1314So	<i>Neofusicoccum australe</i>	Sonoma,CA
UCD1467So	<i>Neofusicoccum australe</i>	Sonoma,CA
UCD1469So	<i>Neofusicoccum australe</i>	Sonoma,CA
UCD1965SB	<i>Diplodia mutila</i>	Santa Barbara,CA
UCD2888Ma	<i>Diplodia mutila</i>	Madera,CA
UCD1953 SB	<i>Diplodia mutila</i>	Santa Barbara,CA
UCD2098 Te	<i>Neofusicoccum luteum</i>	Temecula,CA
UCD2057 Te	<i>Neofusicoccum luteum</i>	Temecula,CA
MXBY06	<i>Diplodia seriata</i>	Ensenada B.C
MXSACH19-3	<i>Diplodia seriata</i>	Ensenada B.C
MXSACH23	<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	Ensenada B.C
MXSACH24	<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	Ensenada B.C
MXSACH12-3	<i>Diplodia corticola</i>	Ensenada B.C

Después del periodo de incubación se determinó el porcentaje de inhibición mediante el uso de la ecuación propuesta por Royse Y Ries (1978):

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

Dónde:

r_1 , es la distancia mayor alcanzada por el patógeno (mm), después de siete días de la inoculación.

r_2 , es la distancia menor alcanzada por el patógeno (mm), después de siete días de la inoculación.

En la Figura 3 se indica cómo se determinó la distancia mayor y menor alcanzada por el patógeno

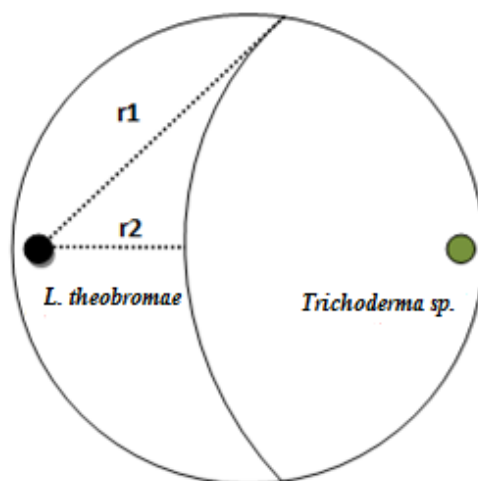


Figura 4. Diagrama que muestra cómo se realizaron los ensayos de inhibición de los hongos patógenos por *Trichoderma* sp. y se determinó de la distancia mayor (r_1) y la distancia menor (r_2) alcanzada por el patógeno en un cultivo dual con *Trichoderma* sp. para aplicar la fórmula de Royse Y Ries (1978).

4.3. Detección de actividad quitinasa en placa

La quitina coloidal se preparó a partir de hojuelas de quitina (Sigma®) por el método de Roberts y Selitrennikoff (1988). Las hojuelas de quitina se sometieron a un proceso de hidrólisis ácida; la quitina se recuperó mediante una filtración, y se resuspendió en Etanol al 95%, y lavó con agua destilada estéril para su uso.

El medio de cultivo para las placas se preparó siguiendo el protocolo que desarrolló Agrawal Y Kotasthane, (2012), utilizando 4.5 g de quitina, 2 g fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Fisher®), 3 g de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4) \text{SO}_4$ Fisher®), 0.3 g de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Sigma®), 1 g de ácido cítrico, 15 g de agar Difco®, 0.15 g de púrpura de bromocresol (Sigma®); ajustado a un pH de 4.7. Se esterilizó a 121 °C por 15 minutos y se vertió en condiciones asépticas en placas de 65 mm. Posteriormente se colocó en el centro de la caja un disco micelial de una de las cepas de *Trichoderma* sp. con 4 días de crecimiento, y se incubaron a 28 °C por 5 días en oscuridad. Las cepas que cambiaron el color del medio de amarillo a rosa-violeta fueron consideradas como positivas para la actividad de quitinasa.

4.4. Detección de producción de sideróforos mediante el método CAS en placa

Para evaluar la capacidad de las cepas antagonistas de *T. harzianum* T3, *T. gamsii* T5 y *T. gamsii* T6 de producir compuestos quelantes de hierro del tipo sideróforos en medio sólido, se utilizó el ensayo universal CAS en placa (Schwyn y Neilands 1987). El medio Cromo azulol S se vació en condiciones asépticas en cajas Petri de 65mm. Las placas se inocularon con un disco micelial de 4mm de tres días en el centro de la placa. El desarrollo de un halo color naranja – rosado alrededor del crecimiento fue considerado como positivo para producción de sideróforos.

4.5. Análisis microscópico de las interacciones entre *Trichoderma* spp. y

Botryosphaeriaceae

Para observar las interacciones a nivel microscópico se realizaron cultivos duales en medio agar al 1.5 % en agua, expuestos a las mismas condiciones del ensayo de competencia. Después del periodo de incubación, se realizaron cortes rectangulares en la zona donde los bordes de ambas colonias interactuaban. Con éstos cortes se elaboraron preparaciones temporales usando la técnica de bloque invertido. Esta técnica requiere montar el corte de manera que la colonia este en contacto con el portaobjetos, pues se utiliza un microscopio invertido. Las preparaciones se observaron en un microscopio invertido modelo Axiovert 200 (Zeiss®) con las técnicas de campo claro y contraste de fases. Las micrografías de las interacciones fueron tomadas con la cámara AxioCam (Carl Zeiss®) y se procesaron usando el software Axiovision versión 4.8 (Zeiss®). Adicionalmente se utilizó el colorante vital Fluorescein-Y, el cual tiñe el citoplasma, con el objetivo de comparar entre hifas vivas y muertas en el ensayo de inhibición.

