



universidad
de león

TESIS DOCTORAL

CONTROL BIOLÓGICO DE *Phaeoacremonium minimum*
MEDIANTE EL USO DE *Trichoderma* spp. EN PLANTAS
DE VID

AUTOR: GUZMÁN CARRO HUERGA



Programa de doctorado de Ingeniería de Biosistemas.

Directores:

Dr. Pedro Antonio Casquero Luelmo y Dr. Santiago Gutiérrez Martín

León, 2022



UNIVERSIDAD DE LEÓN

GRUPO UNIVERSITARIO DE INGENIERÍA Y AGRICULTURA SOSTENIBLE

INSTITUTO DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y BIODIVERSIDAD

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

TESIS DOCTORAL

CONTROL BIOLÓGICO DE *PHAEOACREMONIUM MINIMUM* MEDIANTE EL USO DE *TRICHODERMA* SPP. EN PLANTAS DE VID

Biological control of *Phaeoacremonium minimum* using *Trichoderma* spp. in
grapevine plants

Programa de doctorado en ingeniería de biosistemas

Escuela de Ingeniería Agraria y Forestal

Dirigida por:

Dr. Pedro Antonio Casquero Luelmo

Dr. Santiago Gutiérrez Martín

Presentada por

Guzmán Carro Huerga

para optar al grado de Doctor

León, 2022

.....Seguiremos luchando desde el **sacrificio y desde la pasión por seguir soñando**, “con la cabeza en las nubes y los pies en la tierra”, para no dejar de sonreír y esforzarnos por ser felices cada día.....

Pedro Ruiz Aragonese CEO Alma Carraovejas



Agradecimientos/Acknowledgments

Me gustaría expresar mi más sincera gratitud y aprecio a las siguientes personas e instituciones por su contribución a la investigación contenida en esta tesis doctoral:

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de tesis, el **Dr. Pedro Casquero** y el **Dr. Santiago Gutiérrez**, ya que sin su apoyo constante, total confianza y las tantas horas de trabajo dedicadas a esta tesis doctoral no hubiera salido adelante.

A mis compañeros del grupo de investigación GUIIAS, en especial a la Dra. Sara Mayo, Dr. Alvaro Rodríguez y Dr. Óscar González por haberme apoyado, aconsejado y ayudado siempre, muchas gracias. A todos los que habéis compartido conmigo bastantes horas en el campo y en el laboratorio al Dr. Paulo Da Silva, Dr. Samuel Álvarez y Víctor Suárez. También a todas las personas que me han ayudado y están con sus trabajos de investigación y tesis, mucho ánimo y muchas gracias a Alejandra Porteus, Laura Zanfaño, Daniela Ramírez y Alexia Fernández. Así como a todas aquellas personas que han pasado por el laboratorio y que han contribuido de una u otra manera a esta tesis.

Al grupo de investigación de Ponferrada, a la profesora Dra. Rosa Elena Cardoza, en especial por haberme enseñado a trabajar en el laboratorio y a la Dra. Laura Lindo por su ayuda y apoyo constante, muchas gracias. También a José Álvarez por su ayuda y enseñanzas.

Al personal del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), al Dr. José Antonio Rubio y al Dr. Enrique Barajas por su amabilidad y ayuda con los aislados de patógenos de vid.

Al Dr. David Gramaje y su grupo de investigación por enseñarme y aconsejarme sobre fitopatología y enfermedades de la madera de la vid. Muchas gracias.

A la bodega Pago de Carraovejas y al grupo Alma Carraovejas, a su personal por el apoyo en campo y a la dirección del grupo por su apuesta por nosotros. En especial a la Dra. Eva Navascués y a Elena Rivilla por su ayuda y entusiasmo, muchas gracias. A la bodega Gordonzello, a la Denominación de Origen León, a la

Denominación de Origen Cangas, en especial a José Manuel Pardo. También al ingeniero, viticultor y bodeguero Esteban Sánchez, muchas gracias por tus consejos y predisposición a trabajar con nosotros. Y todos aquellos viticultores y bodegueros que nos prestaron sus viñedos, muchas gracias.

