



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**EFICACIA DE LA PROTECCIÓN EN ESTACAS DE VIDES CON
TRICHODERMA SPP. Y MICORRIZAS CONTRA *DIPLODIA SERIATA* Y
PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA.**

**Tesis de grado
Magíster en Hortofruticultura**

MANUEL ALEJANDRO ACUÑA SOTO

**TALCA - CHILE
2022**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**EFICACIA DE LA PROTECCIÓN EN ESTACAS DE VIDES CON
TRICHODERMA SPP. Y MICORRIZAS CONTRA *DIPLODIA SERIATA* Y
*PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA***

Por

MANUEL ALEJANDRO ACUÑA SOTO

**Presentada a la Universidad de Talca como parte de los requisitos para
optar al grado académico de**

Magíster en Hortofruticultura

TALCA, 2022

APROBACIÓN:

Profesor guía:

Ing. Agr., M.S., Ph.D. Mauricio Lolas Caneo, Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. Email: mlolas@utalca.cl

Profesor Co-guía:

Ing. Agr., Mg. Cs., Dr. Gonzalo Díaz Ulloa, Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. Email: g.diaz@utalca.cl

Profesor informante:

Ing. Biotec. Dr. Felipe Gainza Cortés, Centro de Investigación e Innovación, Viña Concha y Toro, Talca. Email: felipe.gainza@conchaytoro.cl

FECHA DE PRESENTACIÓN

Enero del 2022

DEDICATORIA

A mis padres Rosa Soto Guzmán y José Manuel Acuña Cea

A mi hija Alison Acuña G.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis padres por todo el apoyo y la preocupación brindado durante este proceso y por haber inculcado siempre el espíritu de perfeccionamiento y la búsqueda de cada día ser un mejor profesional y persona, recuerdo siempre las muchas veces que me dijo mi madre sobre dar lo mejor de mí y nunca dejar labores sin terminar o a medias “No hagas nada a medias, termina lo que empiezas” Además agradecer a mi hermana Janira por estar siempre presente dando soporte, cariño y buenas conversaciones.

A Felipe Gainza. por alentarme y motivarme en intentar nuevamente seguir mis estudios de postgrado y brindarme la oportunidad de realizar el trabajo de tesis de Magíster en el laboratorio del Centro de Investigación e Innovación (CII) de Viña Concha y Toro. A todo el equipo del laboratorio de Biología Molecular del CII, Rosy, Pablo, Paulina y Claudia. Igualmente agradecer la buena disposición de Leslie, Verónica y Camila del laboratorio de Química del CII y Sebastián Vargas por toda la ayuda, facilitarme un espacio de trabajo durante los complicados tiempos de pandemia.

A todo el personal de laboratorio de Patología Frutal de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, gente muy cariñosa y dispuesta siempre a ayudar en especial a Paulina, Víctor, Cristian, Claudia, Marcela, Cecilia y Mauricio. Finalmente, agradecer a mis profesores guías Mauricio Lolas y Gonzalo Díaz por acogerme en su laboratorio y en el apoyo de la redacción y corrección de mi trabajo de tesis.

RESUMEN

Las enfermedades de madera de la vid (EMV) son uno de los problemas fitosanitarios más relevantes que afectan al viñedo. Siendo las especies *Phaeomoniella chlamydospora*, *Diplodia seriata*, e *Inocutis* sp. los de mayor frecuencia encontrados en plantas adultas con EMV. El uso de biocontrol con especies de *Trichoderma* y micorrizas en EMV surge como una alternativa de control de estas enfermedades. En el actual trabajo, Estacas de vid enraizadas cv. Cabernet Sauvignon clon #337 sobre portainjerto 101-14 (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*), fueron tratadas con las bioformulaciones comerciales **Mammul®** (*Bionectria ochroleuca* Cepa Mitique, *Trichoderma gamssi* Cepa Volqui, *Hypocrea virens* Cepa Ñire) y **TIFI®** (*Trichoderma atroviride* cepa MUCL 45632) junto a los productos micorrícicos **AEGIS-Gel®** (*Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*) y **OIKO-RHIZA-E®** (*Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon villosulfus*, *R. luteolus*, *R. amylopogon*, *R. fulvigleba* y *Scleroderma citrinum*). Las plantas protegidas con los tratamientos fueron inoculadas con *Phaeomoniella chlamydospora* y *Diplodia seriata*. Después de 22 meses de inoculación se determinó la conductancia estomática, contenido de clorofila, macroelementos, microelementos, almidón, glucosa y fructosa. Además, se determinó la detección y cuantificación de *P. chlamydospora* y *D. seriata* por qPCR desde las plantas, con el objetivo de determinar la eficacia en la protección conferida por *Trichoderma* y micorriza en etapa de vivero. Los resultados obtenidos evidencian contenidos de clorofila significativamente mayores en el factor *Trichoderma* (T) inoculadas con *P. chlamydospora* y *D. seriata*. La fructosa y glucosa en raíces fueron significativamente mayores en plantas infectadas por *P. chlamydospora* y *D. seriata*. Ambos patógenos fueron exitosamente detectados por qPCR, desde plantas testigo y con tratamientos preventivos.

Palabras claves: *Trichoderma*; micorriza; enfermedades de la madera de la vid; detección molecular.

ABSTRACT

The grapevine trunk diseases (GTDs) are one of the most relevant phytosanitary problems in the vineyards. GTDs are caused by several fungal species. In Chile, the species *Phaeomoniella chlamydospora*, *Diplodia seriata*, and *Inocutis* sp. are the most frequently fungal trunk pathogens obtained from adult plants with GTDs. Currently, there is no effective control other than cutting affected sectors and starting for replanting in several cases. The use of *Trichoderma* species and mycorrhizal in GTDs emerges as an alternative to control these diseases, respectful for the environment. In the current study, grapevine cv. Cabernet Sauvignon clon #337 on rootstock 101-14 (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*), were treated with the commercial bioformulations **Mammul®** (*Bionectria ochroleuca* Strain Mitique, *Trichoderma gamssi* Strain Volqui, *Hypocrea virens* Strain Ñire) and **TIFI®** (*Trichoderma atroviride* Strain MUCL 45632) along with others mycorrhizal products **AEGIS-Gel®** (*Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*) and **OIKO-RHIZA-E®** (*Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon villosulfus*, *R. luteolus*, *R. amylopogon*, *R. fulvigleba* and *Scleroderma citrinum*). The plants protected with the treatments were inoculated with *Phaeomoniella chlamydospora* and *Diplodia seriata*. After 22 months of inoculation, it was determined the stomatal conductance, chlorophyll contents, macrolelements, microelements, starch, glucose and fructose. Moreover, the detection and quantifications of *P. chlamydospora* and *D. seriata* from by qPCR from plants. with the aim of determining the effectiveness of protection conferred by the *Trichoderma* and mycorrhizal nursery stage. The results obtained show significantly higher chlorophyll contents in the factor *Trichoderma* (T) inoculated with *P. chlamydospora* y *D. seriata*. The contents of fructose and glucose in roots are significantly higher in infected plants by *P. chlamydospora* regarding the witness. Both pathogens were successfully detected by qPCR, from control plants and with preventive treatments.

Keywords: *Trichoderma*; mycorrhizal; grapevine trunk disease; molecular detection.

INDICE

APROBACIÓN:.....	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	4
1.2 Objetivo general	4
1.3 Objetivos específicos	4
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Antecedentes del cultivo de la Vid.....	5
2.2 Principales enfermedades fungosas que afectan a la vid	5
2.3 Agentes causales de enfermedades de la madera en vid.....	7
2.4 Otros hospederos de <i>P. chlamydospora</i> y <i>D. seriata</i>	8
2.5 Síntomas de EMV	8
2.6 Efecto de EMV en la fisiología de la vid	9
2.7 Control de la enfermedad.....	11
2.8 Agentes biológicos (Control biológico)	12
2.8.1 <i>Trichoderma</i> spp.....	13
2.8.2 <i>Trichoderma</i> spp. como agente de biocontrol de EMV	16
2.8.3 Micorrizas Arbusculares.....	18
2.8.4 Micorrizas como agente de biocontrol de EMV.....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1 Material vegetal.....	24
3.2 Proceso de producción de plantas de vivero.....	24
3.3 Aplicación de <i>Trichodermas</i> comerciales	25
3.4 Aplicación de micorrizas comerciales.....	26

3.5	Material fúngico	27
3.6	Inoculación de hongos de la madera en plantas de vid.....	28
3.7	Conductancia estomática	28
3.8	Determinación de clorofila	29
3.9	Determinación de almidón y azúcares en raíces.....	29
3.10	Determinación de macro y micro elementos en raíces.....	30
3.11	Lesiones necróticas.....	31
3.12	Reaislado desde plantas inoculadas	31
3.13	Extracción de ADN (<i>P. chlamydospora</i> y <i>D. seriata</i>) desde aislados puros	31
3.14	Extracción de ADN desde plantas inoculadas (matriz leñosa)	32
3.15	Diseño de oligonucleótidos sintéticos y curvas estándar (qPCR).....	33
3.16	Cuantificación por qPCR de <i>P. chlamydospora</i> y <i>D. seriata</i>	35
3.17	Diseño experimental y análisis estadístico	35
IV.	RESULTADOS.....	37
4.1	Lesiones producto de los hongos de madera inoculados.....	37
4.2	Reaislado desde vides inoculadas	39
4.3	Efecto de <i>P. chlamydospora</i> sobre la conductancia estomática.....	39
4.4	Efecto de <i>Diplodia seriata</i> sobre la conductancia estomática.....	40
4.5	Efecto de <i>P. chlamydospora</i> en el contenido de clorofila	45
4.6	Efecto de <i>D. seriata</i> en el contenido de clorofila	46
4.7	Efecto de <i>P. chlamydospora</i> sobre el contenido nutricional, almidón, fructosa y glucosa en raíces.....	47
4.7.1	Análisis de componentes principales sobre contenidos nutricionales y fotoasimilados en vid infectadas por <i>P. chlamydospora</i>	47
4.7.2	Análisis de componentes principales sobre contenidos nutricionales y fotoasimilados en vides infectadas por <i>Diplodia seriata</i>	48
4.7.3	Contenido de almidón, glucosa y fructosa en raíces de vides inoculadas por <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	49
4.7.4	Contenido de almidón glucosa y fructosa en raíces de vides inoculadas por <i>Diplodia seriata</i>	49
4.8	ADN de hongos patógenos desde cultivo axénico para diseño de g-block y curvas estándar	51

4.9 Diseño de gBlock	51
4.10 Curva estándar <i>P. chlamydospora</i> y <i>D. seriata</i>	53
4.11 Cuantificación genómica (qPCR) de hongos de la madera	53
4.11.1 Cuantificación de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	54
4.11.2 Cuantificación de <i>Diplodia seriata</i>	55
V. DISCUSIÓN.....	57
VI. CONCLUSIÓN	64
VII REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.	65

I INTRODUCCIÓN

La viticultura es una de las actividades agrícolas de mayor importancia a nivel mundial, por el valor económico que genera. Actualmente se producen 77,8 millones de toneladas (Mt) de uvas, donde el 57% de la producción es destinada a la producción de vino (OIV, 2019).

La producción mundial de vino en el año 2018 fue de 292 millones de hectolitros (MhL). Italia es el mayor productor con 54,8 MhL, seguidos por Francia 48,6 MhL y España 44,4 MhL. Mientras, Chile es el sexto en producción con 12,9 MhL (OIV, 2019), además, es el cuarto exportador en el mundo (USDA Foreign Agricultural Center, 2019).

Chile, es un importante productor de vino a nivel mundial con 136.288 ha plantadas, de ellas 35.924 ha corresponden a cepas blancas y 100.364 ha a cepas tintas, generando una producción de 10,3 MhL. Los cultivares (cvs.) principales son Cabernet Sauvignon 40.205 ha, Merlot 11.757 ha, Carménère 10.732 ha en variedades tintas y cvs. Sauvignon blanc 15.222 ha y Chardonnay 11.124 ha en variedades blancas. El Maule es la región con mayor superficie destinada a la viticultura, con 53.818 ha plantadas (Odepa, 2021; SAG, 2021).

La vid (*Vitis vinifera* L.), es afectada por diversas enfermedades originadas por distintos agentes causales, siendo las principales de origen bacterial, viral y fúngico. Las enfermedades de origen fúngico de mayor importancia son el Oídio de la Vid, agente causal *Erysiphe necator* Schw., caracterizado por la presencia de un micelio blanco de aspecto polvoriento en la superficie de los brotes, hojas, sarmientos y racimos. Mientras, la Pudrición Gris del Racimo o Moho Gris, causado por *Botrytis cinerea* Pers., provoca un atizonamiento, desarrollo de canchales en la base de los brotes y pudriciones de bayas y racimos que generalmente van acompañados de abundante esporulación (Latorre, 2018).

Las enfermedades de la madera de la vid (EMV) son causadas por una diversa variedad de hongos fitopatógenos descritos bajo nueve diferentes familias (Mondello et al., 2018). Estos patógenos causan decoloración y necrosis en la madera, diferentes síntomas foliares, causando daños con la subsecuente muerte de brotes, brazos, incluso la planta completa. Actualmente, las EMV representan el mayor desafío de la viticultura en el mundo debido que comprometen la productividad y longevidad del viñedo (Gramaje et al., 2018). En Chile, así como en otras partes del mundo donde se cultive la vid, las especies *P. chlamydospora*, *D. seriata*, e *Inocutis* sp. son los aislados con mayor frecuencia obtenidos desde plantas adultas con EMV; adicionalmente, estos agentes causales pueden ser hallados en forma individual o co-existiendo en una misma planta de vid (Díaz y Latorre, 2013; 2014).

En la actualidad, la protección tradicional incluye prácticas culturales como podas tardías (Munkvold et al., 1994) y protección de los cortes de poda con pinturas con fungicidas como benomilo y tebuconazol (Díaz y Latorre, 2013). Aun así, no existe tratamiento curativo para las EMV (Gramaje et al., 2018; Mondello et al., 2018; Sosnowski y Mundy, 2018).

La protección tradicional radica en uso de fungicidas aplicados en cortes de poda; la eficacia de fungicidas en los cortes de poda contra especies de Botryosphaeriaceae ha sido demostrada (Pitt et al., 2012; Díaz y Latorre, 2013; Sosnowski y Mundy, 2018; Mutawila et al., 2015). Adicionalmente, el uso de barreras físicas como pinturas o pastas, con y sin fungicidas ha mostrado un efectivo control de Botryosphaeriaceae y *Phaeomoniella chlamydospora* (Rolshausen et al., 2010; Pitt et al., 2012; Díaz y Latorre, 2013). Actualmente, los tratamientos disponibles no son totalmente eficientes para el control de las EMV (Mondello et al., 2018; Gramaje et al., 2018). El uso de biocontrol de EMV surge como una alternativa. Por ejemplo, el uso de *Trichoderma* para protección de cortes de poda (Halleen et al., 2010; Mondello et al., 2018). Y el uso de micorrizas en enfermedad de Pie Negro incrementó la tolerancia a la podredumbre de raíces

provocando un lento desarrollo de síntomas en plantas micorrizadas e infectadas con *Armillaria mellea* (Nogales et al., 2009).

El propósito de este trabajo fue evaluar la eficacia a largo plazo en la protección proporcionada por bioformulaciones basadas en productos de *Trichoderma* y micorrizas aplicadas en etapa de vivero frente a una infección de dos hongos de la madera como *P. chlamydospora* y *D. seriata* en los parámetros de conductancia estomática, contenidos de clorofila, macro y microelementos nutricionales, almidón, fructosa, glucosa y en la detección y cuantificación por qPCR de los patógenos inoculados.

1.1 Hipótesis

El refuerzo biológico de bioformulaciones de *Trichoderma* spp. y micorrizas en plantas de *Vitis vinifera* L. en etapas de vivero confiere un efecto protector a largo plazo frente a enfermedades de la madera producidas por *Diplodia seriata* y *Phaeomoniella chlamydospora*.

1.2 Objetivo general

Determinar la eficacia de la protección con *Trichoderma* spp. y micorrizas comerciales en plantas de vid, frente a una infección por *Diplodia seriata* y *Phaeomoniella chlamydospora*.

1.3 Objetivos específicos

- 1.3.1** Determinar el avance de lesiones necróticas producto de la colonización de *Diplodia seriata* y *Phaeomoniella chlamydospora* en plantas de vid tratadas con bioformulaciones de *Trichoderma* spp. y micorrizas.
- 1.3.2** Determinar el efecto de *Diplodia seriata* y *Phaeomoniella chlamydospora* sobre parámetros fisiológicos en plantas de vid tratadas con bioformulaciones de *Trichoderma* spp. y micorrizas.
- 1.3.3** Detectar y cuantificar *Diplodia seriata* y *Phaeomoniella chlamydospora* por qPCR en plantas de vid tratadas con bioformulaciones de *Trichoderma* y micorrizas.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes del cultivo de la Vid

La vid, (*Vitis vinifera* L.), es una de las especies más cultivadas en el mundo para producción de fruta y vinificación. La superficie total plantada de vides en el mundo es de 7,4 millones de hectáreas y su producción es de 77,8 millones de toneladas (Mt). Los principales productores a nivel mundial son China, Italia y E.E.U.U con 11, 7; 8,6 y 6,9 Mt, respectivamente. Chile es el noveno productor con 2,5 Mt (OIV, 2019). Adicionalmente, Chile es el primer y el cuarto exportador de uvas y vinos, respectivamente (USDA Foreign Agricultural Center 2019).

Chile cuenta actualmente con una superficie plantada de vid de 193.295 ha, donde 9.173 ha corresponden a vid pisquera; 47.834 y 136.289 ha plantadas están destinadas a la producción de vid de mesa y producción de vinos, respectivamente (Odepa, 2021). La principal zona vitivinícola en Chile es la Región del Maule, con 53.818 ha plantadas, destacando los cultivares (cvs.), Cabernet Sauvignon, Merlot, Carménère en variedades tintas y cvs. Sauvignon blanc y Chardonnay en variedades blancas (Odepa, 2021; SAG, 2021).

2.2 Principales enfermedades fungosas que afectan a la vid

La vid es afectada por un gran número de enfermedades, entre las más importantes a nivel internacional como nacional se encuentran enfermedades fungosas que incluyen al Oídio de la Vid y Pudrición Gris del Racimo. La micosis oídio de la vid causado por *Erysiphe necator*, se caracteriza por la presencia de un micelio blanco de aspecto polvoriento en la superficie de los brotes, hojas, sarmientos y racimos, provocando una deshidratación de los tejidos (Latorre, 2018). Por otro lado, la Pudrición Gris del Racimo causado por *Botrytis cinerea*, produce atizonamiento, desarrollo de canchales en la base de los brotes y

podriciones de bayas y racimos que generalmente van acompañados de abundante esporulación (Latorre, 2018), causando importantes pérdidas económicas. Por ejemplo, Elmer y Michailides (2004) estimaron el impacto económico de *B. cinerea* en vides en US\$2 billones/año.

Sin embargo, en las últimas décadas las enfermedades de la madera de la vid (EMV) han evidenciado un importante incremento en su prevalencia. En muchas regiones de Australia el 100% de los viñedos antiguos están infectados por *Eutypa lata* y *Botryosphaeria* spp. y se reportan pérdidas en el rendimiento de 890 kg/ha (Wicks y Davies, 1999). En España la incidencia de EMV se incrementó desde un 1,8% en el 2001 al 7% al año 2006 (Martín y Cobos, 2007); en Italia la incidencia de EMV fluctúa de un 8-19%; Argentina un 30% de los viñedos antiguos están afectados (De La Fuente, 2016). Canadá, reportó un 90% de viñedos afectados con síntomas de EMV y en algunos viñedos sobre un 54% de incidencia de EMV (Úrbez-Torres et al., 2014 a, b). Pérdidas en la producción en cultivares susceptibles puede llegar sobre 80% (Munkvold et al., 1994). En California los costos asociados a muerte regresiva por *Botryosphaeria* spp. y Eutipiosis se han estimado en US\$260 millones/año (Siebert, 2001). Se estima que viñedos sin prácticas de control de Eutipiosis puede tener un impacto económico mayor a US\$16.000/ha y prácticas como el replante posterior a 20 años de incidencia de la enfermedad (mayor a 40% de infección) ocasiona pérdidas mayores a US\$20.000/ha (Sipiora y Cuellar, 2015). Mientras, en Chile la importancia económica de EMV ha sido parcialmente estudiada (Besoain, 2018). La incidencia y severidad durante el 2018 de muerte regresiva por *Botryosphaeria* spp. en viñedos de Chile central cv. Cabernet. fue de 84% y 47%, correspondientemente. La incidencia y severidad promedio en la Región de O'Higgins fue de 82,4% y 43,6% y en la Región del Maule de 87,2% y 51,4%, respectivamente. Además, durante la temporada 2018 las pérdidas de rendimiento fueron de 46% de la producción, siendo *Diplodia seriata* el hongo aislado con mayor prevalencia desde plantas sintomáticas (Larach et al., 2020). Aunque las EMV se conocen desde finales del siglo XIX, su impacto y

significancia en la sanidad vegetal solo se ha reconocido recientemente (Gramaje et al., 2018). En consecuencia, las EMV se consideran como la patología más destructiva de las últimas tres décadas y es una preocupación cada vez mayor en todos los países productores de vino (De La Fuente, 2016).