4.6. Análisis estadísticos

Las diferencias entre el efecto de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre el porcentaje de inhibición de las cepas patógenas fueron analizadas mediante un ANOVA de una vía. Las diferencias se analizaron posteriormente mediante una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico STATISTICA 7 (Stat Soft®).

V. Resultados

5.1. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma harzianum* T3

Los análisis estadísticos revelaron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de los patógenos por la cepa antagonista de *T. harzianum*. Los resultados obtenidos en los ensayos duales entre las cepas de *Trichoderma* y las cepas patógenas de la familia *Botryosphaeriaceae* se pueden observar en la Tabla 3. Los valores representan la media de tres réplicas. Todas las cepas de los patógenos fueron afectadas significativamente por *T. harzianum* T3. El mayor porcentaje de inhibición se observó para *B. dothidae* UCD1064So, con 73.1 %. El patógeno menos inhibido fue *D. seriata* MXSACH19 con 29.9%. La cepa *D. mutila* UCD2888Ma y la cepa *D. seriata* MXBY06 fueron inhibidas totalmente (Tabla 3). En la Figura 5 se observa un ejemplo de un ensayo dual con la cepa *T. harzianum* T3.

5.2. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma gamsii* T5

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento por efecto de la cepa antagonista *T. gamsii* T5. Los porcentajes de inhibición del crecimiento de los patógenos ejercidos por la cepa se pueden observar en la Tabla 3. Las cepas patógena más afectadas fueron *D. mutila* UCD2888Ma y UCD1556Me con 100 y 96.2%, respectivamente. Las cepas menos afectadas fueron *N. australe* UCD1469So y UCD1314So, seguidas de *N. parvum* UCD646So y *D. seriata* MXSACH19-3. En la Figura 6 se observa un ejemplo de un ensayo dual con la cepa *T. gamsii* T5.

Tabla III. Porcentaje de inhibición promedio de tres réplicas de ante los antagonistas *Trichoderma harzianum* T3, *Trichoderma gamsii* T5 y *Trichoderma gamsii* T6. Los asteriscos indican inhibición total por los agentes antagonistas.

Patógeno	Cepa	Porcentaje promedio de inhibición <i>Trichoderma</i> spp.		
		T3	T5	T6
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	UCD256Ma	37.1 (f-k)	31.7 (f-k)	43.8(e-k)
<i>L. theobromae</i>	UCD181Md	37.7 (f-k)	28.7 (g-k)	40.0 (f-k)
<i>L. theobromae</i>	MXL28	41.6 (e-k)	28.9 (f-k)	48.7 (e-i)
<i>Botryosphaeria dothidae</i>	UCD1064So	73.1 (a-e)	61.8 (b-f)	100
<i>B. dothidae</i>	UCD1556Me	44.9(e-k)	47.0 (e-j)	82.4 (a-d)
<i>B. dothidae</i>	UCD2324Mar	47.5 (e-i)	60.8 (b-g)	90.7 (a-b)
<i>Neofusicoccum parvum</i>	UCD1125Na	35.4 (f-k)	35.3 (f-k)	32.6 (f-k)
<i>N. parvum</i>	UCD646So	30.9 (f-k)	26.2 (h-k)	32.9 (f-k)
<i>Neofusicoccum australe</i>	UCD1314So	46.6 (e-j)	17.8 (i-k)	29.7 (f-k)
<i>N. australe</i>	UCD1467So	37.2 (f-k)	42.6 (e-k)	41.3 (e-k)
<i>N. australe</i>	UCD1469So	42.6 (e-k)	14.2 (j, k)	13.1(k)
<i>Diplodia mutila</i>	UCD2888Ma	100	100	100
<i>D. mutila</i>	UCD1556Me	84.4 (a-c)	96.2	90.0 (a-b)
<i>D. mutila</i>	UCD1953SB	35.4 (f-k)	53.0 (c-h)	50.2 (d-i)
<i>Neofusicoccum luteum</i>	UCD2098Te	42.3 (e-k)	37.4 (f-k)	38.0 (f-k)
<i>N. luteum</i>	UCD2057Te	39.8 (f-k)	36.3 (f-k)	23.3(h-k)
<i>Diplodia seriata</i>	MXBY06	100	34.8 (f-k)	34.4 (f-k)
<i>D. seriata</i>	MXSACH19-3	29.9 (f-k)	26.9 (h-k)	36.6 (f-k)
<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	MXSACH23	39.4 (f-k)	45.1 (e-k)	39.0 (f-k)
<i>N. vitifusiforme</i>	MXSACH24	36.3 (f-k)	36.6 (f-k)	34.6 (f-k)
<i>Diplodia corticola</i>	MXSACH12-3	31.3 (f-k)	45.1 (e-k)	36.6 (f-k)