Al Profesor Juan Ángel Robles, cuyos consejos y asesoramientos permitieron un trabajo de calidad significativa.

Al Dr. Sergio Paniagua, gracias por tu ayuda constante y compañía, hermano.

A toda mi familia, especialmente a mis tíos Francisco y Begoña y mis primos Fran y Ester. A Pili y su familia por acogerme durante mi estancia en Ponferrada.

En especial, a mis padres, Manuel y Carmen. Gracias a su apoyo y cariño, así como sus enseñanzas que me han formado como persona y sin ellos no estaría aquí.

I am very grateful to Dr. Stéphane Compant for giving to me the opportunity to work with him, his insights into microscopy, grapevine trunk diseases and for his careful review of some of my manuscripts. Also, I wish to thank Dra. Monika Schmoll, Dr. Markus Gorfer and Dra. Ursula Sauer for their help during my stay in Austrian Institute of Technology (AIT). Thanks to AIT, BOKU university (Universität für Bodenkultur), PhD students and researchers that I met in Austria, thanks for sharing with me your time and knowledge. Special thanks to Dr. Alejandro del Barrio for helping me during those months.

Sincere thanks to Dr. Francesco Vinale for allowing me to be in his laboratory, all his help, his hospitality, kindness and teaching about secondary metabolites during my stay in University of Naples Federico II. Special thanks to Dra. Sheridan Woo, Dra. Roberta Marra, Dra. Gelsomina Manganiello, Raffaele for helping me during my stay in Naples and thanks specially for their capable help in the laboratory to Alessia Staropoli and Anastasia Vassetti and all research group. I would like to thanks Dra. Anna Andolfi and Dra. Maria Salvatore for her valuable help during my stay in Naples.

Thanks to Dra. Nawal Benttoui, for her unconditional support, valuable help and understanding.

Financiación

La presente tesis se ha podido llevar a cabo gracias a la obtención de una beca del *Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU15/04681)*. Esta investigación también se ha financiado con el proyecto “GLOBALVITI IDI-20120746- Solución global para mejorar la producción vitivinícola frente al cambio climático basada en robótica, tecnología IT y en estrategias biotecnológicas y de manejo del viñedo” del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial –CDTI–, así como gracias a la bodega Pago de Carraovejas.



Índice general de contenidos

Resumen.....	XV
Abstract.....	XVII
Listado de abreviaturas.....	XXI
Capítulo 1. PRESENTACIÓN	1
1.1. Justificación de la tesis y de las unidades temáticas	4
1.2. Referencias bibliográficas	9
1.3. Resumen de las publicaciones	11
Capítulo 2. INTRODUCCIÓN	17
2.1. El cultivo de la vid.....	19
2.2. Enfermedades de la madera de la vid (EMV).....	28
2.3. <i>Phaeoacremonium</i> spp.	37
2.4. Control de enfermedades de la madera de la vid y agentes de control biológico, últimos avances	50
2.5. Control biológico	53
2.6. <i>Trichoderma</i> spp.	55
2.7. Referencias bibliográficas	72
Capítulo 3. OBJETIVOS	93
Capítulo 4. MATERIAL Y MÉTODOS	97
4.1. Prospección de viñedos para el aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp. como potenciales agentes de biocontrol.....	100
4.2. Evaluación de la capacidad antagonista de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp.....	101
4.3. Inoculación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. para el control biológico de las enfermedades de la madera de la vid	104
Capítulo 5. ARTÍCULO I	107
“Influence of fungicide application and vine age on <i>Trichoderma</i> diversity as source of biological control agents”	109
Capítulo 6. ARTÍCULO II	111