2.3 Agentes causales de enfermedades de la madera en vid

Las enfermedades de la madera producen una baja en la producción y reducción de la vida útil de los viñedos mundialmente como California, España, Sudáfrica y Australia (Gramaje et al., 2018). Internacionalmente, se han caracterizado a varios agentes causales como Diatrypaceae (*Eutypa (E.) lata* y *Eutypella (Eu.)* spp.), Botryosphaeriaceae (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia (D.) seriata*, *Dothiorella (Do.)* spp., y *Neofusicoccum (N.) australe*), *Phaeoacremonium* spp., *Phaeomoniella (P.) chlamydospora* entre otros (Carlucci et al., 2016; Gramaje et al., 2018). En Chile, las principales especies fungosas asociadas con EMV descritas son especies pertenecientes a Botryosphaeriaceae (*D. seriata*, *D. mutila*, *Do. viticola*, *N. parvum*, *N. australe*), Diatrypaceae (*Cryptovalsa ampelina* y *Eu. leprosa*), *P. chlamydospora* y Basidiomicetes como *Inocutis* sp. (Díaz y Latorre, 2013; Díaz et al., 2011; Besoain et al., 2012). Recientemente, se ha descrito a *E. lata*, asociado a plantas adultas con EMV en Chile (Lolas et al., 2020). En importancia, las especies *P. chlamydospora*, *D. seriata*, e *Inocutis* sp. son los aislados con mayor frecuencia obtenidos desde plantas adultas con EMV; además, estos agentes causales pueden ser encontrados en forma individual o co-existiendo en una misma planta de vid (Díaz y Latorre, 2013; 2014).

2.4 Otros hospederos de *P. chlamydospora* y *D. seriata*

P. chlamydospora posee una distribución cosmopolita donde se cultiva vides (Crous y Gams, 2000). Sin embargo, se ha reportado que puede tener otros hospederos frutales como olivos (*Olea europea*) (Úrbez-Torres et al., 2013), kiwis (*Actinidia deliciosa*) (Di-Marco et al., 2000) y malezas como correhuela (*Convolvulus arvensis*) (Agustí et al., 2011).

La especie *D. seriata* se ha reportado causando muerte regresiva de ramillas y brazos en especies frutales como manzano (*Malus domestica*) (Díaz et al., 2019), kiwis (*Actinidia deliciosa*) (Díaz et al., 2021), almendro (*Prunus dulcis*) (Olmo et al., 2017), nogal (*Juglans regia*) (Eichmeier et al., 2020), membrillo (*Cydonia oblonga*) (Vico et al., 2017), olivo (*Olea europea*) (Moral et al., 2008), palto (*Persea americana*) (Valencia et al., 2019), entre otros. Por lo tanto, huertos frutales pueden ser considerados como una potencial fuente de inóculo de EMV cuando estos se encuentran aledaños al viñedo, propiciado por la patogenicidad y el comportamiento saprófito de estos hongos (Gramaje et al., 2018). De manera similar, malezas pueden servir como fuente de inóculo para infecciones en la viña (Agustí et al., 2011).

2.5 Síntomas de EMV

Los síntomas descritos en plantas adultas con EMV incluyen un decaimiento general y progresivo, escaso desarrollo, muerte de brotes, muerte regresiva de brazos, muerte de cargadores, entrenudos cortos, clorosis y deformación foliar (Díaz y Latorre, 2013; Gramaje et al., 2018), a menudo acompañados por específicos síntomas foliares acorde a las diferentes enfermedades (Bertsch et al., 2013; Mondello et al., 2018; Gramaje et al., 2018). Internamente, brazos y troncos enfermos presentan necrosis y pudrición de la madera (Díaz y Latorre, 2013).

Epidemiológicamente, durante el otoño e invierno en condiciones de alta humedad y de precipitaciones, se desarrollan cuerpos fructíferos (picnidios y peritecios) de los hongos causales sobre brazos enfermos y residuos de brazos y cargadores enfermos infectados, los cuales liberan esporas en el viñedo, diseminándose por el salpicado de aguas (precipitaciones) y el viento (Gramaje et al., 2018; Ayres et al., 2011). *P. chlamydospora* también puede ser dispersado por artrópodos (Moyo et al., 2014). Estas condiciones climáticas (precipitaciones y temperaturas medias-bajas del invierno) y biológicas de los hongos, coinciden con la práctica de poda en los viñedos, en donde las heridas de poda, son la principal vía de entrada para *P. chlamydospora* y los hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* e iniciándose la infección en las plantas de vides (Úrbez-Torres et al., 2010; Valencia et al., 2015; Gramaje et al., 2018). Por lo tanto, la protección de las heridas de poda es uno de los manejos más importantes para lograr el control preventivo en el viñedo (Díaz y Latorre, 2013).

2.6 Efecto de EMV en la fisiología de la vid

Los hongos asociados a EMV afectan órganos perennes, sarmientos y troncos de las vides produciendo necrosis en la madera a través de una lenta colonización e invasión de los tejidos conductores (xilema) destacando *P. chlamydospora* y *Botryosphaeriaceae* spp. (Úrbez-Torres et al., 2006; Díaz y Latorre, 2014; Gramaje et al., 2018). En vides adultas cv. Cabernet Sauvignon, en la Región de Bordeaux, se determinó que plantas con síntomas de EMV mostraron una reducción de la capacidad hidráulica de la planta completa asociados a la necrosis de los tejidos de la madera (Ouadi et al., 2019). El principal efecto fisiológico reportado es sobre el metabolismo de los carbohidratos y la respuesta de defensa en los diferentes órganos de la planta de vid. La disminución de reservas de almidón en tejidos leñosos estaría asociada con la colonización de los hongos patógenos. En el tejido foliar, los hongos de la madera no se encuentran presentes, no obstante, el metabolismo de los

carbohidratos se ve afectado observándose un descenso de la tasa fotosintética. Una consecuencia de esta alteración es la disminución del pool de reservas de carbono, que incidiría en el desarrollo vegetativo y el bajo vigor en temporadas venideras (Fontaine et al., 2015). Reservas de almidón en plastidios de células del parénquima y radiales de plantas sanas decreció en vides que presentaron síntomas de Eutipiosis (Rudelle et al., 2005).

Síntomas foliares son asociados al cierre estomático y la alteración del aparato fotosintético que produce una disminución en la asimilación de CO₂ y la transpiración. Adicionalmente, se observa una reducción en la concentración de clorofila total, pero un estable contenido de carotenoides (Petit et al., 2006; Magnin-Robert et al., 2014); un semejante descenso en el contenido de clorofila fue descrito en hojas sintomáticas *in vitro* de plantas infectadas con *P. chlamydospora* (Santos et al., 2005). La intensidad del intercambio gaseoso estaría correlacionada con el desarrollo de síntomas foliares. En efecto, no fueron detectadas alteraciones al aparato fotosintético en sarmientos asintomáticos (Christen, 2006). El transporte de agua en la planta podría verse afectado en vides enfermas de Esca debido a la disfunción del xilema (Fontaine et al., 2015). Un bloqueo hidráulico en la planta produce necrosis en la madera que puede ocasionar una disrupción en la conductancia estomática, reduciendo la fotosíntesis y la asimilación de CO₂ restringiendo la síntesis de azúcares y otros compuestos secundarios relacionados a los mecanismos de defensa de la planta contra patógenos relacionados a la enfermedad de Esca (Ouadi et al., 2019). La función xilemática es considerablemente reducida por una infección por *P. chlamydospora* en plantas de vid cv. Verdelho crecidas en condiciones de campo (Edwards et al., 2007). La conductancia estomática y el potencial hídrico en hojas fueron las medidas más útiles para diferenciar entre plantas infectadas y no infectadas. Adicionalmente, la conductancia estomática en plantas de tres años cultivadas en macetas bajo condiciones de invernadero, fue usualmente más alta en vides infectadas comparadas con las no infectadas, incluyendo tratamientos

sin estrés hídrico. Esto indicaría que la infección interfiere con la normal regulación de la apertura y cierre estomático (Edwards et al., 2007 a, b). Contrariamente, se reporta una baja significativa en la conductancia estomática una semana anterior a la expresión de síntomas de Esca (Letousey et al., 2010).

2.7 Control de la enfermedad

Actualmente, no existen medidas curativas para el control de la enfermedad (De La Fuente, 2016; Gramaje et al., 2018), más que la extirpación de los órganos infectados de la planta (Surico y Marchi, 2006; Wagschal et al., 2008; Gramaje et al., 2018; Mondello et al., 2018; Sosnowski y Mundy, 2018). Por lo tanto, un amplio rango de métodos de control los que incluyen químicos, biológicos y métodos de sanitización han sido evaluados (Bertsch et al., 2013). La protección química de cortes de poda se ha propuesto como forma de control de *Botryosphaeriaceae* spp. en vides (Amponsah et al., 2012). Además, el uso de barreras físicas como pinturas o pastas, con y sin fungicidas ha resultado un efectivo control de *Botryosphaeriaceae* spp. y *Phaeomoniella chlamydospora* (Rolshausen et al., 2010; Pitt et al., 2012; Díaz y Latorre, 2013). Entre los fungicidas benzimidazoles, benomilo, carbedazim y metil-tiofanato demostraron amplia eficiencia en laboratorio y campo para protección de cortes de poda y en etapa de vivero. (Gramaje et al., 2009; Halleen et al., 2010; Amponsah et al., 2012; Díaz y Latorre, 2013). Piraclostrobin + Boscalid (Tessior) destaca en la efectividad entre varios fungicidas testeados en la protección de cortes de poda para prevenir la infección de los hongos *D. seriata* y *P. chlamydospora* (Martínez-Diz et al., 2021). Sin embargo, una atención cuidadosa en los procesos de propagación de vides es esencial (Gramaje et al., 2018) ya que es el punto de partida en muchos casos de la infección y establecimiento de la enfermedad. Posteriormente, prácticas culturales como eliminar correctamente los restos de poda de viñedos infectados son importantes, ya que los desechos de poda son un reservorio de inóculo de hongos de la madera como *D. seriata* y otros

Botryosphaeriaceae, cuando son dejados en el suelo (Jiménez y Luque, 2015). Aun así, esto debe ser una práctica en conjunto con viñedos aledaños que son potencialmente una fuente de inóculo.

Una alternativa al uso de fungicidas químicos es el uso de agentes de control biológico basado en las restricciones y dificultades que enfrentan en muchos países del mundo (Gramaje et al., 2018). Adicionalmente, los fungicidas con mayor eficiencia hasta el momento (Benzimidazoles) no son capaces de proteger los cortes de poda durante todo el periodo en que son susceptibles a infecciones de EMV (Kotze et al., 2011). El biocontrol de EMV con microorganismos se presenta como una alternativa. Por ejemplo, el uso de *Trichoderma* spp. (Halleen et al., 2010; Gramaje et al., 2018).

2.8 Agentes biológicos (Control biológico)

El término control biológico ha sido utilizado en distintas ramas de la biología, principalmente en entomología y fitopatología. En entomología se refiere al uso de insectos depredadores, nemátodos entomopatógenos o patógenos microbianos para controlar poblaciones de distintos tipos de insectos plaga. En fitopatología, alude al uso de microorganismos antagonistas para suprimir enfermedades. En ambos casos, el organismo que se utiliza se denomina agente de control biológico (Pal y McSpadden-Gardener, 2006). Las plantas interactúan con muchos microorganismos que viven en su interior, como endófitos, o en la superficie exterior de la planta, como epífitos. Especial atención han tenido las bacterias y los hongos, que actúan como agentes de biocontrol, promoviendo el crecimiento y resistencia inducida (Compant y Florence, 2016). Una bacteria u hongo endófito es el que está presente en parte o durante el ciclo completo de la planta colonizando tejidos sanos, inter-celular o intra-celular, y que típicamente no causa síntomas aparentes (Sturz et al., 2000). El rol ecológico de estos microorganismos aún no ha sido determinado, pero la mayoría de ellos tiene un efecto positivo en las plantas, que incluye la promoción del crecimiento, mejora

de la resistencia al estrés, mantener un suministro confiable de nutrientes, biocontrol de plantas parásitas y la síntesis de metabolitos antagonistas a depredadores (Schulz y Boyle, 2005). El interés en nuevos agentes de control biológico para prevenir infecciones en cortes de poda por patógenos asociados a EMV se ha incrementado en los últimos años, en parte por la efectividad de los fungicidas, y por la necesidad de mayor protección (Compant y Florence, 2016). Tal es el caso, en el uso de *Trichoderma* spp. (Mutawila et al., 2016; Martínez-Diz et al., 2020; Carro-Huerga et al., 2020) y micorrizas. (Hao et al., 2012; Trouvelot et al., 2015) como parte de investigaciones y aplicaciones en huertos productivos.

2.8.1 *Trichoderma* spp.

Las especies del género *Trichoderma*, corresponden a la forma asexual (anamorfo) del género *Hypocrea* (teleomorfo) y pertenecen a la familia *Hypocreaceae* (Chaverri y Samuels, 2003). Principalmente este microorganismo es aislado desde el suelo, pudiendo ser encontrado en la rizosfera de la planta, donde pueden generar resistencia sistémica inducida contra fitopatógenos (Harman, 2000). Son exitosos colonizadores de ambientes, realizan una eficiente utilización de los sustratos que tienen disponible, así como la capacidad de secreción de metabolitos, antibióticos y enzimas (Schuster y Schmoll, 2010). *Trichoderma* spp. tiene un positivo efecto sobre su hospedero, incrementando su crecimiento e induciendo respuesta de defensa en plantas (Harman, 2006; Vinale et al., 2008). Su mecanismo de biocontrol está basado en la producción de enzimas y otros metabolitos secundarios (Reino et al., 2008).

Hasta hace poco, el principal mecanismo asumido eran el micoparasitismo, antibiosis, competición por fuentes de recursos y espacio. Recientes avances demostraron el efecto de *Trichoderma* spp. en plantas, incluyendo resistencia sistémica inducida o localizada. Estudios han demostrado que estos hongos producen mezclas de enzimas antifúngicas, como chitinasa y β -1,3 glucanasas,

estas enzimas son sinérgicas con otras enzimas, enzimas antifúngicas y con otros materiales (Harman, 2006). Al menos, algunas cepas establecen una robusta y duradera colonización en la superficie de la raíz que puede penetrar dentro de la epidermis y en unas pocas células bajo este nivel. La variedad de compuestos producidos y liberados que induce la respuesta sistémica inducida o localizada explicaría la carencia de patogenicidad en plantas (Harman et al., 2004). Enzimas producidas causan la liberación de oligosacáridos de bajo peso molecular que inducen resistencia (Woo et al., 2006). Existe un amplio rango de enzimas chitonolíticas y glucanolíticas con un posible rol de biocontrol y seguramente se descubrirán muchas más en los análisis proteómicos y genómicos de *Trichoderma*. Actualmente, se conocen al menos 30 chitinasas y un amplio rango de glucanasas, el número de genes y proteínas de estos dos grupos de biocontrol es muy diversa y la mayoría de los productos de estos genes son antifúngicos (Harman, 2006).

Las plantas tienen un sistema inmune que es capaz de detectar motif o dominios con una estructura conservada típica de clases completas de microbios llamadas Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos (MAMPs) (Hermosa et al., 2012). La capacidad de *Trichoderma* spp. de liberar MAMPs para los reconocimientos moleculares podría contribuir a la cascada de señales bioquímicas en la planta como es el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). Tempranamente, se creyó que el JA y/o ET era las moléculas señales por el cual *Trichoderma* inducía resistencia, pero actualmente se determinó que SA también está involucrado en el proceso de resistencia. (Singh et al., 2018). *Trichoderma* spp. además, libera elicitores que están implicados en la activación de la inducción de proteínas de defensa en la planta (Thakur y Sohal, 2013). *Trichoderma* actúa local y de manera sistémica involucrando la activación de cascadas bioquímicas, acumulación de compuestos antimicrobianos, como fenilalanina amonio liasa (PAL), peroxidasa, polifenol oxidasa, lipoxigenasa y proteínas PR (Proteínas relacionadas con patogénesis), terpenoides, fitoalexinas como el resveratrol, entre otros (Howell et al., 2000). De este modo la inmunidad

en plantas es inducida contra patógenos, aunque no es activada directamente, pero es acelerada contra el ataque de patógenos y otros tipos de estrés resultando una rápida y fuerte resistencia a estos (Van et al., 2008).

Otro mecanismo de acción de *Trichoderma* es la antibiosis, que es una forma interacción de antagonismo que involucra moléculas de bajo peso molecular, metabolitos secundarios o antibióticos producidos que causan un deterioro en el crecimiento de patógenos. *Trichoderma* spp. produce una variedad de antibióticos como gliovirin, gliotoxin, viridin, viridol, koningginins, pyronas y peptaboil contra hongos fitopatógenos (Howell, 2003; Harman et al., 2004).

La causa más frecuente de muerte de microorganismos que crecen cercano a *Trichoderma* es la inanición ocasionada por la escases o limitada cantidad de nutrientes y por la colonización de la rizosfera. *Trichoderma* spp. posee muchas cualidades y atributos, tienen gran potencial de uso en agricultura como estimuladores de crecimiento, mejoran aspectos morfológicos y fisiológicos en las plantas, optimizan la captación de nutrientes y mejoran la eficiencia fotosintética. Además de estimular la respuesta en defensa a estreses bióticos y abióticos incluyendo el micoparasitismo, antibiosis y competencia contra patógenos (Singh et al., 2018). En los últimos años, una amplia variedad de especies de *Trichoderma* han sido propuestas como agentes de control biológico en la agricultura. Por ejemplo, *T. harzianum* cepa T39 ha tenido resultados prometedores en el control de *B. cinerea*, resultando en la formulación comercial Trichodex® (Elad, 2000). La cepa T39 compite con el patógeno por nutrientes interfiriendo el desarrollo de *B. cinerea* e induciendo resistencia en plantas (Elmer y Reglinski, 2006). *Trichoderma harzianum*, cepas 1295-22 y P1 han sido efectivas contra *B. cinerea* en múltiples ensayos de campo (Harman et al., 1996). Sin embargo, se necesita potenciar la popularidad de formulaciones basados en *Trichoderma* entre los agricultores y así realizar un manejo de enfermedades sustentables y ecológicamente amigables.

2.8.2 *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol de EMV

Dependiendo de la cepa, las especies de *Trichoderma* presentan variados beneficios para los cultivos, como estimular el crecimiento mejorando la movilización y adquisición de nutrientes, supresión de patógenos por competencia de nutrientes y espacio, micoparasitismo, antibiosis y por último pueden suprimir enfermedades induciendo una resistencia sistémica (Harman, 2000; Waghunde et al., 2016). *Trichoderma* spp. es el hongo mayormente aislado, mostrando mayor número de aislados en plantas asintomáticas que en sintomáticas. Esto es fuertemente concordante con su rol antagonista, protegiendo las plantas contra hongos patógenos (Almeida et al., 2020).

El potencial uso de *Trichoderma* spp. como biocontrolador de EMV en etapa de vivero es propuesto para generar vides fortalecidas frente a bajos niveles de infección por *P. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. y *Cylindrocarpon* (Fourie et al., 2001). En portainjertos tratados con bioformulaciones de *Trichoderma* la incidencia de *P. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. en la zona de injertado y en estacas enraizadas de vides, provenientes de vivero, fue significativamente menor (Fourie y Halleen, 2004). *Trichoderma harzianum* (Rootshield®) aplicado en etapa de vivero reduce la necrosis causada por la inoculación de *P. chlamydospora* posterior a 15 meses de la inoculación. Sin embargo, se reporta que los efectos positivos relacionados a estreses por enfermedades solo fueron cuando *Trichoderma* es aplicado en etapa de enraizamiento (Di-Marco y Osti, 2007).