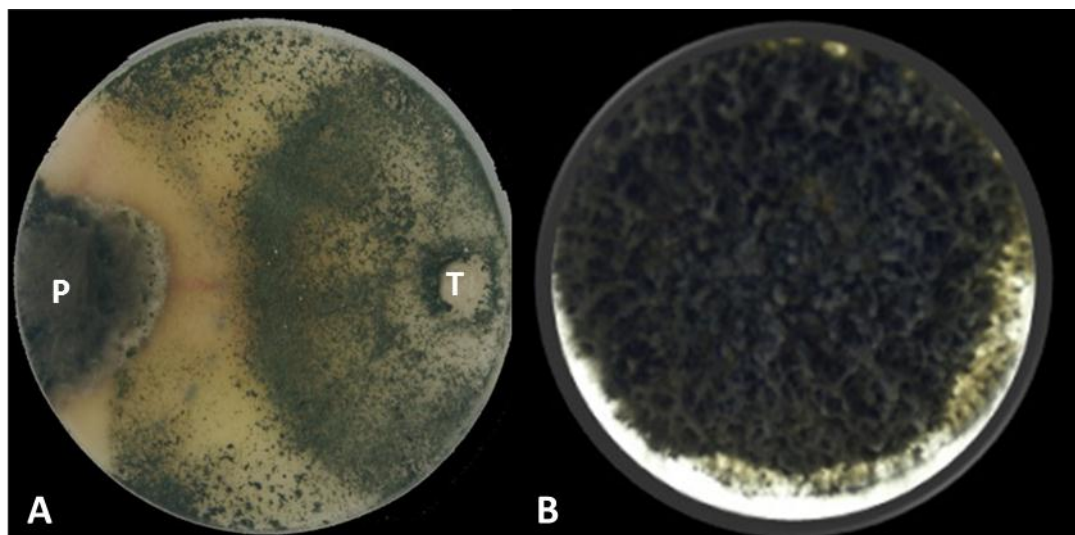


Figura 5. A) Crecimiento detenido del patógeno *N. australe* por *T. harzianum*, y B) Control de *N. australe* crecido en ausencia de *Trichoderma*. La letra P indica el sitio de inoculación del patógeno y T el sitio de *Trichoderma*

5.2. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma gamsii* T5

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento por efecto de la cepa antagonista *T. gamsii* T5. Los porcentajes de inhibición del crecimiento de los patógenos ejercidos por la cepa se pueden observar en la Tabla 3. Las cepas patógena más afectadas fueron *D. mutila* UCD288Ma y UCD1556Me con 100 y 96.2%, respectivamente. Las cepas menos afectadas fueron *N. australe* UCD1469So y UCD1314So, seguidas de *N. parvum* UCD646So y *D. seriata* MXSACH19-3. En la Figura 6 se observa un ejemplo de un ensayo dual con la cepa *T. gamsii* T5.

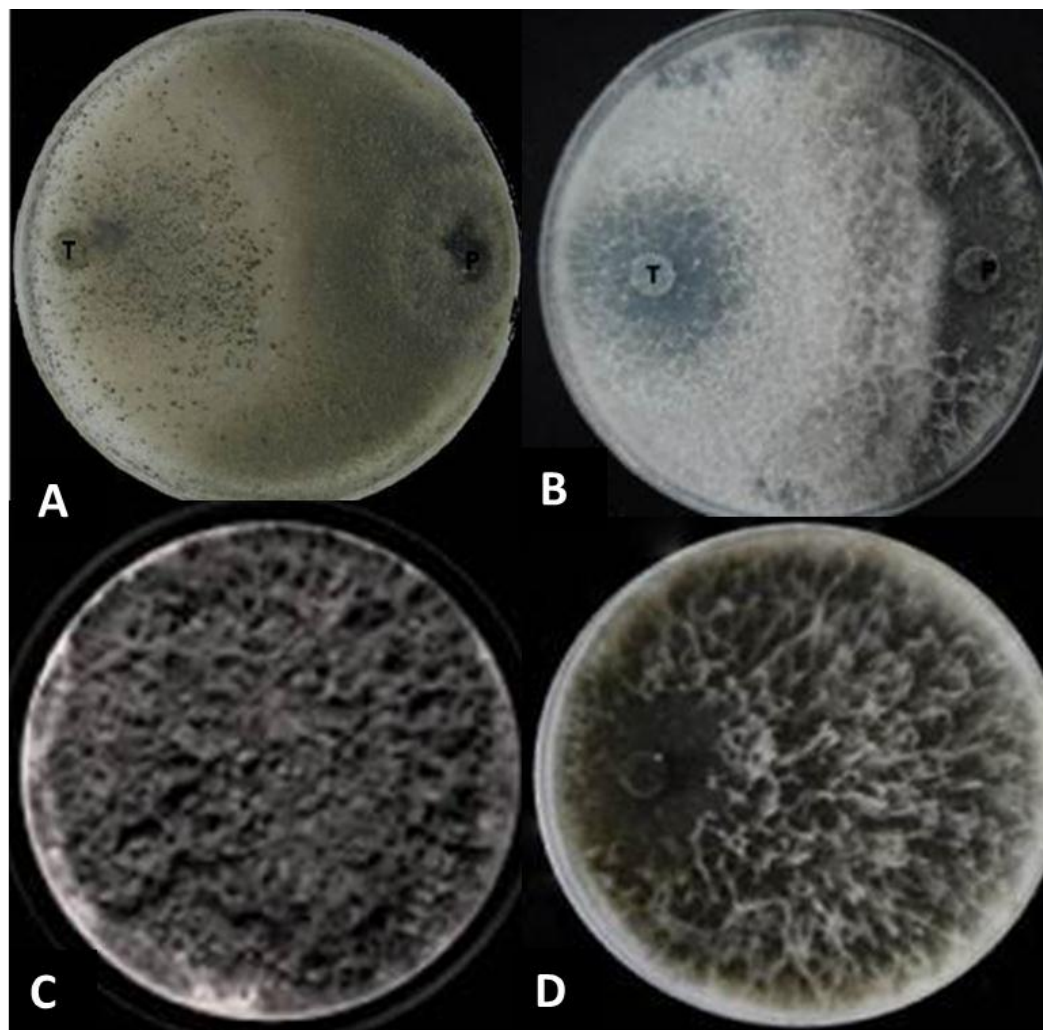


Figura 6. Interacción macroscópica observada en medio PDA. A) Sobre crecimiento de *T. gamsii* T5 sobre *N. australe*. B) Inhibición de crecimiento del patógeno *N. luteum*, por *T. gamsii* T5. C) Control *N. australe*, D. Control de *N. luteum*. La letra P indica el sitio de inoculación del patógeno y T el sitio de *Trichoderma*.