“Colonization of <i>Vitis vinifera</i> L. by the endophyte <i>Trichoderma</i> sp. Strain T154: Biocontrol activity against <i>Phaeoacremonium minimum</i> ”	113
Capítulo 7. ARTÍCULO III	115
“The influence of temperature on the growth, sporulation, colonization, and survival of <i>Trichoderma</i> spp. in grapevine pruning wounds”	117
Capítulo 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119
8.1. Prospección de viñedos para el aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp. como potenciales agentes de biocontrol	122
8.2. Evaluación de la capacidad antagonista de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp	124
8.3. Inoculación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. para el control biológico de las enfermedades de la madera de la vid.....	127
8.4. Referencias bibliográficas	131
Capítulo 9. TRABAJOS RELACIONADOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS	135
9.1. Trabajos relacionados como co-autor.....	138
9.2. Perspectivas futuras.....	139
Capítulo 10. CONCLUSIONES	141
Capítulo 11. CONCLUSIONS	145

Resumen

La presente tesis doctoral evalúa la posibilidad de utilizar agentes de control biológico autóctonos para combatir las enfermedades de la madera de la vid. En concreto, el uso de hongos del género *Trichoderma* frente a *Phaeoacremonium minimum*, uno de los hongos pioneros de la enfermedad de la yesca y de la enfermedad de Petri.

El principal problema a día de hoy es la falta de productos eficaces para combatir estas enfermedades. Esto es debido a la retirada de productos químicos del registro de productos fitosanitarios autorizados para combatir las plagas y enfermedades, motivado por una mayor preocupación por la salud del medio ambiente, del consumidor y de los productores. Las políticas europeas buscan el uso de soluciones ecológicas, sostenibles, adaptadas al cambio climático y respetuosas con la salud animal, humana y del medio ambiente. Sin embargo, hay una falta de consistencia de productos biológicos comerciales y un limitado número de productos químicos que, además, pueden provocar el desarrollo de resistencias en los patógenos. Por tanto, el principal objetivo de esta tesis es **buscar soluciones basadas en el agente de biocontrol autóctono *Trichoderma* spp.** adaptado a las condiciones de viñedos de la región de Castilla y León.

En esta tesis se muestra que el aislado *Trichoderma* sp. T154 fue seleccionado y caracterizado como un agente de biocontrol que está adaptado a las condiciones de esta región y con capacidad de biocontrol frente a *Phaeoacremonium minimum*. Además, este microorganismo fue capaz de colonizar las heridas de poda en condiciones de cambio climático y su aplicación fue optimizada con respecto al criterio de salud *One health*.

Inicialmente, se realizó una prospección de viñedos de Castilla y León. Se utilizó un nuevo método para aislar cepas de *Trichoderma* spp. a partir de corteza de la planta de vid. Se confirmó cómo un menor número de tratamientos fungicidas por campaña y una mayor edad de las plantas de vid favorecen las poblaciones naturales de *Trichoderma*, obteniéndose 25 aislamientos de *Trichoderma* de las 10 parcelas muestreadas. Se evaluó la capacidad antagonista de los citados aislamientos mediante ensayos de confrontación dual *in vitro* frente a *Phaeoacremonium minimum* Y038-05-3a, y se seleccionaron los aislados T75, T79, T84 y T154 por su alta capacidad de biocontrol. Seguidamente, el aislado T154

fue utilizado para evaluar los mecanismos de biocontrol que era capaz de utilizar frente al aislado de *Phaeoacremonium minimum* CBS 100398. Este *Trichoderma* autóctono fue transformado mediante la técnica de protoplastos con el fin de expresar la proteína roja tdTom, lo que permitió determinar que el micoparasitismo en condiciones *in vitro* y la exclusión de nicho en heridas de planta de vid de la variedad tempranillo fueron los principales mecanismos de biocontrol. Finalmente, la cepa T154 fue evaluada junto con otros aislados autóctonos de *Trichoderma* en distintas condiciones de temperatura, así como se cuantificó su persistencia sobre heridas de poda. Se comprobó que esta cepa era capaz de producir gran cantidad de esporas a 25°C en condiciones *in vitro*, se verificó que era capaz de colonizar las heridas de poda de plantas de vid de tempranillo en condiciones de semicampo durante el invierno, permanecer al menos 12 semanas viable protegiendo la planta, estar adaptado a condiciones simuladas de cambio climático y ser inoculado con criterios de respeto a la salud *One health*.