T. atroviride cepa SC1 reduce la incidencia de algunos patógenos relacionados a EMV en etapas de propagación cuando son aplicados durante el proceso de injertado, y además cuando *T. atroviride* es aplicado durante dos temporadas consecutivas de crecimiento a un viñedo joven (Berbegal et al., 2019). *T. harzianum* cepa T39 asperjado en cortes de poda durante dos años seguidos reduce la decoloración longitudinal causada por *P. chlamydospora* (Di-Marco et al., 2004). *T. harzianum* es capaz de colonizar la madera de los cvs. Chardonnay,

Shiraz y Nyora y reduce la colonización por *E. lata*. Además, perdura en la madera de cv. Nyora sobre 20 meses posterior a su inoculación (John et al., 2008). Cortes de poda tratados con *Trichoderma* spp. no solo reduce la infección por *E. lata* tras ser inoculada, sino que adicionalmente, reduce la incidencia de otros hongos relacionados con EMV (Halleen et al., 2010).

Las especies de *Trichoderma atroviride* cepas USPP-T1 y USPP-T2 separadas o en combinación y Eco77® basado en *T. harzianum* aplicados en cortes frescos de poda reduce la incidencia en un 29,1% de diversos patógenos relacionados con EMV en cv. Cabernet Sauvignon (Mutawila et al., 2011a). Sin embargo, para obtener resultados de alta incidencia de *Trichoderma* spp. es necesario la aplicación seis horas posteriores a la poda, independiente del estado fisiológico o las condiciones climáticas. Adicionalmente, la combinación de una poda temprana con una aplicación de *Trichoderma* spp. en el rango aproximado de seis horas posterior a la poda, puede reducir significativamente la infección de patógenos relacionados con EMV (Mutawila et al., 2016).

Trichoderma cepa T154 es capaz de colonizar plantas 12 semanas posterior a la inoculación y se localiza en el xilema, fibras, como en el tejido parenquimático dentro de la madera. T154 reduce la colonización de hongos relacionados con EMV, como *Phaeoacremonium minimum*, colonizando el mismo nicho. El principal mecanismo de biocontrol observado fue evitar la adhesión de esporas del patógeno, competencia por espacio y enrollamiento de las hifas en el patógeno (Carro-Huerga et al., 2020). *Trichoderma atroviride* cepa SC1 aplicado en hidratación, en etapa de formación de callo y previo a la plantación controla efectivamente la infección por *P. chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* (Pertot et al., 2016). *Trichoderma* spp. reduce significativamente la infección por *P. chlamydospora* y *Phaeoacremonium minimum* (Martínez-Diz et al., 2020).

Trabajos recientes demostraron la capacidad de control de varias especies de *Trichoderma*, donde alcanzaron protección sobre el 80% de *D. seriata* y 60% para

Neofusicoccum parvum en cañas de vides (cortadas) proporcionando una protección hasta 21 días después del tratamiento con biocontroladores (Úrbez-Torres et al., 2020). No obstante, *Trichoderma atroviride* no redujo la infección por *P. chlamydospora* y *D. seriata* (Martínez-Diz et al., 2021).

Es necesario optimizar los tiempos de aplicación de *Trichoderma* en combinación con los tiempos de poda (Mutawila et al., 2016), evaluar la interacción *Trichoderma*-vid debido que la protección de cortes de poda también depende de esta relación y no solo del efecto antagónico de *Trichoderma* sobre el patógeno (Mutawila et al., 2011a). En relación a la idea anterior, se debe evaluar cepas nativas de *Trichoderma* mejor adaptadas a sobrevivir a un medioambiente cambiante consiguiendo brindar una mayor protección a las vides y co-evolucionar junto al viñedo (Carro-Huerga et al., 2021).

2.8.3 Micorrizas Arbusculares

Micorrizas arbusculares (MA) es la asociación simbiótica planta-hongo mayormente propagada en el planeta y existe en la mayoría de las plantas terrestres. Su presencia se puede trazar hacia el periodo devónico temprano, hace 400 millones de años, el cual corresponde al comienzo del hábitat terrestre por las plantas (Buscot, 2015). Las MA ingresan a las raíces mediante la formación de un apresorio (Bonfante y Perotto, 1995), una vez dentro coloniza las células del córtex y forman estructuras ampliamente ramificadas llamadas arbusculos, sitio donde ocurre la mayor parte del intercambio de nutrientes con el hospedero (Sawers et al., 2008). Esta asociación mutualista está basada en el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta hospedera, la planta suministra azúcares y otros metabolitos y la MA mejora la adquisición de agua y nutrientes del suelo (Smith y Read, 2008). Además, MA puede incrementar la resistencia en un amplio rango de hongos y bacterias patógenas (Pozo et al., 2010). Comparativamente, poco se sabe de los mecanismos que confieren beneficios no nutricionales por micorrizas, como son la supresión de

enfermedades del suelo y el aumento de la resistencia a pestes y enfermedades en plantas (Field, 2012). Las plantas pueden desarrollar una mejora en la capacidad defensiva en respuesta a la infección por MA. La resistencia inducida por micorrizas (MIR) proporciona una protección sistémica en un amplio rango y comparte características con la resistencia sistémica adquirida (SAR) posterior a la infección del patógeno y la resistencia sistémica inducida (ISR) seguido de la colonización de raíces por rizobacterias no patogénicas. Comúnmente se asume que la estimulación del sistema inmune formada por el hongo es el único responsable de MIR (Cameron et al., 2013). MA puede suprimir o reducir pestes o enfermedades a través de la resistencia sistémica inducida (Jung et al., 2012; Pozo y Azcon-Aguilar, 2007). Dependiendo de la interacción planta-patógeno-AM, MIR podría ser asociada con resistencia sistémica adquirida (Gallou et al., 2011). Sin embargo, la resistencia inducida comparte características patógeno-inducidas SAR y rizobacterial ISR; MIR ha sido asociado con SAR-like cebando los genes dependientes de ácido salicílico (SA), pero mayormente con el cebado de genes de defensa dependientes de ácido jasmónico y defensas en paredes celulares. Ha sido propuesto que MIR es el resultado de la activa supresión de componentes en las vías dependientes de SA, causando un cebado de defensas dependientes de JA (Pozo y Azcon-Aguilar, 2007). Sin embargo, la exacta contribución de jasmonatos en MIR aún no es clara (Hause, 2007). Cameron et al. (2013), plantea un modelo de cuatro fases espacio temporales que explican MIR como un resultado acumulativo de interacciones directas Planta-AM y respuestas a bacterias inductoras-ISR en la micorizosfera.

Fase1. Exudado de sustancias químicas en raíces que reclutan de micorrizas.

Las raíces de plantas exudan diversos compuestos biológicamente activos, se estima que sobre un 40% de los fotoasimilados provienen desde las raíces, representando una rica fuente de carbono para los microbios del suelo. Los exudados de raíces típicamente contienen azúcares, amino ácidos, ácidos carboxílicos, compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios que tienen la capacidad de influenciar la fisiología y el comportamiento de los microorganismos

del suelo. La participación de señales de las raíces en la atracción de patógenos y organismos mutualistas no es extraño, desde una perspectiva evolutiva, la atracción común de organismo parásitos y mutualista no es sorprendente, dada la fuerte presión de selección ejercida en los parásitos para adoptar las mismas señales de la planta que las utilizadas por los organismos benéficos.

Fase 2. El sistema inmune de las plantas responde a la infección por MA.

La etapa inicial de colonización de raíces por MA es acompañada por una inducción transitoria de señales selectas de defensas en plantas, seguido por una supresión localizada en etapas posteriores de la interacción (Kapulnik, 1996). Es posible que la inducción inicial de la inmunidad en plantas está basada en el reconocimiento del hospedero por Patrones Moleculares Asociados a Microbios (MAMPs) desde las MA. El reconocimiento por MAMPs por receptores de patrones de reconocimiento gatilla una serie de cascada de señales bioquímicas resultando en un incremento en la producción de la hormona de defensa SA y la expresión de la inmunidad gatillada MAMPs (Zhang y Zhou, 2010). El reconocimiento por MAMPs y la producción de SA puede llevar a la producción de señales SAR de larga distancia y causar el cebado de las defensas dependientes de SA (Conrath, 2011; Heil y Ton, 2009). No obstante, como la mayoría de los estudios se han desarrollado en *Arabidopsis thaliana* que es incompatible con AM, es difícil realizar una comparación directa entre SAR y MIR. Sin embargo, así como SAR, MIR ha sido asociado con el cebado sistémico de defensas dependientes de SA y la protección contra patógenos hemibiotróficos (Cameron et al., 2013).

Fase 3 Inmuno supresión por MA y reclutamiento de bacterias de la rizosfera.

La naturaleza transitoria de la respuesta inmune por MAMP-activado durante la etapa temprana de la micorrización se propone que las MA emplean estrategias similares a los hongos patógenos, secretando moléculas efectoras específicas que suprimen la inmunidad de las plantas que permite establecer una infección exitosa (De-jonge, 2011).

MA induce cambios especies-específica en las hormonas de defensa de sus hospederos (Hause, 2007). Algunos de estos cambios hormonales pueden restringir la colonización de MA, mientras otras pueden promover la infección por MA (Cameron et al., 2013). Por ejemplo, el rol del ácido abscísico (ABA) en la resistencia a las enfermedades es complejo y depende de la etapa y de la naturaleza de la interacción. A pesar de que ABA típicamente suprime los mecanismos de defensa tardíamente durante la interacción planta patógeno (por ejemplo, mecanismos dependientes de SA), pueden promover mecanismos de defensa que actúan relativamente temprano en la interacción, como es el cierre estomático inducido por MAMP, inducción de especies reactivas de oxígeno y de refuerzo de paredes celulares (Ton, 2009). La movilidad de ABA a través del xilema y del floema, hace a esta fitohormona un atractivo candidato para actuar como una señal complementaria de larga distancia de MIR hacia brotes, donde podría contribuir a la defensa en paredes celulares (Cameron et al., 2013).

Las micorrizas aumentan el transporte de fotosintatos a las raíces, en combinación con la modulación de defensas (Smith y Smith, 2011), cambios en el metabolismo y el incremento de la asimilación de P, conduce a cambios en la composición de los exudados en raíces y estos cambios pueden afectar positiva o negativamente a otros microorganismos de la rizosfera. Estos cambios modulados por MA estimulan la actividad biológica en la rizosfera, un fenómeno comúnmente referido como “efecto micorrizosfera” (Linderman, 1988).

Fase 4. Establecimiento de la micorrizosfera e inducción de resistencia sistémica por bacterias de la micorrizosfera. La mayoría de los estudios realizados en MIR han cuantificado los niveles de resistencia cuando la simbiosis de planta-MA y micorrizosfera se ha establecido completamente (Jung et al., 2012) Por lo tanto, es posible que MIR involucre componentes de ISR gatillados por bacterias de la micorrizosfera (Cameron et al., 2013). Jasmonato también se acumula durante la simbiosis de la micorriza con la planta (Hause, 2007). Por esta razón, es posible que los jasmonatos funcionen como señales complementarias de larga distancia de MIR, las que puede ser el resultado de procesos de señalización sistémica

similares a la autoregulación de la nodulación durante las interacciones rizobio-leguminosas (Zamioudis y Pieterse, 2012). Aunque la exacta contribución de los jasmonatos al MIR aún no se ha demostrado, se propone que el cebado de las defensas dependientes de JA durante MIR están determinadas parcialmente por rizobacterias que provocan ISR en la micorrizosfera (Cameron et al., 2013).

2.8.4 Micorrizas como agente de biocontrol de EMV

Actualmente no hay estudios del efecto de micorrizas en vides sobre infecciones por *D. seriata* y *P. chlamydospora*. Sin embargo, Petit y Gubler (2006) examinaron la influencia de MA *Rhizophagus irregularis* cepa (INVAM CA 501) sobre *Cylindrocarpon macrodidymum* agente causal de la enfermedad de pie negro de la vid en *Vitis rupestris* cv. St George en condiciones controladas. Plantas de vid micorrizadas y no micorrizadas fueron infectadas con *C. macrodidymum*, y ocho meses posteriores a la infección con el hongo patógeno se reportó en las plantas micorrizadas un desarrollo significativamente menor de síntomas foliares y de raíces en comparación con las plantas no micorrizadas. De modo que, una aplicación de *R. irregularis* anterior a la plantación, podría ayudar a prevenir la enfermedad de pie negro en etapa de vivero y en viñedo.

En otro estudio, porta injertos Richter 110 (*Vitis berlandieri* Planch. X *Vitis rupestris* L.) inoculados con MA, *R. irregularis* cepa (BEG 72) 14 semanas previos a la infección por *Armillaria mellea* (Vahl:Fr), incrementaron la tolerancia a la podredumbre de raíces ocasionada por este patógeno, provocando un lento desarrollo de síntomas y una alta cantidad de biomasa en las plantas micorrizadas e infectadas con *A. mellea* (Nogales et al., 2009). De manera contraria, en el trabajo de Holland et al. (2019), el portainjerto de vid 'Riparia gloire' (*Vitis riparia*) fue inoculado con *R. irregularis* al mismo tiempo que fue infectado con *Ilyonectria* sp., agente causal de la enfermedad de pie negro en vides jóvenes. La colonización de MA no suprimió a *Ilyonectria* sp. e incrementó su incidencia. Adicionalmente, los portainjertos micorrizados no mostraron

mejoras en el crecimiento y en parámetros fisiológicos frente a los portainjertos no micorrizados (Holland et al., 2019). Una alta cantidad de MA nativas con mayor frecuencia en plantas de vid sintomáticas que en asintomáticas son reportadas, estableciendo una posible relación entre Esca y MA-nativas en viñedos de Italia, que releva la importancia del estudio de los organismos de la rizosfera en los viñedos en relación con las EMV (Landi et al., 2021).

A consecuencia del complejo control de las EMV y de los escasos estudios de los efectos referentes a la relación MA-vid-hongos (de la madera en vides) como herramienta de biocontrol, nace la oportunidad y necesidad de realizar estudios que posibiliten generar conocimiento para tener una alternativa ecológicamente amigable con el medio ambiente frente al control de las enfermedades de la madera en vides.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para este estudio se utilizaron estacas lignificadas de vid portainjerto 101-14 (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*) (n=162 estacas) de 1-2 cm de diámetro y de 35 cm de altura, las cuales fueron obtenidas desde cargadores aparentemente sanos de plantas adultas de 8 años, de los plantales madres del vivero de Viña Concha y Toro. Posteriormente, las estacas fueron injertadas en corte omega con el cv. Cabernet Sauvignon clon #337, pertenecientes a Viña Concha y Toro, localizados en Penciahue, Región del Maule, Chile. El estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación e Innovación (CII) de Viña Concha y Toro, Penciahue, Región del Maule, Chile, y en el laboratorio de Patología Frutal, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Campus Talca, Talca, Chile.

3.2 Proceso de producción de plantas de vivero

Estacas lignificadas de portainjerto 101-14 en receso, recolectadas durante el año 2017, se sometieron a un tratamiento de frío en cámara frigorífica a una temperatura de 7°C por 20-30 días. Posteriormente, se hidrataron por 24-48 horas en piscinas de 600 L, para ser injertadas en corte omega con injertos lignificados del cv. Cabernet Sauvignon clon #337. La zona de injertación se cubrió con cera para evitar la deshidratación y proteger la unión. Una vez injertadas, las estacas se pasaron a estratificación, a 20-25 °C y 90% HR durante 3 semanas, seguido de un rango progresivo de T° 30 a 20°C y 90% HR por 2 a 3 semanas. Luego, en la cámara de brotación, se sometieron a un rango de 25 - 30°C y 90% HR por 2-3 semanas, y al aparecer los brotes, se seleccionan aquellos injertos brotados. Posterior al proceso de selección, las estacas con primordios radiculares pasaron a vivero en campo donde fueron regados por surco y se mantuvieron en crecimiento durante una temporada. Finalmente, las

estacas enraizadas desde ahora en adelante, las plantas, se cosecharon de forma mecanizada y se empacaron para su distribución y plantación.

3.3 Aplicación de *Trichodermas* comerciales

La aplicación de *Trichoderma* comerciales se realizó durante el proceso cotidiano del vivero, entre las etapas de hidratación e injertado. El 4 de octubre del año 2017 se realizó la aplicación de bioformulados comerciales en base a *Trichoderma* spp.: **Mamull®** (*Bionectria ochroleuca* Cepa Mitique, *Trichoderma gamssi* Cepa Volqui, *Hypocrea virens* Cepa Ñire; 20 g/L); **Tifi®** (*Trichoderma atroviride* cepa MUCL 45632; 20 g/L) denominados como T1 y T2, respectivamente para efectos posteriores. T0 correspondió al tratamiento testigo donde sólo se asperjó agua.

La aplicación de Mamull® (T1) y Tifi® (T2) se realizó 24 horas posterior al proceso de hidratación y previo al proceso de injertación, asperjado a una dosis de 20 g/L. Luego, se realizó una repetición de la aplicación de *Trichoderma* posterior al proceso de injertación mediante asperjado a una dosis de 20 g/L. Una misma cantidad de estacas se les aplicó agua, dejándolo como tratamiento control (T0) (Cuadro 3.1). Una vez realizadas las aplicaciones de *Trichoderma* spp., las estacas se plantaron en campo el año 2017 a una distancia de 0,1 m sobre hilera y 1,2 m entre hilera. Y cosechadas en la siguiente temporada (agosto, 2018). Finalmente, las plantas se plantaron en bolsas plásticas negras de 10 litros, el sustrato fue compuesto por una parte de turba, una parte de perlita y compost, y se trasladaron a dependencias de la Universidad de Talca.

Cuadro 3.1 Tratamientos de estacas de vid (cv. Cabernet Sauvignon, Clon #337, portainjerto 101-14) con bioformulados comerciales en base a *Trichoderma* (T) como Mamull® (T1) y Tifi® (T2), (T0) representa el testigo (agua), durante la hidratación, injertación y estratificación de las estacas.

Tratamiento	Bioformulado	Dosis	Fabricante
T0	Agua	Asperjado	N/A
T1	Mamull®	20g/L	Bioinsumos Nativa spa.
T2	Tifi®	20g/L	Agrotecnologías Naturales S.L.

3.4 Aplicación de micorrizas comerciales

La aplicación de Micorrizas comerciales **AEGIS-Gel®** (M1) y **OIKO-RHIZA-E®** (M2) se realizó durante el proceso rutinario del vivero previo a la etapa de plantación en campo, el 30 de octubre del año 2017. Anterior a la plantación, los primordios radicales de las estacas injertadas se embebieron (10s aproximadamente), hasta quedar completamente impregnadas en una suspensión 1kg /L **AEGIS-Gel®** (*Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*; 1kg/L). De modo similar, estacas injertadas se humedecieron con agua en su zona basal que contiene los primordios radicales y se introdujeron en un recipiente hasta quedar completamente impregnadas por micorrizas comerciales en polvo (100 esporas/g) **OIKO-RHIZA-E®** (*Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon villosulfus*, *R. luteolus*, *R. amylopogon*, *R. fulvigleba* y *Scleroderma citrinun*). Además, estacas libres de aplicación de bioformulados comerciales de micorrizas, se utilizaron como tratamiento testigo (T0) (Cuadro 3.2). Las estacas se plantaron en campo en el año 2017 a una distancia de 0,1 m sobre hilera y 1,2 m entre hilera y cosechadas en la siguiente temporada (agosto, 2018). Finalmente, las plantas se plantaron en bolsas plásticas negras de 10 litros en un sustrato compuesto por una parte de turba, una parte de perlita y compost, y se trasladaron a dependencias de la Universidad de Talca.

Cuadro 3.2 Tratamientos de estacas de vid (cv. Cabernet Sauvignon, Clon #337, portainjerto 101-14) con bioformulados comerciales en base a micorrizas como **AEGIS-Gel®** (M1) y **OIKO-RHIZA-E®** (M2) y (M0) representa el testigo sin aplicación de micorrizas realizados previo a la plantación.

Tratamiento	Bioformulado	Dosis	Fabricante
M0	N/A	N/A	N/A
M1	AEGIS-Gel®	2,5 ml/planta	Italpollina
M2	OIKO-RHIZA-E®	5 g/planta	Oikos Chile Ltda.

3.5 Material fúngico

Los aislados fúngicos utilizados en este estudio fueron dos hongos de la madera, *Phaeomoniella chlamydospora* (aislado Pch-N°57) y *Diplodia seriata* (aislado DS-N°9) obtenidos desde plantas de vid cvs. Chardonnay y Cabernet Sauvignon, respectivamente, con síntomas de EMV. Ambos aislados fungosos pertenecen y fueron facilitados por el Laboratorio de Patología Frutal de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. Los hongos se cultivaron en placa Petri de 88 mm de diámetro en medio nutritivo agar papa dextrosa (APD) a 22°C con un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. Colonia de los cultivos fueron constantemente multiplicados cada 15 días, hasta que fueron utilizados tanto para extraer su ADN y como para realizar inoculaciones en plantas de vid.