5.3. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma gamsii* T6

La cepa de *T. gamsii* T6 inhibió el crecimiento de los patógenos de manera exitosa sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de inhibición en el crecimiento de los patógenos (Tabla 3). Las tres cepas de *B. dothidea* UCD1556Me y UCD2324Mar y UCD1064So mostraron los mayores porcentajes de inhibición, junto a la la cepa *D. mutila* UCD1556Me (Tabla 3). El aislado de *N. australe* UCD1469So sólo fue inhibido en un 13.1%, similar a la inhibición obtenida por la cepa T5. En la Figura 7 se observa un ejemplo de un ensayo dual con la cepa *T. gamsii* T6.

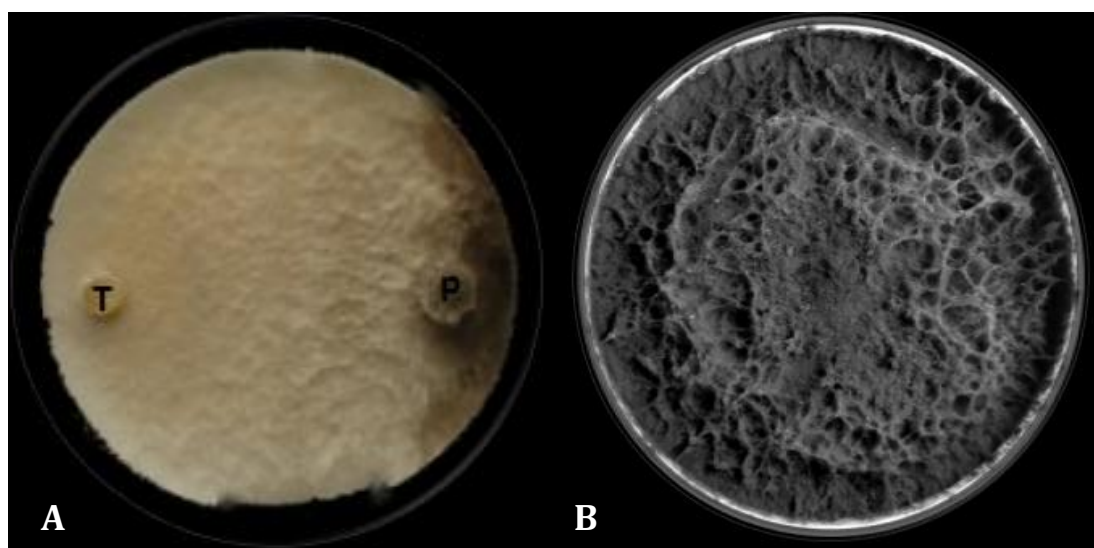


Figura 7. Inhibición del crecimiento de *B. dothidea* por *T. gamsii* T6. A. Crecimiento de *T. gamsii* T6 sobre el micelio del patógeno *N. australe*. B. Control de *B. dothidea*. La letra P indica el sitio donde se inoculó el patógeno y T el sitio de *Trichoderma*.

5.4. Detección actividad quitinolítica y producción de sideróforos por *Trichoderma* sp.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4. En el ensayo de actividad quitinolítica las tres cepas evaluadas (*T. harzianum* T3 y *T. gamsii* T5 y *T. gamsii* T6) tornaron el color el medio de cultivo suplementado con quitina, evidenciando la producción de enzimas quitinolíticas (Figura 8).

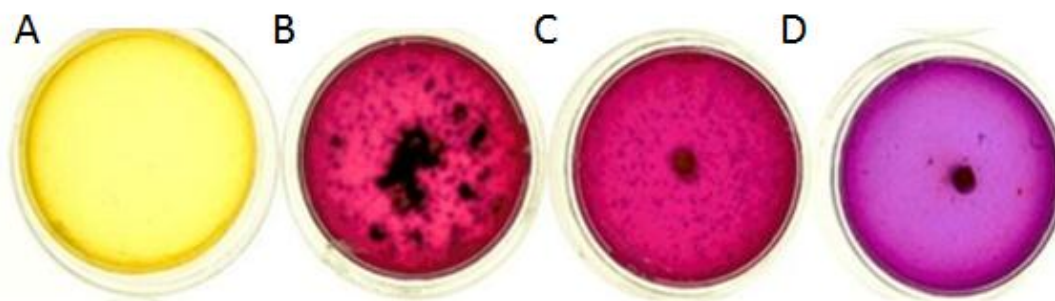


Figura 8. Ensayo cualitativo para evidenciar la actividad quitinolítica de las cepas antagónicas. A. Control, B. *T. harzianum*, C. *T. gamsii* T5, D. *T. gamsii* T6. El cambio en la coloración de amarillo a morado-purpura fue considerado como positivo para el ensayo. A la derecha se muestran réplicas de cada tratamiento.

En cuanto a la producción de sideróforos, el aislado T3 de *T. harzianum* se detectó como positivo al desarrollar un cambio de color en torno a la colonia de azul a rosa. Las cepas de *T. gamsii* no provocaron cambios en el medio de cultivo (Figura 9).