Por tanto, las implicaciones en un futuro inmediato de esta tesis son la aplicación de la cepa autóctona de *Trichoderma* sp. T154 en condiciones de campo estudiando su interacción con el resto de la microbiota natural y sus efectos sobre la producción.

Abstract

This doctoral thesis evaluates the possibility of using autochthonous biological control agents to face grapevine trunk diseases. In particular, the use of fungi from the genus *Trichoderma* against *Phaeoacremonium minimum*, which is considered a pioneer fungus of esca and Petri diseases.

Nowadays, the main problem is the lack of effective products against these diseases. This is due to the withdrawal of chemical products to reduce the pernicious effects of pests and diseases and it is motivated by a greater concern about environment, and health of consumers and farmers. European policies look for ecological and sustainable solutions, adapted to climate change and respectful to animal, human and environmental health. However, there is a lack of consistency of commercial biological products and a limited number of chemical ones that, in addition, can induce resistance to pathogens. Therefore, the main objective of this thesis is based on **looking for solutions based on the use autochthonous biocontrol *Trichoderma* spp. agents** adapted to the ecological niche of the vineyards from Castilla y León region.

Here we show that the isolate *Trichoderma* sp. T154, selected and characterized as a biological control agent adapted to the ecological conditions of this region, which acts efficiently against *Phaeoacremonium minimum*, being also able to colonize pruning wounds under climate change conditions.

First, a survey of vineyards was carried out in Castilla y León. A new method was used to isolate *Trichoderma* strains from bark of grapevine plants. It was confirmed that the older grapevine plants are, the higher is the diversity of *Trichoderma* spp. isolates and also, a negative correlation was identified between the number of fungicides sprayed per campaign and the diversity of *Trichoderma* spp. isolates. Moreover, 25 isolates of *Trichoderma* were identified from the 10 sampled plots. The antagonistic capacity of these isolates was evaluated using *in vitro* confrontation dual assays against *Phaeoacremonium minimum* Y038-05-3a. The isolates T75, T79, T84 and T154 were selected by their high biocontrol activity. Subsequently, the isolate T154 was used for evaluating biocontrol mechanisms against the isolate *Phaeoacremonium minimum* CBS 100398. This

autochthonous *Trichoderma* isolate was transformed using the protoplast procedure in order to express the red protein tdTom. Thus, mycoparasitism under *in vitro* conditions and niche exclusion in wounds of *Vitis vinifera* cv. Tempranillo were identified as main mechanisms of biocontrol performed by this biological control agent. Finally, *Trichoderma* strain T154 among others indigenous *Trichoderma* strains were evaluated at different temperature conditions and also were inoculated in pruning wounds to evaluate their capacity of colonization. This strain demonstrated a great production of spores at 25°C under *in vitro* conditions. Moreover, *Trichoderma* strain T154 was able to significantly colonize pruning wounds of *Vitis vinifera* cv. Tempranillo under semi-field conditions during winter. Besides, this strain was able to remain at least 12 weeks post inoculation in plant, adapted to simulated climate change conditions and inoculated based on *One health* approach.

Future implications derived from this thesis should be the spraying of this autochthonous strain, *Trichoderma* sp. T154, under field conditions to study its interaction with the rest of microbiota and its effects on wine production.

Listado de abreviaturas.