3.6 Inoculación de hongos de la madera en plantas de vid

Se realizó según el método descrito por Péros y Berger 1994 (modificado). Brevemente, a 162 plantas de dos años, sometidas a los distintos tratamientos con *Trichoderma* spp. (T0, T1 y T2), y con Micorrizas (M0, M1 y M2), se les realizó una herida mediante un taladro con una broca (2 mm de diámetro) en la zona central de la planta (estaca original), 72 plantas se destinaron para la inoculación de *P. chlamydospora* y 72 plantas para *D. seriata*, respectivamente. En el orificio realizado en la planta con ayuda de una micropipeta se introdujo 30 uL de una suspensión de *Phaeomoniella chlamydospora* a una concentración de 1×10^6 conidias/mL o 30 uL de una suspensión (micelio y conidias) de *D. seriata* a 1×10^6 UFC/mL. Posteriormente, la herida se cubrió con Parafilm, las plantas se ubicaron de forma aleatoria bajo una malla sombreadora en las dependencias de la Universidad de Talca.

3.7 Conductancia estomática

Los valores de conductancia estomática (gs) se midieron a tres plantas por tratamiento (9 tratamientos) y por cada hongo patógeno inoculado (*P. chlamydospora* y *D. seriata*) en 27 plantas, respectivamente, durante los meses de enero-abril (148-239 DPI). Efectivamente, la conductancia estomática se midió a una hoja para cada planta en la zona media del crecimiento vegetativo de la temporada entre las 12:00h y 15:00h una vez por semana. El equipo utilizado fue el Porómetro (Leaf porometer, Decagon Devices, Inc) correctamente calibrado anterior a cada jornada de mediciones.

3.8 Determinación de clorofila

Las concentraciones de clorofila total se efectuaron a tres plantas de cada tratamiento y por cada hongo patógeno inoculado (n=27). Cada 21 días, entre los meses de enero y abril del año 2020 (141-246 DPI), se determinó la concentración de clorofila de hojas frescas usando el protocolo descrito por Warren (2008). El tejido fue congelado con nitrógeno líquido y macerado en molidor automatizado TissueLyserII (Qiagen). Posteriormente, se realizó una extracción con 1 mL de metanol seguido de un centrifugado de 2 min a 16000g, transfiriéndose el sobrenadante a un nuevo tubo y con el pellet se realizó una nueva extracción con 1 mL de metanol, repitiendo el centrifugado anterior. Ambos sobrenadantes se homogenizaron y 200 µL del extracto fue dispuesto en pocillos de una placa Elisa y se midió su absorbancia a 652nm y 665nm con el equipo NanoQuant Plate™ (Tecan, Barcelona, España). Finalmente, se realizó una corrección a ambas absorbancias para un volumen de 200 µL y matriz de metanol, a través de las fórmulas: $A_{652} = (Abs_{652}-blanco)/0,51$ y $A_{665} = (Abs_{665}-blanco)/0,51$, y se estimó la concentración de clorofila total con la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila Total} = 19,3443(Abs_{652}) + 4,3481(Abs_{665})$$

3.9 Determinación de almidón y azúcares en raíces

Raíces de vides se colectaron en reposo invernal el 22 de junio del 2019 (305 DPI), usando las mismas 27 plantas a las cuales se les determinó conductancia estomática y clorofila total e infectadas por *P. chlamydospora* y por *D. seriata*. Las raíces fueron pesadas y se congelaron con nitrógeno líquido, molidas con mortero y pistilo hasta obtener un polvo fino. Luego, se procedió a transferir 500 mg en tubos de 15 mL, a los que se les agregó 5 mL de etanol al 80% v/v agitándose vigorosamente e incubándose a 100°C por 10 minutos. Los tubos

fueron centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 50 mL. Se repitió dos veces la extracción al pellet resultante y aparte, se combinaron todos los sobrenadantes. Al pellet final se le determinó la concentración de almidón acorde al protocolo y kit R-Biopharm (Cat. No. 10 207 748 035). Los sobrenadantes homogenizados se usaron para la determinación de D-fructosa y D-glucosa a través de la reacción enzimática de Amiloglucosidasa monitoreada por absorbancia a 334 nm acorde al protocolo y el kit R-Biopharm (Cat. No. 10 139 106 035).

3.10 Determinación de macro y micro elementos en raíces

Nuevas raíces fueron colectadas a 305 DPI, 22 de junio del 2019, de las 27 plantas tratadas, las cuales fueron lavadas primero con agua potable y luego con una solución de ácido clorhídrico 0,3M y detergente libre de fosfato, para luego nuevamente ser lavadas con agua potable y finalmente enjuagadas con agua desionizada. El secado se realizó en una estufa a 80°C por un tiempo mínimo de 8 h; una vez secas se molieron en un molinillo y finalmente tamizadas.

Se pesó 0,5 g de muestra, se traspasó a un crisol y se dispuso en el interior de la mufla, calcinándose a: 200°C por 30 min, 300°C por 30 min, y luego a 550°C por 200 min. Una vez enfriadas, a las muestras se les agregó 10 mL de HCL 0,2M y se llevaron a placa calefactora a 150-155° C; luego se llevó a ebullición por 30-40 min, se dejó enfriar y se trasvasó a un matraz de aforo de 25 mL con agua ultrapura. El contenido se transfirió a un tubo de 50 mL y dejó decantar por 6h. La solución resultante se utilizó para la determinación de contenido de nutrientes por ICP OES, el cual fue calculado como partes por millón y porcentajes relativos en base a su peso seco. El contenido de nitrógeno fue determinado usando el método Kjeldahl (VELP DK 20 y UDK 129) (Benton, 1991); Ca, K, Mg, Na, P, S, Cu, Fe, Mn, y Zn fueron determinados por ICP-OES (Agilent 5100 DV).

3.11 Lesiones necróticas

A los 305 DPI, se procedió a medir la longitud de las lesiones producto del avance de la infección de los hongos inoculados. Para esto, se desprendió la corteza a lo largo con ayuda de un bisturí hasta donde se apreciara la decoloración o necrosis producida por desarrollo del hongo fitopatógeno. Se midió y registró las estrías con regla y pie de metro (n=27) para infección por *P. chlamydospora* y (n=27) para *D. seriata*.

3.12 Reaislado desde plantas inoculadas

El reaislado del respectivo patógeno inoculado se realizó colectando nueve astillas de cada planta de las zonas desde decoloración vascular o con necrosis con ayuda de un bisturí estéril y se flamearon en mechero de alcohol entre dos a tres segundos. Luego, se traspasaron tres astillas por placa, una con medio APD y dos con APDA (APD suplementado con 0,5 mL/L de ácido láctico, 0,005% tetraciclina, 0,01% estreptomina y 1% Igepal CO-630) (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) (Díaz y Latorre, 2014). Posteriormente, se incubó en placa plástica a 22 °C y un fotoperiodo de 12 horas de luz por 25 días. Finalmente, se observó y registró el crecimiento de las especies fungosas aisladas.

3.13 Extracción de ADN (*P. chlamydospora* y *D. seriata*) desde aislados puros

La extracción de ADN de los aislados puros de *Phaeomoniella chlamydospora* (aislado Pch-N°57) y de *Diplodia seriata* (aislado DS-N°9) fue realizado con micelio de colonias de 7 días de crecimiento en medio de cultivo APD. Para ello, se procedió colectando todo el micelio desde la placa Petri con ayuda de un bisturí estéril. El micelio se puso en un mortero esterilizado y se molió

completamente con nitrógeno líquido. La molienda resultante se transfirió a tubos de micro centrífuga de 2 mL y se procedió a la extracción de ADN genómico siguiendo las instrucciones del protocolo del kit 'Dneasy Plant mini kit' (Quiagen, Hilden, Alemania). Una vez obtenido el ADN, se confirmó su concentración usando el equipo NanoQuant Infinite Pro200 (Tecan, Barcelona, España).

3.14 Extracción de ADN desde plantas inoculadas (matriz leñosa)

Las plantas de vid fueron colectadas a 305 PDI, el 22 de junio del 2019. Se procedió a retirar la corteza con ayuda de un bisturí para luego extraer 1cm de longitud de madera en el punto de infección, dos zonas distales superiores (A y B, respectivamente) e inferiores al punto de infección (C y D, respectivamente) completando un total de cinco muestras por planta y tres plantas por tratamiento las cuales se utilizaron para la extracción de ADN total, genómico de vid y de los hongos inoculados, *P. chlamydospora* y *D. seriata*.

Los trozos de madera fueron cortados con una tijera de poda desinfectada en pequeños trozos y molidos en bolsas marca Bioreba con ayuda de un martillo junto con 2 mL de buffer CTAB, luego de la molienda se adicionó otros 2 mL de buffer CTAB, se homogenizó y se transfirió 1 mL a tubos de micro centrífuga de 2 mL. Para la obtención de ADN genómico puro, se procedió según las instrucciones del protocolo de extracción CTAB. La integridad y concentración de ADN fue determinada usando el equipo, NanoQuant Infinite Pro200 (Tecan, Barcelona, España) y mediante partidores del gen constitutivo actina (Bruissson et al., 2017).

3.15 Diseño de oligonucleótidos sintéticos y curvas estándar (qPCR)

Productos de PCR obtenidos con partidores del gen β -tubulina (Cuadro 3.3) fueron secuenciados por MacroGen (MacroGen Inc., Seúl, Corea), y una vez obtenidas, las secuencias fueron editadas utilizando el software Bioedit V7.2.5 y posteriormente comparadas con la base de datos GenBank perteneciente al National Center for Biotechnology (NCBI, EE.UU.), utilizando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Una vez corroborada la identidad de las secuencias se realizó el diseño de oligonucleótidos gBlock IDT (<http://www.idtADN.com>), diseñando un gBlock de 437bp para *D. seriata* y uno de 543bp para *P. chlamydospora* (este último previamente diseñado por CII de Viña Concha y Toro). Los oligonucleótidos se llevaron a dilución de trabajo de $2,22 \times 10^8$ copias/ μ L y $1,79 \times 10^{10}$ copias/ μ L. para cada hongo respectivamente.

Cuadro 3.3 Partidores utilizados para amplificar genes por PCR

Gen	Partidor	Secuencia	Referencia
β -tubulina	Bt2a	5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3'	Donaldson, 1995
β -tubulina	Bt2b	5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3'	Donaldson, 1995
β -tubulina	DseCQF	5' CTCTGCAATCGCTGACCCTTG 3'	Pouzoulet, 2017
β -tubulina	DseCQR	5' ACGTGTTTGTCTAACTAGTAGAGAGTACC 3'	Pouzoulet, 2017
β -tubulina	PhaChlam BTUBF	Confidencial *	Viña Concha y Toro
β -tubulina	PhaChlam BTUBR	Confidencial *	Viña Concha y Toro

* Información estratégica de Viña Concha y Toro sujeta a secreto industrial.

Para el diseño de las curvas estándar se procedió desde ADN extraídos a partir de cultivos puros, previamente chequeados para su concentración e integridad. Una vez determinada la concentración del stock de ADN, se realizó una dilución seriada a razón de 1:10, partiendo de una concentración conocida de 1,09 ng/μL y 20,7 ng/μL de *P. chlamydospora* y *D. seriata*, respectivamente, determinada con el equipo NanoQuant Infinite Pro200 (Tecan, Barcelona, España).

Paralelamente, se procedió al diseño de curvas estándar para *P. chlamydospora* y *D. seriata*, utilizando oligonucleótidos sintéticos (gBlock) como templados de ADN, sintetizados a partir de las secuencias obtenidas del aislado Pch-N°57 de *P. chlamydospora* y un oligonucleótido gBlock previamente diseñado por el Centro de Investigación e Innovación de Viña Concha y Toro para el hongo *D. seriata*.

El procedimiento usado en este caso consistió en realizar una dilución seriada (1:10) de 6 puntos del standard molecular sintético (gBlock) sintetizado por IDT (<http://www.idtADN.com>) partiendo de una concentración 1×10^5 copias/μL calculada según las indicaciones del fabricante. La mezcla de reacción de qPCR procedió en un volumen final de 10 μl, 5 μl 2x SYBR Green Master mix, partidor a concentración final de 0,5mM y 2 μl de agua ultra pura. La reacción se llevó a cabo en equipo Real-Time PCR system Quant Studio5 (ThermoFisher, EE.UU.) de 384 pocillos. Se utilizó el programa QuantStudio Design and Analysis software V1.5.1, con reacción de termociclado en modo standard, denaturación 120s a 95°C, 40 ciclos consistentes en 1s a 95°C (denaturación), 30s a 60°C (annealing y extensión) para finalmente realizar una curva de melting de 15s a 95°C, 60s a 60°C y 15s a 95°C.

3.16 Cuantificación por qPCR de *P. chlamydospora* y *D. seriata*

Desde el ADN extraído de las plantas de vid (madera) se llevó a cabo una estandarización de las concentraciones realizando un qPCR con partidores para el gen constitutivo de actina, ajustando las concentraciones mediante diluciones en un rango de valores entre los 23 y 27 ct (cycle threshold). Una vez ajustado este valor para el total de las extracciones de ADN se usaron 2 µL del extracto de ADN, el que fue usado como templado para los análisis cuantitativos de qPCR. La cuantificación se realizó acorde a las curvas estándar previamente diseñadas y los resultados fueron expresados en masa de ADN de hongo por masa de ADN total (fg/g) y por número de copias del gen β -tubulina por masa de ADN total (N°copias/g).

3.17 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial de dos factores, *Trichoderma* (T) y Micorrizas (M), y tres niveles denominados T0, T1, T2 y M0, M1, M2, respectivamente. Puesto que es un diseño factorial (3x3) se obtuvieron 9 tratamientos con 18 réplicas por tratamiento (plantas de vid) con un total de 162 plantas. La mitad del total de las plantas (n=81) se destinaron para inoculación con *Phaeoconiella chlamydospora* y el resto (n=81) para inoculación con *Diplodia seriata*, dejando dos plantas sin inocular (control negativo), respectivamente. Del total de plantas obtenidas se evaluaron tres plantas para cada tratamiento y para cada ensayo de inoculación con los hongos causales de EMV mencionados anteriormente. Las plantas en sus bolsas de cultivo fueron dispuestas al azar en dependencias del Laboratorio de Patología Frutal de la Universidad de Talca, Campus Talca, Talca.

El análisis estadístico se realizó con el software Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.03. Los datos fueron analizados por test de Shapiro-Wilk para

establecer si los datos se distribuían normalmente y con el test de Levene's para evaluar la homogeneidad de varianza. Luego, los datos fueron sujeto de análisis de varianza de dos vías (ANDEVA). Los datos que no presentaron distribución normal fueron analizados por test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Estos test, permitieron determinar los principales efectos de la inoculación por *Trichoderma* (T0, T1 Y T2) y Micorrizas (M0, M1 y M2) y la interacción entre ellos. Cuando algunos de los factores presentaron diferencias significativas (p -valor < 0,05) fue usado el test de Tukey para establecer diferencias entre los niveles del factor. El análisis de componentes principales se realizó con el software Matlab versión R2020b.

IV. RESULTADOS

4.1 Lesiones producto de los hongos de madera inoculados

A los 305 DPI, cuando las plantas de vid entraron en etapa de receso invernal, se determinó la dimensión de las lesiones provocadas por el crecimiento y desarrollo de los hongos de la madera inoculados *P. chlamydospora* y *D. seriata* (Figura 4.1). Se pudo observar una decoloración vascular, posterior al punto de inoculación de los hongos de la madera inoculados (Figura 4.1b y 4.1c).



Figura 4.1. Decoloración vascular en vid cv. Cabernet Sauvignon sobre porta injerto 101-14 (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*) a los 305 días post infección (DPI) con *Phaeomoniella chlamydospora* (b) y *Diplodia seriata* (c). Controles sin inoculación en donde se incorporó agua estéril en el punto de inoculación (a). Flechas indican los puntos de inoculación.

En todos los tratamientos a los cuales se les inoculó hongos patógenos se observó decoloraciones vasculares cuando fue retirada la corteza del tronco Figura 4.1. Por el contrario, la planta control que solo se introdujo agua no se observaron lesiones. En el resultado de la medición de longitud de las

decoloraciones vasculares internas, producto de la inoculación de hongos fitopatógenos, no presentó diferencias significativas entre los factores de los tratamientos, ($p < 0,05$), ya sea para las plantas infectadas por *P. chlamydospora* o *D. seriata* (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1 Longitud de las lesiones necróticas (mm) producidas por *P. chlamydospora* y *D. seriata* en plantas tratadas con bioformulados comerciales de *Trichoderma* (T), (T0, sin inóculo), (T1, Mamull®), (T2, Tifi®), Micorriza (M), (M0, sin inóculo) (M1, Aegis-gel®), (M2, Oiko-Rhiza-E®) y testigo sin inoculación (T0M0). En las lesiones posterior a 305 días post infección (DPI), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los factores de los tratamientos ($p < 0,05$).

	<i>P. chlamydospora</i>				<i>D. seriata</i>			
	T0	T1	T2	Media	T0	T1	T2	Media
M0	137,0	181,6	98,3	139,0	186,6	185,0	105,0	158,9
M1	110,0	83,3	76,0	89,8	173,3	130,0	81,6	128,3
M2	124,0	107,3	80,3	103,9	230,6	205,0	164,5	200,1
Media	123,7	124,1	84,9		196,9	173,3	117,1	
	ANDEVA				ANDEVA			
<i>Trichoderma</i> (T)	Valor p 0,1710				Valor p 0,3024			
Micorrhiza (M)	Valor p 0,1125				Valor p 0,3923			
T x M	Valor p 0,6299				Valor p 0,9960			

Sin embargo, se destaca la combinación de factores (T2M1) entre todos los tratamientos de bioformulados comerciales y para ambos hongos inoculados presentando en ambos casos la media más baja de longitud de lesiones necróticas para los hongos fitopatógenos inoculados *P. chlamydospora* y *D. seriata*. Cuadro 4.1.

4.2 Reaislado desde vides inoculadas

Todos los inoculados de *P. chlamydospora* (100%) fueron reaislados tras su siembra en medios de cultivo. Sin embargo, solo un 1,2% de las muestras sembradas de *D. seriata* fueron reaisladas. La Figura 4.2a y Figura 4.2b. muestra las colonias representativas desde los reaislados realizados desde virutas de madera donde se presentaron las decoloraciones vasculares.

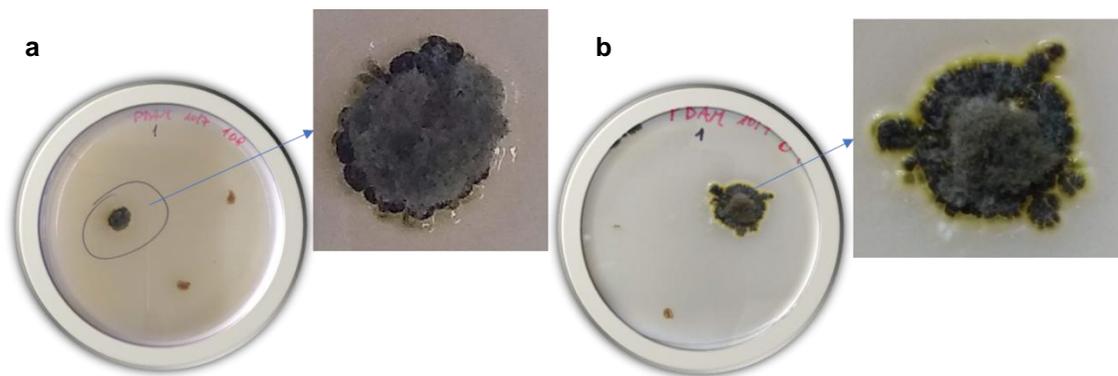


Figura 4.2. Colonia típica de *Diplodia seriata* (a) y *Phaeoconiella chlamydospora* (b) en medio de cultivo APD obtenidos desde madera del tronco de vides tratadas con bioformulados comerciales de *Trichoderma* (T) y Micorriza (M).

4.3 Efecto de *P. chlamydospora* sobre la conductancia estomática

El efecto de la conductancia estomática entre los meses de enero-abril año 2020, (148 – 239 DPI) en plantas de vid, cv. Cabernet Sauvignon/114-10, tratadas con bioformulados comerciales basados de *Trichoderma* (T) y micorrizas (M) posteriormente infectados por *P. chlamydospora*, se observan en el Cuadro 4.3. Donde se puede apreciar que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), con la excepción de la medición a 218 DPI de fecha 25 de marzo del año 2019, correspondiente al factor micorriza (M) (p -valor=0.0136),

la cual no representa una tendencia en los valores registrados durante la temporada. Los que en general se mantienen entre (160-590 mmol/m²s).