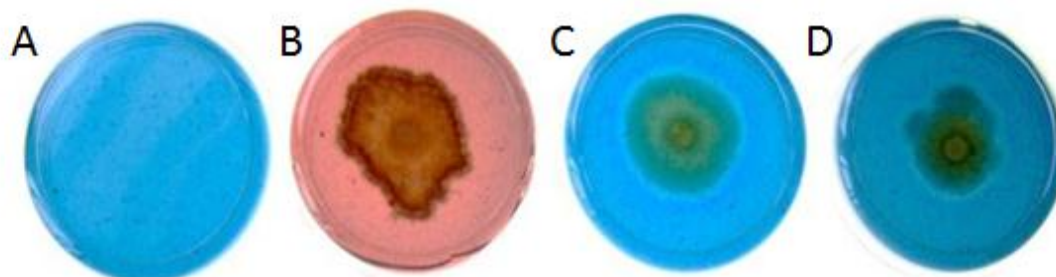


Figura 9. Ensayo en placa con medio CAS para evaluar la capacidad de producción de sideróforos de las cepas antagonicas. A. Control, B. *T. harzianum*, C. *T. gamsii* T5, D. *T. gamsii* T6. El aislado *T. harzianum* T3 se detectó como positivo para la producción de sideróforos. El desarrollo de un cambio de color en torno a la colonia indica que el hongo utiliza el Fe del complejo colorante CAS-Fe, provocando un cambio en la coloración en el medio de azul a rosa.

Tabla IV. Eficacia de las cepas de *Trichoderma* spp. en la producción de sideróforos en medio CAS y en la capacidad de producir enzimas con actividad quitinolítica.

	PRODUCCIÓN SIDERÓFOROS	ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA
<i>T. harzianum</i> T3	+	+
<i>T. gamsii</i> T5	-	+
<i>T. gamsii</i> T6	-	+

- Sin reacción
+ Reacción positiva

5.5. Microscopia de las interacciones entre las cepas antagonicas de *Trichoderma* y las cepas patógenas de la familia Botryosphaeriaceae

Las principales interacciones entre las cepas antagonicas *T. harzianum*, *T. gamsii* cepa T5 y *T. gamsii* cepa T6 y los aislados patógenos de *L. teobromae* UCD 256 y MXL-28 fueron: daño en el micelio del patógeno, parasitismo, deformación (7-A y B), hinchazón (7-C y D) ruptura y lisis de paredes celulares (7-F y E). El colorante vital Fluorescein Y. sirvió para afirmar que las hifas de *Trichoderma* permanecen vivas mientras que las del patógeno están muertas (Figura 8).