4.4 Efecto de *Diplodia seriata* sobre la conductancia estomática

Los resultados de conductancia estomática (gs) en plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon/114-10 presentan en tres mediciones durante la temporada valores con diferencias estadísticamente significativas (p-valor =0,0194, 0,0274 y 0,0220), en el factor micorriza (M) a 176, 183 y 211 DPI, fechas 12,19 de febrero y 18 de marzo, respectivamente. Además, Se observaron diferencias estadísticamente significativas en (M1, Mamull®) a 176DPI con medias por debajo de los valores del testigo (M0), Cuadro 4.4. Sin embargo, este fue un caso puntual que no representó una tendencia, en los resultados referente a las 14 semanas de registros de la conductancia estomática. Es decir, los valores de conductancia estomática en plantas de vid tratadas con bioformulados comerciales de *Trichoderma* (T) y Micorrizas (M) se observaron valores de conductancia estomática dentro de los rangos esperados para plantas de vid.

Cuadro 4.3 Conductancia estomática (gs) promedio correspondiente al grupo de plantas Tratadas con bioformulados de *Trichoderma* (T), (T0, agua), (T1, Mamull®), (T2, Tifi®), Micorriza (M), (M0, sin inóculo), (M1, Aegis-gel®), (M2, Oiko-Rhiza-E®) infectadas por *Phaeomoniella chlamydospora*. NS: No Significativo; * Significativo (p<0,05); promedios en una columna seguidos por la misma letra, no difieren estadísticamente según test HSD Tukey (p<0,05)

Conductancia Estomática (mmol/m²s), *P. chlamydospora*

Tratamientos	Días Post Inoculación (DPI)													
	148	155	162	169	176	183	190	197	204	211	218	225	232	239
<i>Trichoderma</i> (T)														
T0 Agua	337,4	519,5	496,8	508,0	471,0	475,5	402,5	438,3	415,4	355,1	271,1	262,0	218,6	169,6
T1 Mamull®	392,7	591,3	552,9	550,5	522,9	550,3	501,0	489,2	399,8	364,9	296,9	256,9	237,3	209,7
T2 Tifi®	289,6	472,2	465,1	523,7	470,0	504,3	477,8	474,6	403,0	375,8	289,4	216,8	222,8	208,5
Micorrizas (M)														
M0 Agua	335,5	510,4	489,2	528,5	469,1	539,6	473,2	472,5	411,0	362,4	326,7 b	272,2	261,5	208,1
M1 Aegis-gel®	320,5	536,3	499,2	501,8	469,1	479,6	445,8	461,0	414,0	379,6	290,2 ab	223,7	208,5	179,6
M2 Oiko-Rhiza-E®	363,6	536,3	526,4	551,9	525,7	510,9	462,3	468,6	393,2	353,8	240,5 a	239,8	208,8	200,0
ANDEVA														
<i>Trichoderma</i> (T)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Micorrizas (M)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
T x M	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Cuadro 4.4 Conductancia estomática (gs) promedio correspondiente al grupo de plantas Tratadas con bioformulados de *Trichoderma* (T), (T0, agua), (T1, Mamull®), (T2, Tifi®), Micorriza (M), (M0, sin inóculo), (M1, Aegis-gel®), (M2, Oiko-Rhiza-E®) infectadas por *Diplodia seriata*. NS: No Significativo; * Significativo (p<0,05); promedios en una columna seguidos por la misma letra, no difieren estadísticamente según test HSD Tukey (p<0,05).

Tratamientos	Conductancia Estomática (mmol/m ² s), <i>Diplodia seriata</i>													
	Días Post Inoculación (DPI)													
	148	155	162	169	176	183	190	197	204	211	218	225	232	239
<i>Trichoderma</i> (T)														
T0 Agua	272,5	502,2	504,5	526,6	487,9	487,2	400,0	455,6	405,8	384,1	267,8	250,8	244,6	197,2
T1 Mamull®	338,1	549,7	563,5	551,6	561,2	559,8	464,5	452,6	438,1	392,0	327,4	314,8	254,8	211,4
T2 Tifi®	321,4	587,6	517,2	526,6	540,6	503,4	484,3	489,6	459,2	358,2	320,5	261,3	239,4	182,1
Micorrizas (M)														
M0 Agua	342,9	592,9	545,6	551,6	558,5 b	548 ab	465,8	495,4	447,8	353 ab	334,9	263,7	247,7	196,1
M1 Aegis-gel®	306,4	535,6	488,7	502,6	467,3 a	451,7 a	427,5	433,1	387,9	344,3 a	259,0	253,6	214,6	181,7
M2 Oiko-Rhiza-E®	282,7	511,0	550,9	531,5	563,9 b	550,6 b	455,5	469,4	467,3	436,8 b	321,8	309,6	276,5	212,9
ANDEVA														
<i>Trichoderma</i> (T)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Micorrizas (M)	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS
T x M	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

4.5 Efecto de *P. chlamydospora* en el contenido de clorofila

El efecto de *P. chlamydospora* sobre las concentraciones de clorofila total en plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon/114-10 previamente tratadas con bioformulados de *Trichoderma* (T) y Micorriza (M) entre los meses de enero y abril, 141-246 DPI se observaron diferencias estadísticamente significativas en el factor *Trichoderma* (T) (p-Valor 0,0009; 0,0282 y 0,0434) a 162, 183 y 204 DPI Respectivamente, y en el nivel (T1, Mamull®) a 162 y 204 DPI se observó diferencias significativas con una media mayor en las concentraciones clorofila total respecto al testigo (T0, agua). Mientras, en los restantes análisis no se presentaron diferencias significativas en los factores de los tratamientos, ni se evidencio interacción entre ellos. Cuadro 4.5.

Cuadro 4.5 Concentración promedio de clorofila total ($\mu\text{g/mL}$) total (enero-abril) 141-246 DPI, en plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon/110-14 tratadas con bioformulados de *Trichoderma* (T), (T0, agua), (T1, Mamull®), (T2, Tifi®), Micorriza (M), (M0, sin inóculo), (M1, Aegis-gel®), (M2, Oiko-Rhiza-E®) infectadas por *P. chlamydospora*.

Tratamientos	Clorofila, ($\mu\text{g/mL}$) <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>					
	Días Post Inoculación (DPI)					
	141	162	183	204	224	246
<i>Trichoderma</i> (T)						
T0 Agua	16,8	16,7 a	18,1 ab	19,6 a	17,3	15,2
T1 Mamull®	16,9	22,2 b	18,8 b	26,2 b	21,1	17,2
T2 Tifi®	14,2	14,1 a	14,0 a	23,9 ab	17,6	16,5
Micorrizas (M)						
M0 Agua	16,1	17,6	17,1	23,0	18,6	14,9
M1 Aegis-gel®	15,9	16,9	18,2	24,5	20,3	16,3
M2 Oiko-Rhiza-E®	15,9	18,5	15,6	22,1	17,1	17,8
ANDEVA						
<i>Trichoderma</i> (T)	NS	***	*	*	NS	NS
Micorrizas (M)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
T x M	NS	NS	NS	NS	NS	NS

4.6 Efecto de *D. seriata* en el contenido de clorofila

La consecuencia de *D. seriata* sobre las concentraciones de clorofila total en plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon/114-10 tratadas con bioformulados de *Trichoderma* (T) y Micorriza (M) analizados a 141-246 DPI, enero-abril 2019, se observó diferencias estadísticamente significativas con una media mayor en las concentraciones clorofila total respecto al testigo (T0, agua) en el factor *Trichoderma* (T) a 141, 224 y 246 DPI, (p-valor 0,0221; 0,0287 y 0,0287) respectivamente, y en el factor Micorriza (M) a 224 DPI, (p-valor 0,0390) además, se evidenció interacción entre factores (TxM) a 224DPI, (p-valor 0,0074), y solo en el primer punto de medición a 141 DPI se presentaron diferencias significativas en el nivel (T1, Mamull®) respecto al testigo (T0, agua). Cuadro 4.6. Sin embargo, al igual que el caso anterior (*P. chlamydospora*) no representa una tendencia en los resultados del presente trabajo.

Cuadro 4.6 Concentración promedio de clorofila total (µg/mL) (enero-abril) a 141-246 DPI, en plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon/110-14 tratadas con bioformulados de *Trichoderma* (T), (T0, agua), (T1, Mamull®), (T2, Tifi®), Micorriza (M), (M0, sin inóculo), (M1, Aegis-gel®), (M2, Oiko-Rhiza-E®) infectadas por *D. seriata*.

Tratamientos	Clorofila, (µg/mL) <i>Diplodia seriata</i>					
	Días Post Inoculación (DPI)					
	141	162	183	204	224	246
<i>Trichoderma</i> (T)						
T0 Agua	14,9 a	16,8	13,4	15,7	18,2	15,9ab
T1 Mamull®	19,0 b	17,2	17,3	16,5	20,9	19,0b
T2 Tifi®	14,6 a	15,9	15,1	14,7	16,7	13,1a
Micorrizas (M)						
M0 Agua	16,7	17,1	14,7	16,8	20,8	17,5
M1 Aegis-gel®	16,1	16,8	16,8	15,2	18,2	15,3
M2 Oiko-Rhiza-E®	15,6	16,0	14,3	14,8	16,8	15,2
ANDEVA						
<i>Trichoderma</i> (T)	*	ns	ns	ns	*	*
Micorrizas (M)	ns	ns	ns	ns	*	ns
T x M	ns	ns	ns	ns	**	ns

4.7 Efecto de *P. chlamydo*spora sobre el contenido nutricional, almidón, fructosa y glucosa en raíces

El análisis de componentes principales (ACP) de macroelementos, microelementos, azúcares y fotoasimilados de reserva presentes en raíces, permitió separar tratamientos del grupo testigo (T0M0) en plantas inoculadas por *P. chlamydo*spora. Sin embargo, la varianza explicada por este modelo fue de un 4,25 % en su tercera componente Figura 4.3. Por el contrario, el modelo de ACP en las plantas de vid inoculadas por *D. seriata* no se observó la separación de tratamiento frente al grupo testigo.

4.7.1 Análisis de componentes principales sobre contenidos nutricionales y fotoasimilados en vid infectadas por *P. chlamydo*spora

El efecto de la inoculación de *P. chlamydo*spora en los contenidos nutricionales de macroelementos y microelementos, almidón, fructosa y glucosa presentes en las raíces de plantas de vid, a 305 DPI, se realizó mediante un análisis de componentes principales (ACP), en el cual se logró separar del grupo testigo T0M0 los tratamientos T1M2, T2M2, T2M1 y T2M0 en su tercera componente. Sin embargo, la tercera componente contiene un 4,25% de la varianza explicada (EV). Además, se observa que el tratamiento testigo T0M0 presenta menores niveles de sus componentes, con excepción de glucosa, respecto a los tratamientos T1M2, T2M2, T2M1 y T2M0 y que a su vez contienen mayores contenidos fructosa y almidón, macroelementos (N, P y K) y microelementos analizados Figura 4.3. Los ACP respecto a la primera componente explican un 85% de la varianza, pero no se logra la separación de los tratamientos en relación a los componentes analizados.

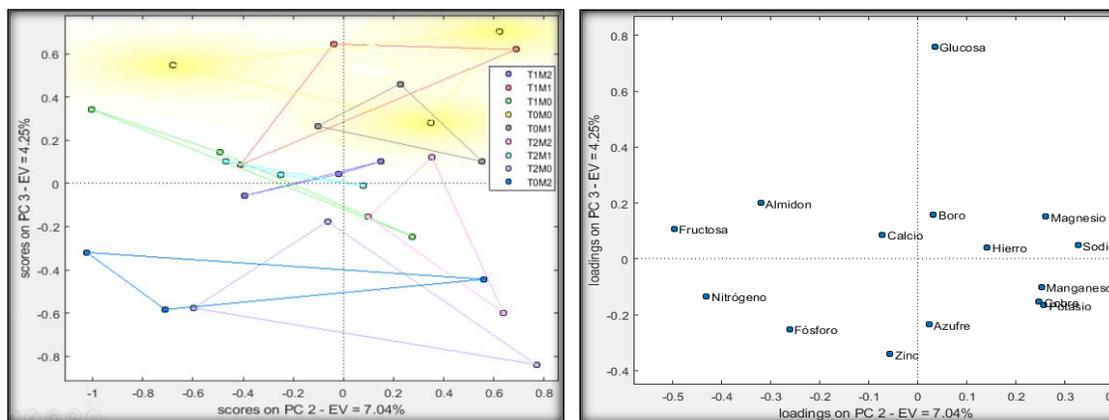


Figura 4.3 Análisis de componentes principales (ACP) realizado con las variables del contenido nutricional (Macroelementos y microelementos), almidón, fructosa y glucosa para plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon/114-10 inoculadas con *P. chlamydospora* y tratadas con bioformulados de *Trichoderma* (T), (T0, agua), (T1, Mamull®), (T2, Tifi®), Micorriza (M), (M0, sin inóculo), (M1, Aegis-gel®), (M2, Oiko-Rhiza-E®).

4.7.2 Análisis de componentes principales sobre contenidos nutricionales y fotoasimilados en vides infectadas por *Diplodia seriata*

Los resultados referentes al análisis de componentes principales (ACP) obtenidos de datos nutricionales de macroelementos y microelementos, almidón, fructosa y glucosa presentes en las raíces de las plantas de vid, a 305 DPI, indican que no se logró separar tratamientos en ningunas de las tres componentes analizadas. Al graficar la segunda y tercera componente se obtiene un 6,6% y 4,7% de la varianza explicada para la segunda y tercera componente, respectivamente (Figura 4.4).

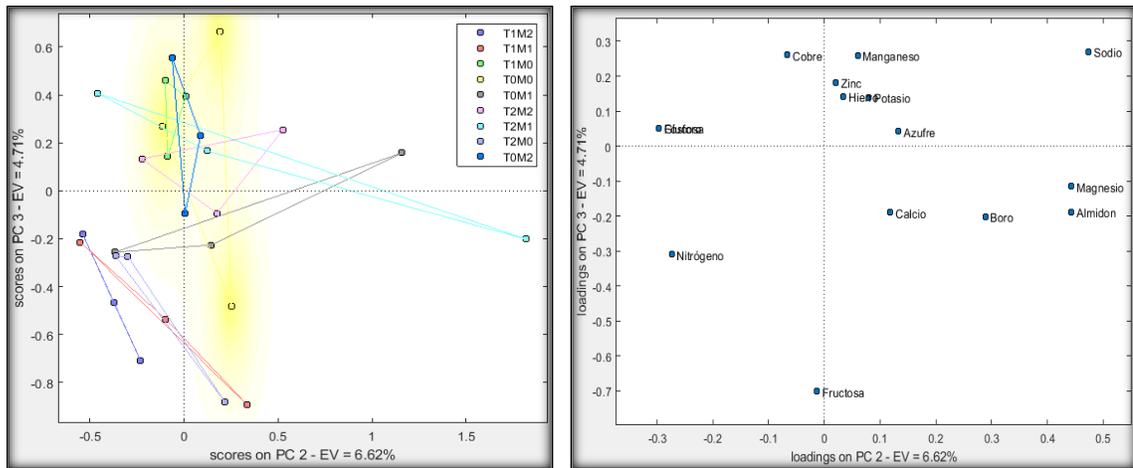


Figura 4.4 Análisis de componentes principales (ACP) realizado con las variables del análisis nutricional (Macroelementos y microelementos), almidón, fructosa y glucosa en plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon/114-10 tratadas con bioformulados de *Trichoderma* (T), (T0, agua), (T1, Mamull®), (T2, Tifi®), Micorriza (M), (M0, sin inóculo), (M1, Aegis-gel®), (M2, Oiko-Rhiza-E®) e infectadas por *D. seriata*.

4.7.3 Contenido de almidón, glucosa y fructosa en raíces de vides inoculadas por *Phaeomoniella chlamydospora*

Los contenidos de almidón, glucosa y fructosa en raíces de plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon/110-14 analizadas a 305 DPI presentaron diferencias estadísticamente significativas en el factor *Trichoderma* (T) en los contenidos de glucosa y fructosa (p-valor 0,0412 y 0,0005) respectivamente, e interacción entre los factores (TxM) (p-valor 0,0410) en el contenido de fructosa. Adicionalmente, test de Tukey nos evidencia diferencias significativas en el contenido de fructosa nivel (T2, Tifi®) comparado con el testigo (T0, agua) y (T1, Mamull®) (Cuadro 4.7).

4.7.4 Contenido de almidón glucosa y fructosa en raíces de vides inoculadas por *Diplodia seriata*

Los contenidos de almidón, glucosa y fructosa en raíces de plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon/110-14 analizadas a 305 DPI no presentaron diferencias

estadísticamente significativas en los factores de *Trichoderma* (T) y Micorriza (M) a su vez tampoco se presentaron interacción significativa entre los factores de *Trichoderma* y Micorriza (TxM) Cuadro 4.7 para el total de fotoasimilados analizados, almidón, glucosa y fructosa.

Cuadro 4.7 Contenido de almidón, glucosa y fructosa en raíces de plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon/110-14 a 305 DPI tratadas con bioformulados de *Trichoderma* (T), (T0, agua), (T1, Mamull®), (T2, Tifi®), Micorriza (M), (M0, sin inóculo), (M1, Aegis-gel®), (M2, Oiko-Rhiza-E®) infectadas por *Phaeomoniella chlamydospora* y *Diplodia seriata*.

Almidón (g/100g).

	<i>P. chlamydospora</i>				<i>D. seriata</i>			
	T0	T1	T2	Media	T0	T1	T2	Media
M0	0,0083	0,0108	0,0068	0,0087	0,0033	0,0029	0,0047	0,0036
M1	0,0053	0,0080	0,0066	0,0067	0,0032	0,0061	0,0026	0,0040
M2	0,0089	0,0040	0,0033	0,0054	0,0025	0,0083	0,0027	0,0045
Media	0,0075	0,0076	0,0056		0,0030	0,0058	0,0033	
	ANDEVA				Kruskal-Wallis			
<i>Trichoderma</i> (T)	Valor p 0,4317				Valor p 0,9873			
Micorrhiza (M)	Valor p 0,1886							
T x M	Valor p 0,00001							

Glucosa (g/100g).

	<i>P. chlamydospora</i>				<i>D. seriata</i>			
	T0	T1	T2	Media	T0	T1	T2	Media
M0	1,9x10 ⁻⁴	1,3 x10 ⁻⁴	8,5x10 ⁻⁷	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴	3,2x10 ⁻⁵	9x10 ⁻⁵
M1	1,4x10 ⁻⁴	1,7x10 ⁻⁴	8,1x10 ⁻⁵	1,3x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴	0	1,3x10 ⁻⁴	9x10 ⁻⁵
M2	2,2x10 ⁻⁵	9,8 x10 ⁻⁵	5,4x10 ⁻⁵	5,8x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁴	6x10 ⁻⁶	1,6x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁴
Media	1x10 ⁻⁴ ab	1x10 ⁻⁴ b	5x10 ⁻⁵ a		1x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁴	
	ANDEVA				ANDEVA			
<i>Trichoderma</i> (T)	Valor p 0,0412 *				Valor p 0,2641			
Micorrhiza (M)	Valor p 0,1165				Valor p 0,7311			
T x M	Valor p 0,1999				Valor p 0,4639			

Fructosa (g/100g).

	<i>P. chlamydospora</i>				<i>D. seriata</i>			
	T0	T1	T2	Media	T0	T1	T2	Media
M0	6x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁴	8 x10 ⁻⁵	1,5x10 ⁻⁴	2,6x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁴	1,8x10 ⁻⁴
M1	4x10 ⁻⁵	8x10 ⁻⁵	2x10 ⁻⁴	1 x10 ⁻⁴	1,5x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁴	1,1x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁴
M2	2x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁵	2x10 ⁻⁴	1,2x10 ⁻⁵	1,1x10 ⁻⁴	1,6x10 ⁻⁴	1,5x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁴
Media	9x10 ⁻⁵ a	6x10 ⁻⁵ a	2x10 ⁻⁴ b		1,4x10 ⁻⁴	1,9x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁴	
	ANDEVA				ANDEVA			
<i>Trichoderma</i> (T)	Valor p 0,0005 ***				Valor p 0,2322			
Micorrhiza (M)	Valor p 0,1867				Valor p 0,3151			
T x M	Valor p 0,0410 *				Valor p 0,5040			

4.8 ADN de hongos patógenos desde cultivo axénico para diseño de g-block y curvas estándar

Como resultado del ADN extraído desde cultivos puros de aislados de *P. chlamydospora* y *D. seriata* aislados Pch-N°57 y Ds-N°9, respectivamente, se logró la amplificación y secuenciación del fragmento de 200pb correspondiente al gen de β -tubulina, permitiendo el diseño de sondas de oligonucleótidos sintéticos de ADN (g-block) para el uso como estándar en el desarrollo e implementación de curvas de calibración. Paralelamente, el ADN genómico purificado y cuantificado se utilizó en el diseño de las curvas estándar, según corresponda.