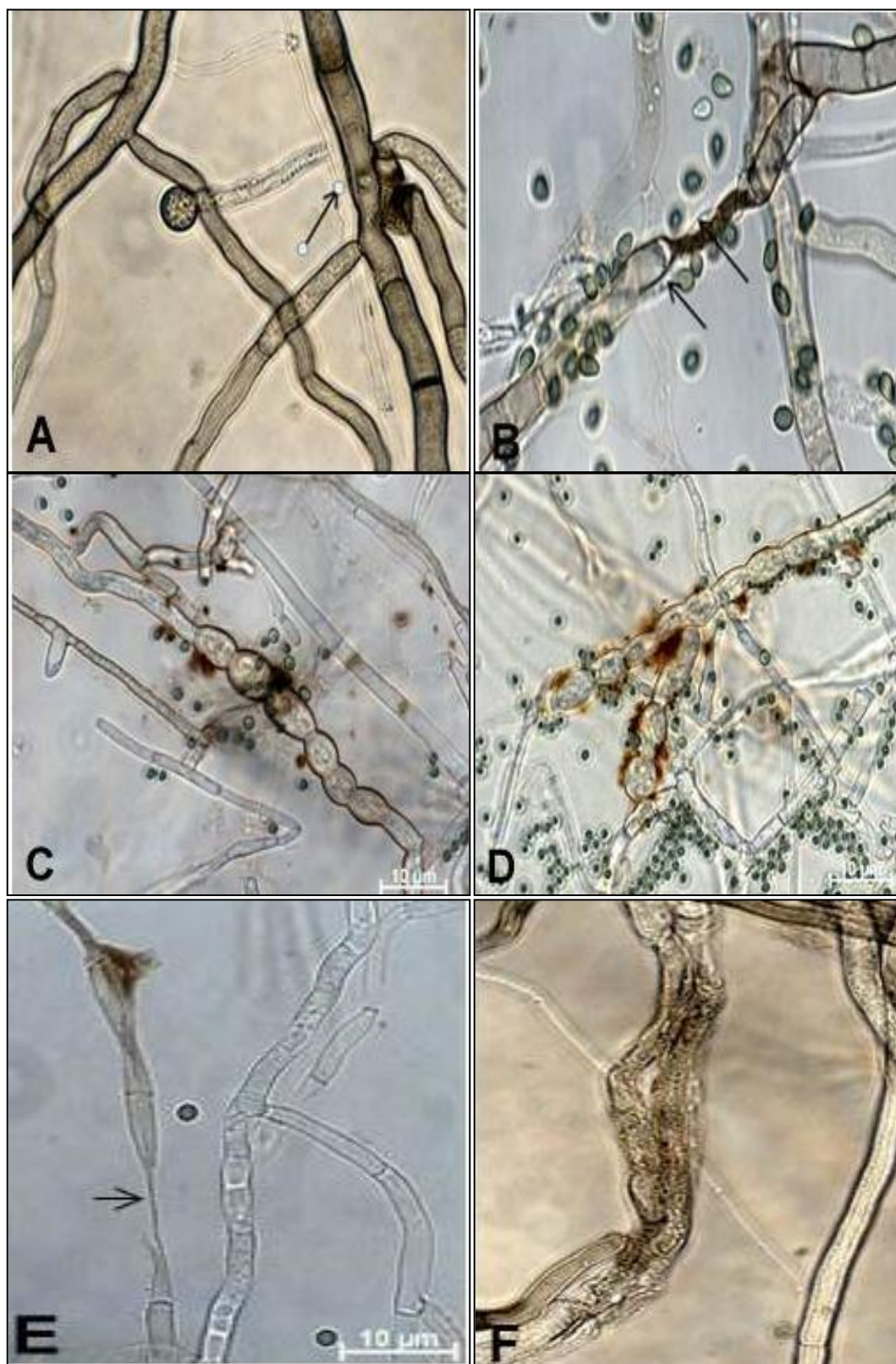


Figura 10. Micrografías (100x) mostrando las interacciones entre *Trichoderma* spp. y la cepas UCD256Ma y MXL-28 de *L. theobromae*. (A) Hifas de *T. gamsii* T5 (flecha) adheridas a hifas de *L. theobromae* UCD256Ma. (B) Hifa de *T. gamsii* enrollándose sobre el patógeno *L. theobromae* USD256Ma. (C y D) Hinchazón de las hifas de *L. theobromae* MXL-28 por *T. harzianum*. (E y F) Desintegración y lisis de pared celular de *L. theobromae* USD256Ma (página anterior).



Figura 11. Interacción temprana (4 días) entre *T. harzianum* y *L. theobromae* MXL-28 teñida con el colorante vital Fluorescein Y; las hifas tenidas son las hifas vivas, pues el colorante tiene afinidad al citoplasma; las hifas que no retuvieron el colorante se consideraron muertas.

VI. Discusión

En el presente estudio, las tres cepas de *Trichoderma* spp. presentaron antagonismo ante las 23 cepas de la familia *Botryosphaeriaceae* analizadas. En todas las cepas patógenas, el desarrollo micelial, y el tamaño de las colonias se vio afectado, comparado con los controles. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el efecto de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre las cepas patógenas. Estas diferencias en el grado de inhibición que provocan, puede explicarse por el hecho de que cada especie de *Trichoderma* sp. presenta diferentes mecanismos antagónicos, incluyendo la producción de diferentes enzimas hidrolíticas, como quitinasas y glucanasas; los niveles de estas enzimas varían a causa de distintos factores, como la especie o cepa, el sustrato, el tiempo de incubación y la temperatura (Vinale et al., 2008; Morath et al., 2012). Cada especie de *Trichoderma* spp. produce ó secreta moléculas características; de ahí que existan productos comerciales para combatir hongos en épocas de poda elaborados a base de diferentes especies y cepas de *Trichoderma* spp. Esta misma característica se reflejó en los ensayos duales de inhibición, donde la misma cepa patógena fue inhibida en diferentes proporciones por las cepas antagónicas, como el caso de las tres cepas de *B. dothidae*, altamente inhibidas por *T. gamsii* T6, pero no por *T. gamsii* T5, aun cuando son la misma especie. Se ha visto anteriormente que mutantes de las mismas cepas, exhiben diferentes mecanismos de biocontrol (Harman, 2000). *Trichoderma* sp. presenta una gran plasticidad, con la capacidad de adaptarse a la pérdida de un mecanismo, mediante la activación de otros genes (Harman, 2004). Estas distintas estrategias de las cepas antagonistas les permiten ser efectivas ante un amplio rango de agentes patógenos como *Fusarium oxysporum*, *F. roseum*,

Botrytis cinérea, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia* sp, *Pythium* sp, *Alternaria* sp, *Phytophthora* sp, *Gossypium hirsutum*, entre otros (Zimand et al., 1993; Howell et al., 1997; Infante et al., 2009; Hoitink et al., 2005).

Las cepas de *Trichoderma* tienen la capacidad de sintetizar un amplio número de moléculas con actividad antagónica, incluyendo diversas enzimas hidrolíticas, capaces de lisar las paredes celulares de ascomicetos y basidiomicetos durante el micoparasitismo (Vinale et al., 2008). Todas las cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas en este trabajo fueron detectadas como positivas en el ensayo de producción de quitinasas, hecho que conviene con lo reportado por Markovich Y Kononova (2012), confirmando que los representantes del genero *Trichoderma* sintetizan enzimas quitinolíticas. Este hecho se confirmó durante el análisis microscópico de las interacciones, donde se observó degradación y lisis de paredes celulares, presumiblemente por efecto de las enzimas producidas y excretadas por *Trichoderma*, reafirmando los resultados de otras investigaciones (Kotze, 2008; Plata-Caudillo, 2010; Nieblas-Núñez, 2012). El tipo de parasitismo observado en la cepa *T. harzianum* T3 coincide con lo reportado por Seema Y Devaki (2012), quienes reportan un enrollamiento de las hifas de *T. harzianum* sobre las hifas de un hongo patógeno, además de reportar células carentes de citoplasma, hecho que se confirmó mediante el uso de colorantes vitales; al utilizar fluoresceína Y, el cual presenta afinidad por el citoplasma, pudimos confirmar la presencia de hifas vivas, las cuales se observaron teñidas e hifas muertas, las cuales no retienen el colorante por falta de citoplasma, y se ven vacías, lo que indica de nuevo la presencia de enzimas degradando la pared celular del patógeno.

Una anomalía observada durante el ensayo dual, fue la hinchazón o inflamación del micelio de *L. theobromae* (Figura 7-C y D), la cual puede ser el resultado de la excreción de metabolitos secundarios por *Trichoderma* sp., mismos que cumplen un papel, pues actúan sinérgicamente con las (CWDE's) durante el parasitismo. Estos metabolitos son numerosos y han sido reportados en distintas investigaciones (Kotze, 2008; Harman, 2000, 2004; Vinale et al., 2008; Verma et al., 2007), sería interesante caracterizarlos en estas cepas.

Otros de los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. son la producción de compuestos volátiles y no volátiles (Verma et al., 2007). En la cepa *T. gamsii* T6 se registró un aroma a coco, característico de las cepas que producen compuestos volátiles del tipo 6-pentil alfa pirona, lo que concuerda con lo reportado por Stefanova et al. (1999), indicando la presencia de compuestos volátiles, lo que puede explicar las diferencias significativas en el porcentaje de inhibición comparándola con la cepa *T. gamsii* T5 y con *T. harzianum* T3, en donde no se detectaron los aromas. Benhamou Y Chet (1993) hablan sobre la necesidad del contacto físico para la secreción de enzimas y antibióticos sin embargo, en el presente ensayo se observó que la cepa T5 de *T. gamsii* provocó hinchazón y malformaciones en las hifas de *B. dothidae*, sin que *Trichoderma* sp presentara un sobrecrecimiento sobre la cepa patógena macroscópicamente, apoyando lo reportado por Kotze (2008) que propone la producción de compuestos volátiles y no volátiles como los agentes causales que inhiben el crecimiento y provocan daño en el micelio de las colonias patógenas. Kotze (2008) hace referencia a las zonas de inhibición que se forman durante los ensayos duales, las cuales son producidos por *Trichoderma* spp. el mismo fenómeno fue observado durante el presente ensayo, reafirmando la presencia de compuestos volátiles y no volátiles con efecto antagónico.

El hierro forma parte de diversos procesos esenciales para la supervivencia de los microorganismos. La producción de sideróforos representa una ventaja sobre otros microorganismos (Vittone, 2008). Uno de los mecanismos indirectos de biocontrol de *Trichoderma* sp, es privar a los patógenos del hierro, produciendo sideróforos, los cuales son secretados por las hifas en extensión. Mediante el ensayo en placa con el medio CAS, se detectó un cambio en la coloración del medio en la cepa *T. harzianum* T3, indicando que es capaz de tomar nutrientes del medio de cultivo, mediante la producción de moléculas quelantes de hierro conocidas como sideróforos. Esta condición de algunas cepas de *Trichoderma* spp. representa un valor adicional como agentes de control biológico, pues además de competir con agentes patógenos, son capaces de proveer una mejor nutrición de hierro a las plantas, pues las raíces son capaces de tomar los complejos férricos de los sideróforos y utilizarlos en suelos donde el hierro se encuentra en formas no asimilables (Srivastava et al., 2013).

Debido a que encontramos diferencias entre la capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp. se recomienda hacer uso combinado de las cepas antagónicas y aprovechar sus diferentes mecanismos de acción y control de patógenos.

VII. Conclusiones

Las tres cepas analizadas, *T. harzianum* T3, *T. gamsii* T5 y *T. gamsii* T6, presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de todas las cepas patógenas utilizadas en el ensayo dual, en menor o mayor grado. Se encontraron diferencias significativas en el efecto inhibitorio de *Trichoderma* spp. sobre las cepas patógenas.

El aislado T6 de *T. gamsii* fue la cepa antagonica que presentó el mayor efecto inhibitorio sobre los aislados de *B. dothidea* UCD1064So, UCD1556Me y UCD2324Mar y de *D. mutila* UCD2888Ma y UCD1516Me. La cepa *D. mutila* UCD2888Ma fue inhibida totalmente por las tres cepas de *Trichoderma*: *T. harzianum* T3, *T. gamsii* T5 y *T. gamsii* T6.

La cepa UCD1469So de *N. australe* fue la menos inhibida por los aislados T5 y T6 de *T. gamsii*, a diferencia de *T. harzianum*, que inhibió la misma cepa patógena en un 42.6%, lo que confirma que diferentes cepas de *Trichoderma* spp. presentan distintas estrategias de antagonismo.

Todas las cepas antagonistas de *Trichoderma* spp. sometidas al ensayo cualitativo de actividad quitinasa en medio sólido, mostraron actividad positiva.

Sólo el aislado T3 de *T. harzianum* presentó la capacidad de producir sideróforos en el ensayo en medio CAS en placa.

Todas las cepas antagonistas de *Trichoderma* spp. sometidas al ensayo cualitativo de actividad quitinasa en medio sólido, mostraron actividad positiva.

Sólo el aislado T3 de *T. harzianum* presentó la capacidad de producir sideróforos en el ensayo en medio CAS en placa.

RECOMENDACIONES:

En resumen, este estudio confirma las habilidades antagónicas *T. harzianum* T3 y *T. gamsii* T5 y *T. gamsii* T6. Debido a que se encontraron diferencias significativas en su efecto ($p < 0.05$), se recomienda el uso combinado de cepas antagónicas, con el objetivo de ampliar el espectro antagónico con los distintos mecanismos que cada especie expresa.

Es necesario seguir explorando los ecosistemas en busca de nuevas cepas antagónicas, e integrar enfoques moleculares, bioquímicos y ecológicos para poder desarrollar nuevas clases de fertilizantes y fungicidas aplicables de origen biológico. Las moléculas como antibióticos y metabolitos secundarios sintetizados por los hongos, pueden ser el enfoque de un futuro cercano, y debemos entender mejor como manipularlos y sus posibles sinergismos con otros compuestos para posibles usos en la agricultura.

VIII. Literatura citada

Abada, K. A. (1994). Fungi causing damping-off and root-rot on sugar-beet and their biological control with *Trichoderma harzianum*. Agriculture, ecosystems and environment 51 (3): 333-337.