4.9 Diseño de gBlock

A partir del producto de PCR del gen β -tubulina desde ADN de los aislados puros de *D. seriata* y *P. chlamydospora* Ds-N°9 y Pch-N°57, respectivamente, se obtuvieron secuencias que permitieron el correcto alineamiento (Figura 4.4) y diseño y síntesis de oligonucleótidos sintéticos g-block. No obstante, para *P. chlamydospora* se utilizó un gBlock previamente diseñado y facilitado por el Centro de Investigación e Innovación de Viña Concha y Toro.

Las secuencias obtenidas fueron las siguientes:

gBlock *Diplodia seriata* (diseño del presente estudio)

>*Diplodia seriata* isolate Bot-2018-S22 beta-tubulin (Btub) gene.

```
GGTGCTGCTTTCTGGTTTGTTGCCAAAACACTCCCGCTGCCGCGCCCCC  
GCTGACGCCAATCGACACCACAGGCAGACTATCTCTGGCGAGCACGGCCT  
GGACGGCTCCGGCGTGTAAGTTTGCGCTGTCTTTGCCGCGCTCTGCAATC  
GCTGACCCTTGGCAGCTACAATGGCACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCA  
TGAACGTCTACTTCAACGAGGTA CTCTACTAGTTAGACAAACACGTAAAG  
TATGGCAATCTTCTGAACGCGCAGCAGGCATCCAACAATAAGTACGTTCT  
CGTGCTGTCCTCGTTGACCTCGAGCCCGGCACCATGGATGCCGTCCGCGC
```

CGGCCCTTCGGCCAGCTCTTCCGTCCCAGCAACTTCGTTTTCGGCCAGT
CTGGTGCCGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTA

gBlock *Phaeomoniella chlamydospora* (diseño de CII)

CCGCACCCACCTTCGCTCTTCTGCCATTGTACCTGCTTTACTGACGTGAA
CTTTGCTTGACTACAGGTTTCATCTTCAAACCGGCCAATGTGTAAGTCATATT
TGACTCCTAATACTGCGAGATTTGTTGCTGACGACGTCCAGGGTAACCAA
TTGGTGCTGCCTTCTGGTAAGCCATAACCCCTCTAACCTCGACGACTACA
GACGCGCCAGACAAGAACGATGCTCACATCGCATTAGGCAAACAATCTCTG
GTGAACACGGCCTTGATGGCTCTGGTGTGTAAGTTCAATCGACTCTCATA
TGATAACCATGGTTCACTGATCTTGGAACAGCTACAATGGAACCTCCGACCT
CCAACCTTGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTAAGTTGAGAAGAGTCT
TTCCACTACGATACATAACAATACTAATCTCCATTAGGCGTCTGGCAACAAGT
ATGTCCCACGTGCCGTCCTCGTCGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCT
GTCCGTGCAGGTCCATTGGTCAACTTTTCCG

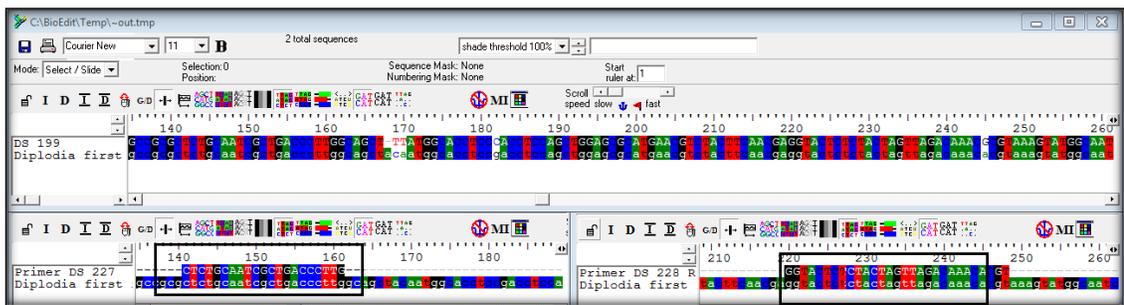


Figura 4.4 Alineamiento de secuencias, software BioEdit, con partidores específicos para *D. seriata*. Se observa el perfecto alineamiento de la pareja de primers (recuadros negros) en la secuencia molde que se utilizó para el diseño del gBlock.

4.10 Curva estándar *P. chlamydospora* y *D. seriata*

Las curvas estándar con mejor eficiencia, error y R^2 se seleccionaron para realizar la cuantificación de los hongos patógenos. Para el caso de *P. chlamydospora* la curva seleccionada presentó una eficiencia de 98%, error=0,058, $R^2=0,995$ y una ecuación $Y= -3,368X + 35,359$.

De forma similar para cuantificación de *D. seriata* se seleccionó la curva estándar que presentó una eficiencia de 101%, error=0,026, $R^2=0,999$ y la ecuación representada por $Y=-3,285 + 43,125$. Figura 4.5.

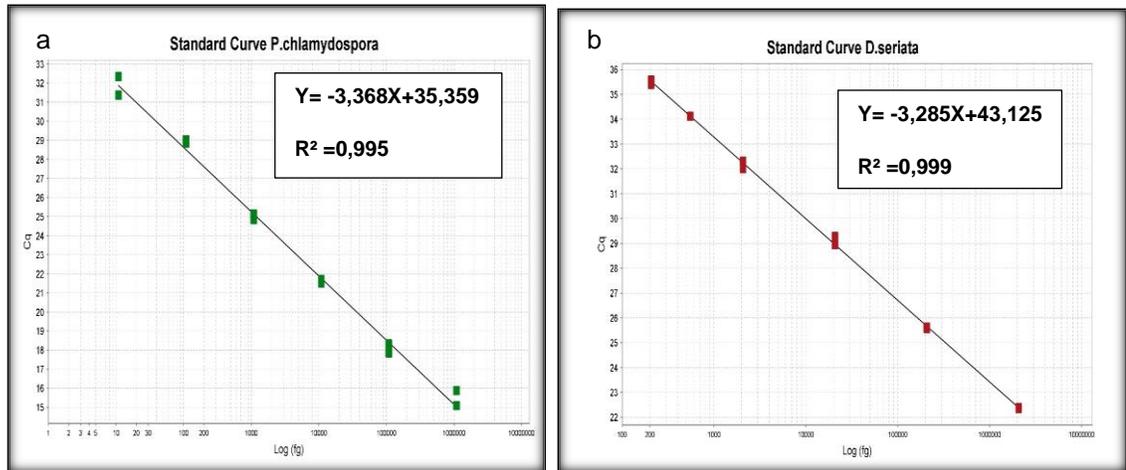


Figura 4.5 Curvas estándar. *Phaeoemoniella chlamydospora* (a), *Diplodia seriata* (b), en recuadro se observan las ecuaciones con su R^2 , respectivamente, generadas por dilución seriada (1:10) de ADN genómico partiendo de 1,09 ng/ μ L y 20,7ng/ μ L respectivamente.

4.11 Cuantificación genómica (qPCR) de hongos de la madera

A partir de las curvas de calibración generadas se procedió al chequeo de la calidad e integridad del ADN extraído en las cinco zonas previamente determinadas por cada planta mediante amplificación por qPCR usando partidores específicos para el gen de actina. Una vez ajustado los valores de CT en un rango de 25-29CT para una amplificación exitosa del gen β -tubulina con el

set de partidores previamente reportados Cuadro 3.3, se procedió con qPCR y posterior cuantificación usando las curvas ya descritas anteriormente Figura 4.5a y 4.5b. En la Figura 4.6 y Figura 4.7 se observa la cuantificación en unidad de fentogramos (fg) a través de las cinco zonas evaluadas. Se destaca entre los resultados que el punto de inoculación presenta la mayor cantidad de ADN para la mayoría de los tratamientos; la colonización en mayor medida hacia el extremo apical de la planta y en el tratamiento T1M2 solo se cuantifica ADN de *D. seriata* en el punto de inoculación. Adicionalmente los tratamientos T0M1 y T2M2 se detectó y cuantificó ADN de *D. seriata* en un punto bajo la zona de inoculación. Mientras en el resto de los tratamientos se detectó y cuantificó en las cinco zonas analizadas.

4.11.1 Cuantificación de *Phaeomoniella chlamydospora*

Para la cuantificación de ADN mediante qPCR correspondiente a estacas de vid tratadas con bioformulados de *Trichoderma* (T) y Micorrizas (M) comerciales e inoculadas por *P. chlamydospora* se observó un mayor contenido en el punto de inoculación, continuado de las secciones superiores (A y B) obteniéndose en todos los tratamientos una mayor cuantificación en las secciones superiores al punto de inoculación en las plantas.

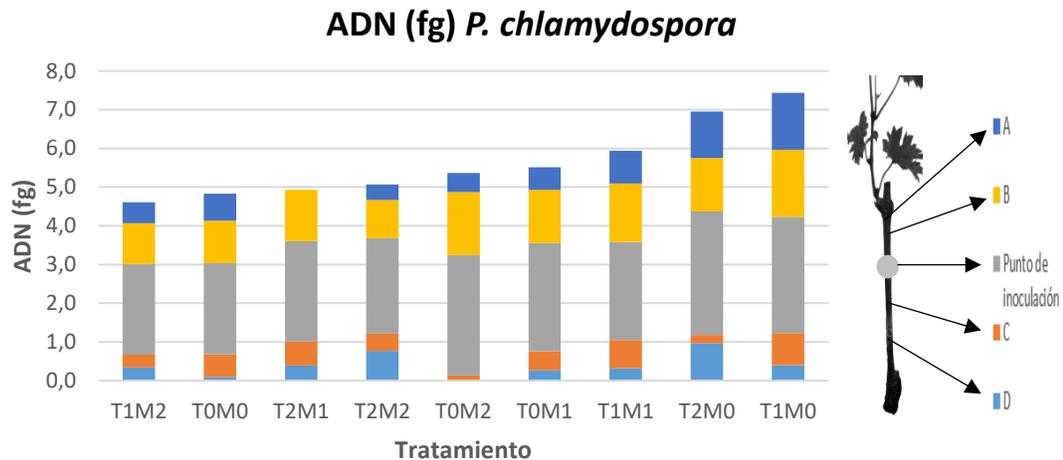


Figura 4.6 Cuantificación de ADN (fg) por qPCR de cinco zonas del tronco a 305 DPI, para plantas de vid tratadas con dos bioformulados comerciales de *Trichoderma* (T), (T0, agua), (T1, Mamull®), (T2, Tifi®), Micorriza (M), (M0, sin inóculo), (M1, Aegis-gel®), (M2, Oiko-Rhiza-E®) y posteriormente infectados por *P. chlamydospora*. Las letras (A, B, C y D) y el “Punto de inoculación” representan las cinco zonas de donde se extrajo ADN para su cuantificación.

En todos los tratamientos realizados con bioformulados comerciales de *Trichoderma* (T) y Micorriza (M) e inoculados por *P. chlamydospora*, se observa que la colonización ocurre en todo el largo del tronco, en las cinco zonas analizadas, a 305 DPI en rangos desde 4,6-7,4 fg T1M2 4,6; T0M0 4,8; T2M1 4,9; T2M2 5,1; T0M2 5,4; T0M1 5,5; T1M1 5,9; T2M0 6,9 y T1M0 7,4 fg. respectivamente. El contenido de ADN en la zona de inoculación fue en promedio 2,7 fg seguido por la zona (B) 1,3 fg, entre todos los tratamientos testeados (Figura 4.6).

4.11.2 Cuantificación de *Diplodia seriata*

En la cuantificación realizada a las plantas infectadas por *D. seriata* se evidencia que el tratamiento T1M2 no presenta cantidades cuantificables por qPCR en zonas diferentes al punto de inoculación. Además, en los tratamientos T0M1 y

T2M2 en las zonas A y B no hubo cantidades cuantificables, mientras que se detectó y cuantificó 0,8 y 0,9 fg en la zona inferior al punto de inoculación C y D, respectivamente. El contenido promedio de ADN en el total de los tratamientos fue: T0M1 3,6; T1M2 3,6; T2M2 3,7; T0M0 5,9; T1M1 7,9; T1M0 9,4; T2M1 9,5; T0M2 9,9 y T2M0 14,4 fg y la cantidad de ADN promedio en la zona de inoculación fue de 3,1 fg entre el total de los tratamientos analizados. Y en segundo lugar la zona B con 1,4 fg. Figura 4.7.

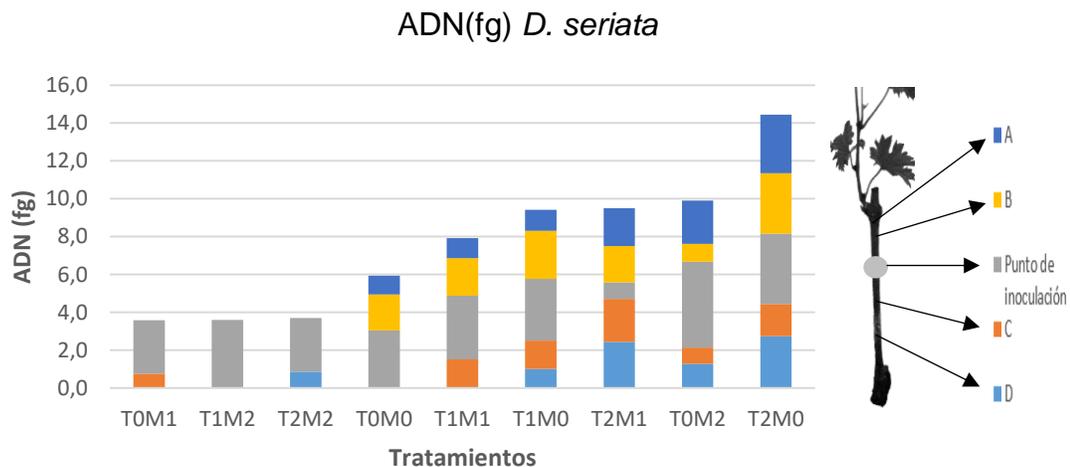


Figura 4.7 Cuantificación de ADN (fg) por qPCR de cinco zonas del tronco a 305 DPI, para plantas de vid tratadas con dos bioformulados comerciales de *Trichoderma* (T), (T0, agua), (T1, Mamull®), (T2, Tifi®), Micorriza (M), (M0, sin inóculo), (M1, Aegis-gel®), (M2, Oiko-Rhiza-E®) y posteriormente infectados por *D. seriata*. Las letras (A, B, C y D) y el “punto de inoculación” representan las cinco zonas de donde se extrajo ADN para su cuantificación.

Para las concentraciones de ADN cuantificadas en plantas infectadas por *D. seriata*, se detectó únicamente en el punto de inoculación 3,6 fg, en el tratamiento T1M2 y en los tratamientos T0M1 y T1M2 se detectó y cuantificó. ADN de *D. seriata* en el punto de inoculación la cantidad de 2,8 fg para ambos casos. En zonas inferiores al punto de inoculación B y C se detectó y cuantificó 0,8 y 0,9 fg respectivamente. En el resto de los tratamientos la colonización del hongo se cuantifica en todas las zonas analizadas del tronco de la planta.

V. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue evaluar bajo diferentes parámetros moleculares y fisiológicos la eficacia en la protección conferida sobre plantas de vid reforzadas en etapa de vivero con bioformulados basados en *Trichoderma* y micorrizas frente a una infección conferida por *Phaeomoniella chlamydospora* y *Diplodia seriata*.

Lesiones necróticas y reaislado; Los resultados de las plantas inoculadas con *P. chlamydospora* y *D. seriata* si bien presentaron decoloraciones vasculares, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p -valor $<0,05$) entre los factores de los tratamientos. Adicionalmente, *P. chlamydospora* se consiguió reaislar en su totalidad, mientras, *D. seriata* solo alcanzó un 1,2% del total. Información previa indica que el uso de métodos tradicionales para detectar hongos de la madera desde muestras provenientes de plantas podría subestimar los niveles de incidencia debido al rápido crecimiento de otros hongos presentes en las muestras que pueden superar el crecimiento del hongo de la madera ocasionando falsos negativos (Pouzoulet et al., 2017; Reis et al., 2019). Además, factores como madurez de los brotes, metabolismo del hospedero, clima, aparición de levaduras y bacterias pueden afectar la detección y ocurrencia del hongo de la madera (Fourie y Halleen, 2002). Sin embargo, Botryosphaeriaceae spp. y *P. chlamydospora* han sido detectadas en valles del centro-sur de Chile entre Curicó y el Bío-Bío, el cual es asociado con la humedad y la temperatura del clima Mediterráneo (Díaz y Latorre, 2013).

Conductancia estomática; El efecto de *P. chlamydospora* o *D. seriata* sobre la conductancia estomática no presentaron significancia estadística en la mayoría de las mediciones efectuadas, las cuales se mantuvieron en el rango de (160-590 mmol/m²s). Edwards et al. (2007 b), reporta valores similares (190-390 mmol/m²s) en plantas cv. Cabernet Sauvignon sin estrés hídrico, dispuestas en maceta e infectadas por *P. chlamydospora*. De hecho, la conductancia

estomática en plantas infectadas fue mayor que las no infectadas, indicando que la infección interfiere con la normal regulación estomática. De manera similar, plantas de vid cv. Red Grenache plantadas en macetas de 3L e inoculadas con *Eutypa lata* presentaron valores de conductancia estomática superiores (200-440 mmol/m²s) frente a plantas no infectadas y sin estrés hídrico (Sosnowski et al., 2011). De otro modo, el cierre estomático se asocia a síntomas foliares de EMV (Petit et al., 2006) y también, se reporta una baja significativa de la conductancia estomática la cual se produce una semana antes de la aparición de síntomas foliares (Letousey et al., 2010). Sin embargo, Ouadi et al., (2019) observó en vides cuando aún no expresaban ningún síntoma foliar un promedio de conductancia estomática significativamente alto (p-valor 0,04) respecto al control (169,3 mmol/m²s vs 28,8 mmol/m²s), respectivamente, solo dos días antes que apareciera el primer síntoma foliar. Esta diferencia estadísticamente significativa (p-valor 0,021) también fue registrada una semana posterior a la aparición de síntomas foliares de Esca. En efecto, en el presente trabajo las plantas vid no presentaron síntomas foliares evidentes asociados a EMV (datos no mostrados) que se puedan asociar a los hongos fitopatógenos inoculados. Por lo tanto, los resultados del presente estudio presentaron un comportamiento en su función estomática similar a plantas que solo están infectadas por hongos de la madera. Es decir, vides sin tratamiento de refuerzo biológico de *Trichoderma* y/o micorrizas o estrés hídrico. Demostrando, que el refuerzo biológico aplicado en etapa de vivero a 22 meses no tendría un efecto sobre el control de la función estomática en plantas de vid inoculadas con hongos de la madera, pero si se observan valores similares a plantas afectadas por EMV.

Clorofila total; En nuestros resultados las medias de concentraciones de clorofila presentaron resultados significativos en el factor *Trichoderma* en el nivel T1 Mamull® en tres puntos de las mediciones realizadas para *P. chlamydospora* y dos puntos para *D. seriata*. Sin embargo, durante todas las mediciones correspondientes al factor T1, para ambos hongos de la madera, se observaron

contenidos de clorofila mayores respecto al control sin tratamiento T0. De esta manera, T1 Mamull®, tendería a mejorar o evitar una baja de las concentraciones de clorofila en una planta infectada por *P. chlamydospora* o *D. seriata* frente a vides no tratadas con *Trichoderma*. Por su parte, las plantas sin tratamiento no se vieron seriamente afectadas en sus contenidos de clorofila, ni presentaron síntomas foliares que puedan ser asociados a EMV. Síntomas foliares han sido asociados con la alteración del aparato fotosintético, que es revelado por una disminución de los contenidos de clorofila a y b, aparentemente en los mismos niveles. Similares niveles de reducción en pigmentos han sido reportados en plantas con variados patógenos causado por la degradación de pigmentos o inhibición de la fotosíntesis (Petit y Gubler, 2006). Hojas sintomáticas siempre presentan menores contenidos de clorofila y alteraciones como tamaño de hojas, peso fresco, peso seco, se presentan en menor intensidad en hojas asintomáticas (Bruno et al., 2022). Siguiendo es esta misma idea, se ha reportado que plantas de vid con síntomas foliares presentan una reducción de la clorofila total (Petit y Gubler, 2006) siete días anterior de la aparición de síntomas foliares (Letousey et al., 2010) y similares disminuciones en los contenidos de clorofila son descritas en hojas sintomáticas de cultivos *in-vitro* e infectadas por *P. chlamydospora* (Santos et al., 2005). Estos factores podrían explicar que las plantas sin tratamiento e inoculadas con hongos de la madera no presentaron una importante alteración en las concentraciones de clorofila debido a la carencia de síntomas foliares durante la temporada de estudio. Adicionalmente, vides inoculadas con micorrizas arbusculares se reporta que el contenido de clorofila permanece reducido o sin cambios dependiendo de la cepa de MA inoculada (Bircoliti et al., 1997; Smith y Read, 2008). Así mismo, esto podría reforzar la idea sobre la sola influencia de *Trichoderma* sobre los incrementos de las concentraciones de clorofila en las plantas de vid del presente estudio.

Es reportado que el principal efecto fisiológico de EMV es el concerniente al metabolismo de los carbohidratos (Fontaine et al., 2015) restringiendo la

producción de azúcares y otros metabolitos secundarios envueltos en los mecanismos de resistencias de la planta (Ouadi et al., 2019). No obstante, *Trichoderma* se caracteriza por sus atributos en mejorar los aspectos como es la eficiencia fotosintética que podría haber contribuido en las mayores concentraciones de azúcares observadas en plantas infectadas por *P. chlamydospora*. (Singh et al., 2018).

En el presente trabajo los contenidos de fotoasimilados de glucosa, fructosa y almidón presentaron bajas concentraciones en las muestras de raíces analizadas en todas las plantas infectadas por *P. chlamydospora* y *D. seriata* en referencia a plantas no infectadas (Kliwer, 1966; Rogiers et al., 2011; Savi et al., 2021). Las bajas concentraciones evidenciadas en raíces es un indicio que el metabolismo del carbono (C), transformación de C inorgánico a C orgánico (azúcares), está siendo afectado por la infección de patógenos como hongos de la madera que generan variadas modificaciones fisiológicas como la perturbación de la fotosíntesis (Letousey et al., 2010, Magnin-Robert et al., 2011). Como consecuencia, los contenidos de almidón decrecen tanto en plantas sintomáticas como en asintomáticas (Petit y Gubler, 2006), esta baja en los contenidos de fotoasimilados podría afectar e incidir en el vigor de las plantas en temporadas venideras. De similar manera, los contenidos de glucosa y fructosa decrecen en respuesta a la infección por EMV desviando el carbono y la energía desde el metabolismo primario al secundario para la producción de fitoalexinas, incrementando los compuestos fenólicos y decreciendo las concentraciones de glucosa y fructosa (Lima et al., 2010). Además, el decrecimiento en los contenidos de glucosa y fructosa podría reflejar una baja en la actividad fotosintética que fue previamente descrita en hojas de *V. vinífera* cv. Alvarinho afectadas por Esca (Felgueiras, 2006). De la misma forma la infección ocasionada por los patógenos inoculados podría afectar la actividad fotosintética explicando los bajos contenidos de glucosa, fructosa y almidón en raíces de las vides del presente estudio. Dado que vides podrían reaccionar precozmente

reduciendo la fotosíntesis y gatillando los mecanismos de defensa en respuesta a EMV (Magnin-Robert, 2011). La producción de compuestos de defensa utiliza recursos de la planta incluyendo amino ácido, carbohidratos y nutrientes. La remoción de estos recursos del pool de reservas de puede tener efectos sobre el crecimiento de la planta. Por ejemplo, la reducción de vigor observada en plantas afectadas por EMV (Mundy y Manning, 2011).

El efecto de la interacción planta-hongo va a depender de la extensión en la colonización del hongo, independientemente si son especies patógenas o mutualistas (Beldoménico y Begon, 2010; Bodles et al., 2006). Además, el cambio de comportamiento endofítico desde neutral a patogénico o mutualista puede depender de la condición del tejido hospedero, factores medio ambientales y la extensión de la colonización (Tellenbach et al., 2010). Métodos moleculares como qPCR es usado en la detección de hongos de la madera (Overton, 2004; Martín et al., 2012; Pouzoulet et al., 2013; 2017; Moisy et al., 2017; Gainza et al., 2020) en complemento a la detección por métodos tradicionales de aislación e identificación morfológica de los hongos (Morales et al., 2012; Díaz y Latorre, 2013). Sin embargo, las técnicas tradicionales pueden generar falsos negativos (Pouzoulet et al., 2017; Reis et al., 2019). En el presente estudio se logró detectar y cuantificar por qPCR los dos hongos inoculados y en cuatro zonas distales al punto de inoculación, con la ayuda de las curvas de calibración realizadas a partir de ADN genómico de *P. chlamydospora* y *D. seriata*. *Phaeomoniella chlamydospora* se consigue detectar en todos los puntos analizados. De manera similar, se logra detectar y cuantificar las muestras provenientes de plantas infectadas por *D. seriata*, pero en este caso no se logra detectar en todas las zonas analizadas. Para tres tratamientos T0M1, T1M2 y T2M2 solo se detecta *D. seriata* en el punto de inoculación y contiguo a él Figura 4.7. Nuestros resultados muestran que en el caso de infección por *D. seriata* la detección por cultivo tradicional es subestimada frente a la presencia del patógeno. No obstante, las cantidades cuantificadas son bajas, basado en el peso estimado del genoma de

P. chlamydospora (28 fg) y *D. seriata* (38fg) (Dolezel et al., 2003; Pouzoulet et al., 2013, 2017). Desde el punto de vista de la detección y cuantificación de los hongos de la madera usados en este estudio, el qPCR puede ser usada como una técnica de análisis comparativa, de confirmación y complementaria al cultivo tradicional en la identificación de hongos de la madera, con la ventaja de poder ser detectado directamente desde madera infectada (Retief et al., 2005; Moisy et al., 2017; Martín et al., 2012; Gaínza et al., 2020).

A partir de todos los análisis y datos obtenidos de parámetros como fotoasimilados, clorofila total, nutricionales de macro y micro elementos y en la cuantificación de ADN de los hongos fitopatógenos inoculados, no se logra evidenciar una protección a largo plazo (22 meses) de los bioformulados aplicados en vides en etapa de vivero frente a una infección de hongos de la madera como *P. chlamydospora* y *D. seriata*. A pesar, que se reporta que *Trichoderma* y micorriza pueden llegar a biocontrolar patógenos, incluidos hongos de la madera, existen variados factores que pueden haber incidido en las plantas analizadas, como la naturaleza misma de los biocontroladores o su interacción Patógeno-MA-Planta, que en algunos casos podría incluso potenciar al patógeno (Holland et al, 2019; Landi et al., 2021). Además, *Trichoderma* para ser considerado un biocontrolador exitoso de hongos de madera debe establecerse y colonizar las plantas inoculadas (John et al., 2008), otro factor a considerar, y el tiempo transcurrido entre la aplicación (Berbegal et al., 2019) y el estado de crecimiento en que se encuentre la planta de vid (Di-Marco y Osti, 2007). Sin embargo, la sola aplicación en etapa de vivero podría no ser suficiente para obtener los efectos benéficos esperados a largo plazo, A pesar que se ha descrito que *Trichoderma* es reaislado desde madera de vid cv. Nyora posterior a 20 meses desde su aplicación. No obstante, dependerá de los cvs. usados (John et al., 2008). Vides con refuerzos y repeticiones durante siete años en la aplicación de *Trichoderma* presentan una reducción del 22% de los niveles de incidencia de plantas infectadas por EMV (Bigot et al., 2020), Sin embargo, es

necesario optimizar los tiempos de aplicación (Mutawila et al., 2016) y explorar las cepas a inocular en relación al cultivar de vid que se desea proteger frente a infecciones de patógenos y en especial los hongos de la madera (Carro-Huerga et al., 2020; 2021). Adicionalmente, la importancia de evaluar cepas nativas de *Trichoderma* que, por ejemplo, presenten mejoras adaptativas que permitan sobrevivir a un medioambiente cambiante consiguiendo brindar una mayor protección a las vides y coevolucionar junto al viñedo (Carro-Huerga et al., 2021) y la importancia de entender las interacciones entre las comunidades microbianas de la rizosfera y la planta, para el desarrollo de estrategias sustentables en el manejo de las enfermedades de la madera de la vid (Landi et al., 2021). Finalmente, se requieren más estudios para verificar la eficacia en la protección de plantas de vid con bioformulados de *Trichoderma* y el efecto de micorrizas comerciales nativas frente a la infección de hongos de la madera, la optimización de los métodos y formas de aplicación en etapa de vivero e incorporando refuerzos de las aplicaciones de los biocontroladores, en la formación y establecimiento del viñedo.

VI. CONCLUSIÓN

En todas las plantas evaluadas y tratadas con bioformulados de *Trichoderma* y micorrizas se logró observar estrías necróticas producto del avance de los hongos *P. chlamydospora* y *D. seriata* inoculados a 305 DPI y estas no presentaron diferencias entre los tratamientos aplicados.

En el efecto sobre parámetros fisiológicos, se observó un incremento en los contenidos de clorofila en el factor *Trichoderma* T1 Mamull® tanto en el grupo de plantas inoculadas con *P. chlamydospora* como en las plantas inoculadas con *D. seriata*.

En la detección y cuantificación, se valida el uso de herramientas moleculares (qPCR) como apoyo a las técnicas clásicas de cultivo para la detección y cuantificación de *P. chlamydospora* y *D. seriata* extraídas desde madera de plantas inoculadas. Además, es posible detectar el movimiento o avance del hongo en la detección en cuatro zonas distales al punto de inoculación, ofreciendo una herramienta rápida y específica en el diagnóstico, posibilitando su detección en madera asintomática como lo es el material de propagación.

VII REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.

Almeida, A., Concas, J., Campos, M., Materatski, P., Varanda, C., Patanita, M. and Félix, M. 2020. Endophytic Fungi as Potential Biological Control Agents against Grapevine Trunk Diseases in Alentejo Region. *Biology*, 12:420-443.

Auger, J., Esterio, M., Ricke, G. and Perez, I., 2004. Black Dead Arm and Basal Canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe Caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Disease*, 88:1286-1286.

Agustí, C., Gramaje, D., León, M., García-Jiménez, J. and Armengol, J. 2011. Evaluation of vineyards weeds as potential host of black and petri disease pathogens. *Plant Disease*, 95:803-810.

Amponsah, N., Jones, E., Ridgway, H. and Jaspers, M., 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* dieback diseases of grapevines. *Pest Management Science*, 68:676-683.

Armijo, G., Schlechter, R., Agurto, M., Muñoz, D., Nuñez, C. and Arce, P. 2016. Grapevine Pathogenic Microorganisms Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios. *Frontiers in plant science*, 7:382-400.

Ayres, M., Sosnowski, M. and Wicks, T., 2011. A rapid technique for evaluating treatments for *Eutypa* dieback control. *Wine & Viticulture Journal*, 26:50-53.

Benton, J. 1991. Kjeldahl method for nitrogen determination. Athens, GA: Micro-Macro Publishing.

Beldoménico, P. and Begon, M. 2010. Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trends Ecology Evolution*, 25:21–27.

Berbegal, M., Albalat, R., Leon, A. and Armengol, J. 2019. Evaluation of long-term protection from nursery to vineyard provided by *Trichoderma atroviride* SC1 against fungal grapevine trunk pathogens. *Pest Management Science*, 76:5605-5615.

Berlanas, C., Berbegal, M., Elena, G., Laidani, M., Cibriain, Sagües-Sarasa., A. and Gramaje, D. 2019. The fungal and bacterial rhizosphere microbiome associated with grapevine rootstock genotypes in mature and young vineyards. *Frontiers in Microbiology*, 10:1142.

Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou, E., Spagnolo, A., Clément, C. and Fontaine, F. 2013. Grapevine trunk diseases: Complex and still poorly understood: Grapevine trunk diseases. *Plant Pathology*, 62:243–265.

Besoain, X, 2018. Page 43 in: *Grapes and Wines Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization*. Edited by Jordão and Cosme, F. A. First edition, InTech, Croacia, 384p.

Besoain, X., Torres, C., Díaz, G. and Latorre, B. 2012. First Report of *Neofusicoccum australe* Associated with Botryosphaeria Canker of Grapevine in Chile. *Plant Disease*, 97:143.

Bigot, G., Sivilotti, P., Stecchina, M., Lujan, C., Freccero, A. and Mosetti, D. 2020. Long-term effects of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii* on the prevention of esca in different vineyards of Northeastern Italy. *Crop Protection*, 137:0261-2194.

Biricolti, S., Ferrini, F. and Rinaldelli, E. 1997. VAM fungi and soil lime content influence rootstock growth and nutrient content. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48:93–99

Bodles, W., Fossdal, C. and Woodward, S. 2006. Multiplex real-time PCR detection of pathogen colonization in the bark and wood of *Picea sitchensis* clones differing in resistance to *Heterobasidion annosum*. *Tree Physiology*, 26:775–782.

Bonfante, P. and Perotto, S. 1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi infecting host plants. *New Phytologist*, 130:3-21.

Bruisson, S., Lebel, S., Walter, B., Prevotat, L., Seddas, S. and Schellenbaum, P. 2017. Comparative detection of a large population of grapevine viruses by TaqMan® RT-qPCR and ELISA. *Journal of Virological Methods*, 240:73-77.

Bruno, G., Ippolito, P., Mannerucci, F., BRAGAZZI, L. and Tommasi, F. 2022. Physiological responses of 'Italia' grapevines infected with Esca pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 60: 321-336.

Buscot, F. 2015. Implication of evolution and diversity in arbuscular and ectomycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Physiology*, 172:55–61.

Cameron, D., Neal, A., Wees, V. and Ton., J. 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends Plant Science*, 18:539–545

Carlucci, A., Cibelli, F., Lops, F. and Raimondo, M. 2016. Characterization of Botryosphaeriaceae species as causal agents of trunk diseases on grapevine. *Plant Disease*, 99:1678-1688.

Carro-Huerga, G., Mayo-Prieto, S., Rodríguez-González, Á., Álvarez-García, S., Gutiérrez, S. and Casquero, P. A. 2021. The Influence of Temperature on the Growth, Sporulation, Colonization, and Survival of *Trichoderma* spp. in Grapevine Pruning Wounds. *Agronomy*, 9:1771.

Carro-Huerga, G., Compant, S., Gorfer., M. Cardoza, R., Schmoll, M., Gutiérrez, S. and Casquero, P. 2020. Colonization of *Vitis vinifera* L. by the Endophyte *Trichoderma* sp. Strain T154: Biocontrol Activity Against *Phaeoacremonium minimum*. *Frontiers in Plant Science*, 11:1170-1185.

Chapelle, E., Mendes, R., Bakker, P. and Raaijmakers, J. 2016. Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. *International Society for Microbial Ecology*, 10:265-268.

Christen, D., 2006. Towards an integrative management of eutypa dieback and esca disease of grapevine. Thesis of the Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.121.

Chaverri, P. and Samuels, G. J. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota *Hypocreales*, *Hypocreaceae*): species with green ascospores. *Studies in Mycology*, 48:116.

Claverie, M., Notaro, M., Fontaine, F. and Wery, J. 2020 Current knowledge on grapevine trunk diseases with complex etiology: A systemic approach. *Phytopathologia Mediterranea*. 1:29-53.

Compant, S. and Florence, M. 2016. *Biocontrol of Major Grapevine Diseases: Leading Research*, First edition. Cab International. London, UK. 233p.

Conrath U. 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Science*, 16:524–531.

Crous, P. and Gams, W. 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov, a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea*, 39:112-118.

De-Jonge, R. 2011. How filamentous pathogens co-opt plants: The ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:400–406.

De La Fuente, M., Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, j., Smart, R. and Corio-Costet, M. 2016. Grapevine trunk diseases. A review. In OIV Ed., *1st edition* pp. 24. Paris, France: International Organisation of Vine and Wine (OIV).

Díaz, G.A., Zoffoli, JP., Ferrada, E. and Lolas, M. 2021. Identification and Pathogenicity of *Diplodia*, *Neofusicoccum*, *Cadophora*, and *Diaporthe* Species Associated with Cordon Dieback in Kiwifruit cultivar Hayward in Central Chile. *Plant Disease*. 2021 5:1308-1319.

Díaz, G.A., Mostert, L., Halleen, F., Lolas, M., Gutierrez, M., Ferrada, E. and Latorre, B. 2019. *Diplodia seriata* associated with *Botryosphaeria* canker and dieback in apple trees in Chile. *Plant Disease*, 103:1025-1030.

Díaz, G.A. and Latorre, B. 2014. Infection Caused by *Phaeomoniella chlamydospora* Associated with Esca-like Symptoms in Grapevine in Chile. *Plant Disease*, 98:351-360.

Díaz, G.A., Auger, J., Besoain, X., Bordeu, E. and Latorre, B. 2013. Prevalence and pathogenicity of fungi associated with grapevine trunk diseases in Chilean vineyards. *Ciencia e Investigación Agraria*, 40:327-339.

Díaz, G.A., and Latorre, 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.

Díaz, G.A., D, Prehn., Besoain, X., Chavez, E., and Latorre, B. 2011. *Neofusicoccum parvum* Associated with Grapevine Trunk Diseases in Chile. *Plant Disease*.96:1032.

Di-Marco, S., Calzarano, F., Gams, W. and Cesari, A. 2000. A new wood decay of kiwifruit in Italy. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28:69-72.

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

Di-Marco, S., Osti, F. and Cesari, A. 2004. Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea*,43:108-115.

Di-Marco, S. and Osti, F. 2007. Applications of *Trichoderma* to prevent *Phaeomoniella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathologia Mediterranea*, 46:73–83.

Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H. and Greilhuber, J. 2003 Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A*. 2:127-8.

Edwards, J., Pascoe, I. and Salib, S. 2007. Impairment of Grapevine Xylem Function by *Phaeomoniella chlamydospora* Infection Is Due to More than Physical Blockage of Vessels with 'Goo'. *Phytopathologia Mediterranea*, 46:87-90.

Edwards, J., Salib, S., Thomson, F., and Pascoe, I. 2007a. The impact of *Phaeomoniella chlamydospora* infection on the grapevine's physiological response to water stress part 1: Zinfandel. *Phytopathologia Mediterranea*, 46:26–37.

Edwards, J., Salib, S., Thomson, F. and Pascoe, I. 2007b. The impact of *Phaeomoniella chlamydospora* infection on the grapevine's physiological response to water stress part 2: Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *Phytopathologia Mediterranea*, 46:38–49.

Eichmeier, A., Pecenka, J., Spetik, M., Necas, T., Ondrasek, I., Armengol, J. and Gramaje, D. 2020. Fungal Trunk Pathogens Associated with *Juglans regia* in the Czech Republic. *Plant Disease*, 104:761-771.

Elad, Y. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology*, 10:499–507.

Elmer, P. and Reglinski, T. 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55:155–177.

Elmer, P. and Michailides, T. 2004. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. *Botrytis: Biology, pathology and control*. First edition, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 243–272.

Jiménez, E. and Luque, J. 2015. Pruning debris of grapevine as a potential inoculum source of *Diplodia seriata*, causal agent of *Botryosphaeria* dieback. *European Journal of Plant Pathology*, 144:803-810.

Field K. 2012. Contrasting arbuscular mycorrhizal responses of vascular and non-vascular plants to a simulated Palaeozoic CO₂ decline. *Nature. Communications*, 3:835.

Felgueiras, M. 2006. Estudo da interacção *Vitis vinifera* cv. Alvarinho–esca: isolamento e identificação o de fungos responsáveis pela doença e avaliação o de alterações bioquímicas em plantas infectadas. MSc Thesis, Universidade do Minho, Portugal.

Fontaine, F., Pinto, C., Vallet, J., Clément, C., Gomes, A. and Spagnolo, A. 2015. The effects of grapevine trunk diseases (GTDs) on vine physiology. *European Journal of Plant Pathology*, 144:707-721

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT), Statistic Division. 2018. [En línea] Recuperado en: <<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>>. consultado en junio del 2020.

Fourie, P. and Halleen, F. 2004. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant disease*, 11:1241-1245.

Fourie, P and Halleen, F. 2002. Investigation on the occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. *Australasian Plant Pathology*. 31. 425-426.

Fourie, P., Halleen, F., Vyver, J. and Schreuder, W. 2001. Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 40:473-478.