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

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.

Amponsah N.T., E.E. Jones, H.J. Ridgway y M.V. Jaspers (2009). Rainwater dispersal of *Botryosphaeria* conidia from infected grapevines. New Zealand Plant Protection. 62: 228-233.

Bailey, B. A., H. Bae, M. D. Strem, J. Crozier, S. E. Thomas, G. J. Samuels, B. T. Vinyard, and K. A. Holmes. (2008) "Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. Biological Control 46 (1): 24-35.

Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., E. Aboumansour, A. Spagnolo, C. Clement, and F. Fontaine. (2013). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant pathology. 62 (2): 243-265.

Bouby L, Figueiral I, Bouchette A, Rovira N, Ivorra S, et al. (2013). Bioarchaeological Insights into the process of domestication of grapevine (*Vitis vinifera* L.) during Roman times in Southern France. PLoS ONE 8(5): e63195. doi:10.1371/journal.pone.0063195.

Candolfi Arballo, O. (2009). Caracterización de anamorfos de *Botryosphaeriaceae* asociados a deterioro progresivo en vid (*Vitis vinifera* L.) aislados de la región vitivinícola de Baja California. (Tesis de Maestría) Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Ensenada, México. pg 42-67

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

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

Edwards, J., Y Pascoe I. G. (2004). Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. Australasian Plant Pathology. 33 (2): 273-279.

Epstein L. Sukhwinder, K. Y Vander Gheynst, J. S., (2008). *Botryosphaeria*-related dieback and control investigated in noncoastal California grapevines. California Agriculture. 62 (4) 161-166.

Gubler, W. D., Rolshausen, P. E., Trouillas, F. P., Leavitt, G. M., Y Weber, E. A. (2005). Grapevine trunk diseases in California. Practical Winery and Vineyard magazine: 6-25.

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

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

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

Harman, G. E., Charles R. Howell, Ada Viterbo, Ilan Chet, and Matteo Lorito. (2004) *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2, (1): 43-56.

Highley, T. L. (1997). Control of wood decay by *Trichoderma (Gliocladium) virens* I. Antagonistic properties. *Material und Organismen*. 31 (2): 79-90.

Hoitink, H. A. J., Madden, L. V., Dorrance, A. E., (2005). Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathology*. 96:186-189.

Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., Y Bissett, J. (2009). Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*. 51 (3): 409-416.

Howell, C. R., DeVay, J. E., Garber, R. H., Y Batson, W. E. (1997). Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. *The Journal of Cotton Science*. 1:15-20.

Howell, C. R. (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant Diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. Vol 87 (1).

Infante, D., B. Martínez., N. González Y Y. Reyes. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Vegetal*. Vol. 24 No 1, 14-21.

John, S., Wicks, T. J., Hunt, J. S., Lorimer, M. F., Oakey, H., Y Scott, E. S. (2005). Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. *Australasian Plant Pathology*. 34 (4): 569-575.

Kotze, C., Van Niekerk, J., Halleen, F., Mostert, L., Y Fourie, P. (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea* 50 (4): 247-263.

Lo, C.-T., Lin, C.-Y. (2002). Screening Strains of *Trichoderma* spp. for plant growth enhancement in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*. 11 (4): 215-220.

Markovich N. A., Y Kononova G. L., (2003). Lytic Enzymes of *Trichoderma* and Their Role in Plant Defense from Fungal Diseases: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 39. (4), pp. 341–351

Morath U., Hung R., J. W. Bennett (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology reviews*. 26. 73-83.

Pal, K. K., Y Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094. PHI-A-2006-1117-02.

Plata-Caudillo, J. A. (2010). Aislamiento y evaluación *in vitro* del efecto de *Trichoderma* spp. nativas sobre hongos patógenos de la madera de vid aislados en la región vitivinícola de

Ensenada, Baja California. (Tesis de Maestría, Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California). Pg 36-77

Roberts, W. K., and Selitrennikoff, C.P. (1988). Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology*. 134: 169-176.

Seema. M Y Devaki, N. S. (2012). In vitro evaluation of biological control agents against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural Technology*. 8 (1): 233-240.

Serrano Gómez, C. (2013). Uso de *Trichoderma* sp. Para el control de yesca en vid. (Tesis de Maestría, Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California). Pg 28-64

SIAP, (2013). Visitada en octubre del 2013. <http://www.siap.gob.mx>.

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

Schwyn, B. and Neilands, J.B. (1987). Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160: 47-56.

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

Srivastava, M. P., Tiwari, R., Y Sharma, N. (2013). Effect of different cultural variables on siderophores produced by *Trichoderma* sp. *International Journal of Advanced Research*. 1 (8), 1-6.

Stefanova, M., Leiva A., Larrinaga L., Coronado M.F. (1999). Metabolic activity of *Trichoderma* sp. Isolates for a control of soilborne phytopathogenic fungi. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 16: 509-516.

Urbez-Torres, J. R. (2011). The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*. 50 (4): 5-45.

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

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

Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G., Guerrero, J., Guevara, J., y Gubler, W. D. (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*. 92 (4): 519–529.

Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Y Valéro, J. R. (2007). Antagonistic fungi *Trichoderma* spp : Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. 37 (1): 1-20.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., Y Lorito, M. (2008). *Trichoderma* plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40 (1): 1-10.

Vittone, G. (2008). Genetic and functional analysis of siderophores in *Trichoderma Virens*. Senior Honors Thesis. Department of Biochemistry and Biophysics, Texas A & M University. Pg 10-17

Weindling, R., (1934). Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lingorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology*. 24: 1153.

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

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