Gaínza-Cortés, F., Roa-Roco, R., Arraño-Salinas, P., Rodríguez-Herrera, P., Lolas, M., Caris-Maldonado, J., Silva-Flores, P. and González, A. 2020. Distribution of three grapevine trunk pathogens in Chilean vineyards, determined using molecular detection from asymptomatic woody pruning material. *Phytopathologia Mediterranea*, 3:503-513.

Gallou, A., Mosquera, H. and Cranenbrouck, S. 2011. Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiology Molecular Plant*, 76:20–26.

Gramaje, D., Úrbez-Torres, J. and Sosnowski, M. 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: Current strategies and future prospects. *Plant Disease*, 102:12-39.

Gramaje, D., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J. and Armengol, J. 2009. Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. *Crop Protection*, 12:1091-1097.

Halleen, F., Fourie, P. and Lombard, P. 2010. Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31:125-132.

Halleen, F. and Fourie, P. 2016. An Integrated Strategy for the Proactive Management of Grapevine Trunk Disease Pathogen Infections in Grapevine Nurseries. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 37:2-825.

Hao, Z., Fayolle, L., van-Tuinen, D., Chatagnier, O., Li, X., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V. 2012. Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* involves priming of defence gene responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 10:3657-3672.

Hause, B. 2007. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry*, 68:101-110.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. and Monte, E. 2012 Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158:17–25.

Holland, T.C., Bowen, P., Kokkoris, V., Úrbez-Torres, J. and Hart., M. 2019. Does Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi Reduce Trunk Disease in Grapevine Rootstocks. *Horticulturae*, 5:61-72.

Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87:4-10.

Howell, C., Hanson, L., Stipanovic, R. and Puckhaber, L. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90:248- 252.

Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, L. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews. Microbiology*. 2:43-56.

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

Harman, G. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease*, 84:377–393.

Harman, G., Latorre, B., Agosin, E., San Martin, R., Riegel, D., Nielsen, P., Tronsmo, A. and Pearson, R. 1996. Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biological Control*, 7:259–266.

Heil, M. and Ton, J. 2008. Long-distance signalling in plant defence. *Trends Plant Science*, 13:264–272.

John, S., Wicks, T., Hunt, J. and Scott, E. 2008. Colonisation of grapevine wood by *Trichoderma harzianum* and *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 14:18-24.

Jung, S., Garcia-Andrade, J. and Verhage., A. 2012. Arbuscular mycorrhiza induce systemic resistance against gray mold (*Botrytis cinerea*) in tomato through priming of JA-dependent defense responses. In: Schmitt A, Mauch-Mani B, Pozo M. J. Proceedings of the IOBC/ WPRS Working group. Induced resistance in plants against insects and diseases. Granada,139–144.

Kapulnik, Y.1996. Suppression of defence responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots. *New Phytologist*; 133:59–64

Kliewer, W. 1966. Sugars and organic acids of *Vitis vinifera*. *Plant physiology*, 41:923-931.

Kotze, C., VanNiekerk, J., Mostert, L., Halleen, F. and Fourie, P. 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*, 50:247–S263.

Landi, L., Foglia, R., Murolo, S., and Romanazzi, G. 2021. The Mycorrhizal Status in Vineyards Affected by Esca. *Journal of Fungi*,7:869-897.

Larach, A., Torres, C., Riquelme, N., Valenzuela, M., Salgado, E., Seeger, M. and Besoain, Xi. 2020. Yield loss estimation and pathogen identification from *Botryosphaeria* dieback in vineyards of Central Chile over two growing seasons. *Phytopatología Mediterranea*, 59:537-548.

Latorre, B. 2018. Compendio de las enfermedades de las plantas. Primera edición. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 733 p.

Lemanceau, P., Barret, M., Mazurier, S., Mondy, S., Pivato, B. and Fort, T. 2016. Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere, in *How Plants Communicate with their Biotic Environment*. *Advances in Botanical Research*, 101–133.

Letousey, P., Baillieul, F., Perrot, G., Rabenoelina, F., Boulay, M. and Vaillant-Gaveau, N. 2010. Early events prior to visual symptoms in the apoplectic form of grapevine esca disease. *Phytopathology*, 100:424–431.

Lima, M., Felgueiras, M., Graça, G., Rodrigues, J., Barros, A., Gil, A. and Dias, A. 2010. NMR metabolomics of esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves. *Journal of experimental botany*. 61:4033-42.

Linderman R. 1988. Mycorrhizal Interactions with the rhizosphere microflora-the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology*, 78:366–371.

Liu, J., Abdelfattah, A., Norelli, J., Burchard, E., Schena, L. and Droby, S. 2018. Apple endophytic microbiota of different rootstock/scion combinations suggests a genotype-specific influence. *Microbiome*, 6-18.

Lolas, M., Castro, A., Polanco, R., Gainza, F., Ferrada, E., Sosnowski, M. and Díaz, G. 2020. First report of *Eutypa lata* causing dieback of grapevines (*Vitis vinifera*) in Chile. *Plant Disease*, 104:2024-2024.

Munkvold, G., Duthie, A. and Marois, J. 1994. Reductions in yield and vegetative growth of grapevines due to Eutypa dieback. *Phytopathology*. 84:186–192.

Martínez-Diz, M., Díaz-Losada, E., Díaz-Fernández, Á., Bouzas-Cid, Y. and Gramaje, D. 2021. Protection of grapevine pruning wounds against *Phaeomoniella chlamydospora* and *Diplodia seriata* by commercial biological and chemical methods. *Crop Protection*, 143:105465.

Martínez-Diz, M., Díaz-Losada, E., Díaz-Fernandez, A., Bouzas-Cid, Y. and Gramaje, D. 2020. Protection of grapevine pruning wounds against *Phaeomoniella chlamydospora* and *Diplodia seriata* by biological and chemical methods. 143:

Martín, M., Cobos, R., Martín, L. and López-Enríquez, L. 2012. Real-time PCR detection of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Applied and environmental microbiology*. 7:3985-3991.

Martín, M. and Cobos, R. 2007. Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y Leon (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*. 46:18-25.

Magnin-Robert, M., Spagnolo, A., Alayi, T., Cilindre, C., Mercier, L., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., Clément, C. and Fontaine, F. 2014. Proteomic insights into changes in wood of *Vitis vinifera* L. in response to esca proper and apoplexy. *Phytopathologia Mediterranea*, 53:173–192.

Magnin-Robert, M., Letousey, P., Spagnolo, A., Rabenoelina, F., Jacquens, L., Mercier, L., Clément, C. and Florence, F. 2011. Leaf stripe form of esca induces alteration of photosynthesis and defence reactions in presymptomatic leaves. *Functional Plant Biology*. 38:865-866.

Moisy, C., Berger, G., Flutre, T., Le Cunff, L. and Péros, J. 2017 Quantitative Assessment of Grapevine Wood Colonization by the Dieback Fungus *Eutypa lata*. *Journal Fungi (Basel)*,3:21-36.

Moral, J., Luque, F. and Trapero, A. 2008. First report of *Diplodia seriata*, the anamorph of "*Botryosphaeria*" *obtusa*, causing fruit rot of olive in Spain. *Plant Disease*, 92:311-311.

Morales, A., Latorre, B., Piontelli, E. and Besoain, X. 2012. Botryosphaeriaceae species affecting table grape vineyards in Chile and cultivar susceptibility. *Ciencia e investigación agraria*,39:445-458.

Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel, P., Clément, C., Mugnai, L. and Florence, F. 2018. Grapevine Trunk a Review of Fifteen Years of Trials for Their Control with Chemicals and Biocontrol Agents. *Plant Disease*, 102:1189-1217

Moyo, P., Allsopp, E., Roets, F., Mostert, L. and Halleen, F. 2014. Arthropods vector 678 grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathology*, 104:1063-1069.

Mugnai, L., Graniti, A. and Surico, G. 1999. Esca (black measles) and brown wood streaking two old and elusive diseases of grapevine. *Plant Disease*, 83:404-417.

Mundy, D., Manning, M. 2011. Physiological response of grapevines to vascular pathogens a review. *New Zealand Plant Protection*,64:7-16.

Mutawila C, Fourie P., Halleen, F. and Mostert, L. 2011a. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 50:264-276.

Mutawila, C., Fourie, P., Halleen, F. and Mostert, L. 2011b. Histo-pathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds. *Phytopathologia Mediterranea*, 50:46-60.

Mutawila, C., Halleen, F. and Mostert, L. 2015. Development of benzimidazole resistant *Trichoderma* strains for the integration of chemical and biocontrol methods of grapevine pruning wound protection. *BioControl*, 60:387-399.

Mutawila, C., Halleen, F. and Mostert, L. 2016. Optimisation of time of application of *Trichoderma* biocontrol agents for protection of grapevine pruning wounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 22:279-287.

Nogales, A., Aguirre, J., Santa María, E., Camprubí, A. and Calvet, C. 2009. Response of mycorrhizal grapevine to *Armillaria mellea* inoculation: disease development and polyamines. *Plant and Soil*, 317:1-2.

Ouadi, L., Bruez, E., Bastien, S., Vallance, J., Lecomte, P. and Domec J. 2019. Ecophysiological impacts of Esca, a devastating grapevine trunk disease, on *Vitis vinifera* L. *Plos One*, 14: 1-20.

Oficina de estudios y políticas agrarias (Odepa). 2020. Estadísticas del sector/Fichas nacional y regionales 2020. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile [En línea] Recuperado en: <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/ficha-nacional-y-regionales>. consultado en junio del 2020.

Olmo, D., Gramaje, D. and Armengol., J. 2017. Hongos asociados a las enfermedades de la madera del almendro en la Isla de Mallorca. *Fruticultura*, 54:18-29.

Overton, B., Stewart, E., Qu, X., Wenner, N. and Christ, B. 2004. Qualitative real-time PCR SYBR® Green detection of Petri disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea*. 43:403-410.

Pajot, E., Mounier, E., Blal, B., Cortes, F. and Coutant, A. 2012. Selection steps of the *Trichoderma atroviride* strain i-1237, and some practical results of the development of the fungi with in the cankers diseases of grapevine and soil borne diseases of vegetables, in Biological Control of Plant Pathogens: Biocontrol of Plant Pathogens in Sustainable Agriculture, ed. By Barker EA, Clement CandIOBC, WorkingGroup. Book of Abstracts, Universite de Reims, Reims, Champagne-Ardenne, France, p.40.

Pal, K. and McSpadden-Gardener, B. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor, 2: 25.

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

Pertot, I., Prodorutti, D., Colombini, A. and Pasini, L. 2016. *Trichoderma atroviride* SC1 prevents *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* infection of grapevine plants during the grafting process in nurseries. *Biocontrol*, 61:257–267.

Petit, A., Vaillant, N., Boulay, M., Clement, C. and Fontaine, F. 2006. Alteration of photosynthesis in grapevines affected by esca. *Phytopathology*, 96: 1060–1066.

Petit, E. and Gubler, W. 2006. Influence of *Glomus intraradices* on black foot disease caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* under controlled conditions. *Plant Disease*, 90: 1481-1484.

Phillips, A., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M., Groenewald, J. and Crous, P. 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76:51- 167.

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

Pitt, W., Sosnowski, M., Huang, R., Qui, Y., Steel, C. and Savocchia, S. 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Plant Disease*, 96: 1303-1308.

Pouzoulet, J., Rolshausen, P., Schiavon, M., Bol, S., Travadon, R., Lawrence D., Baumgartner, K., Ashworth, V., Comont. G., Corio-Costet, M., Pierron, R., Besson, X. and Jacques, A. 2017. A Method to Detect and Quantify *Eutypa lata* and *Diplodia seriata*-Complex DNA in Grapevine Pruning Wounds. *Plant Disease*, 101:1470-1480.

Pouzoulet, J., Mailhac, N., Couderc, C., Besson, X., Dayde', J. and Lummerzheim, M. 2013. A method to detect and quantify *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* ADN in grapevine-wood samples. *Applied Microbiology Biotechnology*, 97:10163–10175.

Pozo, M., Jung, S., Lopez-Raez, J. and Azcón-Aguilar, C. 2010. Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: The role of plant defence mechanisms. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. 2nd Edition. Springer: Dordrecht, Netherlands. pp. 193-207

Pozo, M. J. and Azcon-Aguilar C. 2007. Unraveling mycorrhiza induced resistance. *Current Opinion Plant Biology*, 10:393–398.

Quaglia, M., Covarelli, L. and Zizzerini, A. 2009. Epidemiological survey on esca disease in Umbria, central Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 48:84-91.

Reino, J., Guerrero, R., Hernández-Galán, R. and Collado, I. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7:89–123.

Retief, E., Damm, U., Niekerk, J., Mcleod, A. and Fourie, P. 2005. A protocol for molecular detection of *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine wood. *South African journal of science*, 101:139-142.

Rogiers, S., Holzapfel, B. and Smith, J. 2011. Sugar accumulation in roots of two grape varieties with contrasting response to water stress. *Annals of Applied Biology*, 159:1744-7348

Rolshausen, P., Úrbez-Torres, J., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R. and Gubler W. 2010. Evaluation of Pruning Wound Susceptibility and Protection Against Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61:113-119.

Rudelle, J., Octave, S., Kaid-Harche, M., Roblin, G. and Fleurat-Lessard, P. 2005. Structural modifications induced by *Eutypa lata* in the xylem of trunk and canes of *Vitis vinifera*. *Functional Plant Biology*, 6:537-547.

Santos, C., Fragoeiro, S. and Phillips, A. 2005. Physiological response of grapevine cultivars and a rootstock to infection with *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* isolates: an in vitro approach using plants and calluses. *Scientia Horticulturae*, 103:187–198.

Sapkota, R., Knorr, K., Jørgensen, L., O'Hanlon, K. and Nicolaisen, M. 2015. Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome. *New Phytologist*, 207:1134–1144.

Savi, T., Herrera, J. and Forneck, A. 2021. Leaf vs. Whole-Plant Biotic Attack: Does Vine Physiological Response Change?. *Water*, 13:1429.

Sawers, R., Gutjahr, C. and Paszkowski, U. 2008. Cereal mycorrhiza: An ancient symbiosis in modern agriculture. *Trends Plant in Science*, 13:93–97.

Schulz, B. and Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109:661–687.

Schuster, A. and Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of Trichoderma. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87:787–799.

Singh, A., Shukla, N., Kabadwal, B. C., Tewari, A. and Kumar, J. 2018. Review on plant-Trichoderma-pathogen interaction. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 7:2382-2397.

Siebert, J. 2001. Eutypa: the economic toll on vineyards. *Wines and Vines*, 50–56.

Sosnowski, M. and Mundy, D. 2018. Pruning Wound Protection Strategies for Simultaneous Control of *Eutypa* and *Botryosphaeria* Dieback in New Zealand. *Plant Disease*, 3:1-26.

Sosnowski, M., Luque, J., & Loschiavo, A., Martos, S., Garcia-Figueres, F., Wicks, T. and Scott, E. 2011. Studies on the effect of water and temperature stress on grapevines inoculated with *Eutypa lata*. *Phytopathologia Mediterranea*. 50:127-138.

Sturz, A., Christie, B. and Nowak, J. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19:1-30.

Suárez-Pérez, G. 2016. *Botryosphaeriaceae* asociadas a la muerte de ramas en plantaciones de *Eucalyptus globulus* Labill. En la Región del BioBío y de la Araucanía (Chile). Tesis Doctoral, Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales.

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2021. Catastro vitivinícola nacional. Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile. [En línea] Recuperado en: <<http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/catastro-viticola-nacional/1490/publicaciones>>. consultado en mayo del 2021.

Sipiora, M. and Cuellar, S. 2015. Economic impact of Eutypa dieback. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 613:26-29.

Smith, S. and Smith, F. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62:227–250.

Smith, S. and Read, D. 2008. 145: *Mycorrhizal Symbiosis*, Z. A. Siddiqui, M. S. Akhtar, K. Futai. Third Edition, Elsevier, London, UK.769p.

Surico, G. and Marchi, G. 2006. Older and more recent observations on esca: a critical review. *Phytopathologia Mediterranea*, 45:68-86.

Reis, P., Pierron, R., Larignon, P., Lecomte, P., Abou-Mansour, E., Farine, S., Bertsch, C., Jacques, A., Trotel-Aziz, P., Rego, C. and Fontaine, F. 2019. *Vitis* Methods to Understand and Develop Strategies for Diagnosis and Sustainable Control of Grapevine Trunk Diseases. *Phytopathology*, 109:916-931.

Reis, P., Letousey, P. and Rego, C. 2017. *Trichoderma atroviride* strain I-1237: colonization of pruning wounds against grapevine wood diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 56:580.

Tellenbach, C., Grünig, C. and Sieber, T. 2010. Suitability of quantitative real-time PCR to estimate the biomass of fungal root endophytes. *Applied Environmental Microbiology*, 76:5764-5772.

Thakur, M. and Sohal, B. 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *International Scholarly Research Notices Biochemistry*, 1-10.

Ton, J. 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14:310-317.

Trouvelot, S., Bonneau, L., Redecker, D., Van Tuinen, D., Adrian, M. and Wipf, D. 2015. Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agronomy for sustainable development*, 4:1449-1467.

Úrbez-Torres, J., Tomaselli, E., Pollaed-Flamand, J., Boule, J., Gerin, D. and Pollastro, S. 2020. Characterization of *Trichoderma* isolates from southern Italy, and their potential biocontrol activity against grapevine trunk disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 59:425-439.

Úrbez-Torres, J., Haag, P., Bowen, P. and O'Gorman, D. 2014a. Grapevine trunk diseases in British Columbia: Incidence and characterization of the fungal pathogens associated with esca and Petri diseases of grapevine. *Plant Disease*. 98:456-468.

Úrbez-Torres, J., Haag, P., Bowen, P. and O'Gorman, D. 2014b. Grapevine trunk diseases in British Columbia: Incidence and characterization of the fungal pathogens associated with black foot disease of grapevine. *Plant Disease*. 98:469-482.

Úrbez-Torres, J., Peduto, F., Vossen, P., Krueger, W. and Gubler, W. 2013. Olive twig and branch dieback: etiology, incidence, and distribution in California. *Plant Disease*, 97:231-244.

Úrbez-Torres, J., Battany, M., Bettiga, L., Gispert, C., McGourty, G., Roncoroni, J. and Gubler, W. D. 2010. *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant Disease*, 94:717-724.

Úrbez-Torres, J., Leavitt, G., Voegel, T. and Gubler, W. D. 2006. Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 90:1490-1503.

USDA Foreign Agricultural Center. 2019 Grapes, Fresh Table: Production, Supply and Distribution.

<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/reporthandler.ashx?reportId=2419&templateId=3&format=html&fileName=Grapes> Consultado en enero 2021.

Van Wees, S., Van der Ent, S. and Pieterse, C. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11:443–448.

Valencia, A., Gil, P., Rosales, I-M. and Latorre, B. 2019. Characterization and Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* Species Obtained from Avocado Trees with Branch Canker and Dieback, and from Avocado Fruit with Stem End Rot in Chile. *Plant Disease*, 103:996-1005.

Valencia, D., Torres, C., Camps, R., Lopez, E., Celis-Diez, J. and Besoain, X. 2015. Dissemination of *Botryosphaeriaceae* conidia in vineyards in the semiarid Mediterranean climate of the Valparaíso Region of Chile. *Phytopathologia Mediterranea*, 54:394-402.

Vico, I., Žebeljan, A., Vučković, N., Vasić, M. and Duduk, N. 2017. First Report of *Diplodia seriata* causing postharvest rot of quince fruit in Serbia. *Plant Disease*, 101:1823-1823.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Woo, S. and Lorito, M. 2008. Trichoderma–plant pathogens interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40:1–10.

Wagschal, I., Abou-Mansour, E., Petit, A., Clement, C. and Fontaine, F. 2008. Wood Diseases of Grapevine: A Review on *Eutypa* Dieback and Esca. *Research Signpost* 37: 661–86.

Woo, S., Scala, F., Ruocco, M. and Lorito, M. 2006. The molecular biology of the inter-actions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96:181–185.

Waghunde, R., Shelake, R. and Sabalpara, A. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research*, 11:1952-1965.

Warren, C. 2008. Rapid measurement of chlorophylls with a microplate reader. *Journal of Plant Nutrition*, 7:1321-1332.

Wicks, T. and Davies, K. 1999. The effect of *Eutypa* on grapevine yield. *Australian Grape grower and Wine maker* 426:15–16.

Zamioudis, C. and Pieterse, C. 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions.*; 25:139–150.

Zhang, J. and Zhou, J. 2010. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Molecular Plant*, 3:783–793.