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
<i>a.C.</i>	Antes de Cristo
<i>ACB</i>	Agente de control biológico
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>Asp</i>	Aspinolida
<i>CFU</i>	Unidades formadoras de colonias (del inglés <i>Colony forming units</i>)
<i>CWDEs</i>	Enzimas degradadoras de la pared celular (del inglés <i>Cell wall degrading enzymes</i>)
<i>d.C.</i>	Después de Cristo
<i>DO</i>	Denominación de origen
<i>DDT</i>	Dicloro difenil tricloroetano
<i>DMAT</i>	Dimetilalilriptófano
<i>EMV</i>	Enfermedades de la madera de la vid
<i>EPPO</i>	Organización europea y mediterránea para la protección vegetal (del inglés <i>European and Mediterranean plant protection organization</i>)
<i>GFP</i>	Proteína de fluorescencia verde (del inglés <i>Green fluorescent protein</i>)
<i>GLSD</i>	Enfermedad del tigreado de la hoja de vid (del inglés <i>Grapevine leaf stripe disease</i>)
<i>ha</i>	Hectárea
<i>HWT</i>	Tratamiento con agua caliente (del inglés <i>Hot water treatment</i>)
<i>IAA</i>	Ácido indolacético (del inglés <i>indolacetic acid</i>)
<i>ICBN</i>	Código internacional de nomenclatura botánica (del inglés <i>International code of botanical nomenclature</i>)
<i>ICTT</i>	Comisión internacional en taxonomía de <i>Trichoderma</i> (del inglés <i>International commission on Trichoderma taxonomy</i>)
<i>IPM</i>	Manejo Integrado (del inglés <i>Integrated pest management</i>)
<i>ITS</i>	Espacio de transcripción interna (del inglés <i>Internal transcribed space</i>)
<i>MAPA</i>	Ministerio de agricultura alimentación y medio ambiente
<i>MBC</i>	Benzimidazol-2-yl-carbamato
<i>mL</i>	Mililitros
<i>NRPS</i>	Peptido sintetasas no ribosomales (del inglés <i>Non ribosomal peptide synthetases</i>)
<i>OCM</i>	Organización común de mercados
<i>ODS</i>	Objetivos de desarrollo sostenible
<i>OEMV</i>	Observatorio español de mercado del vino
<i>OIV</i>	Organización internacional del vino
<i>OM</i>	Manejo ecológico (del inglés <i>organic management</i>)
<i>ONU</i>	Organización de las naciones unidas
<i>PDA</i>	Patata dextrosa agar

<i>Pks</i>	Poliquétidos sintasas
<i>RBCA</i>	Rosa de bengala cloranfenicol agar
<i>UNESCO</i>	Organización de las naciones unidas para la educación, la ciencia y la cultura (en inglés, <i>United nations educational, scientific and cultural organization</i>)
<i>VOCs</i>	Compuestos orgánicos volátiles (del inglés <i>Volatil organic compounds</i>)
<i>6PP</i>	6-pentil-2H-piran-2-ona



Capítulo 1

Presentación

Índice de contenidos

1.1. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS Y DE LAS UNIDADES TEMÁTICAS.	4
1.2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
1.3. RESUMEN DE LAS PUBLICACIONES.	11

Índice de figuras

Figura 1. 1: Esquema del Pacto Verde Europeo (Comisión Europea, 2019)	4
--	----------

1.1. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS Y DE LAS UNIDADES TEMÁTICAS.

La agricultura es un pilar básico de nuestra sociedad y su alimentación es el principal reto que se presenta para este siglo. Las exigencias de las normativas de producción sostenible, el efecto del cambio climático y la creciente preocupación de la sociedad por el medio ambiente y la salud de los productores y consumidores, obligan a plantear un nuevo enfoque en la producción agraria (Comisión Europea, 2019). Los modelos agrícolas basados en un manejo convencional del cultivo, cuya dependencia de los compuestos químicos era su principal argumento, han pasado a la historia (Geissen et al., 2021). Por ello, la Unión Europea ha planteado políticas que implementen ese cambio en el horizonte 2030-2050: el Pacto Verde Europeo, el plan de biodiversidad y la estrategia “de la granja a la mesa”.

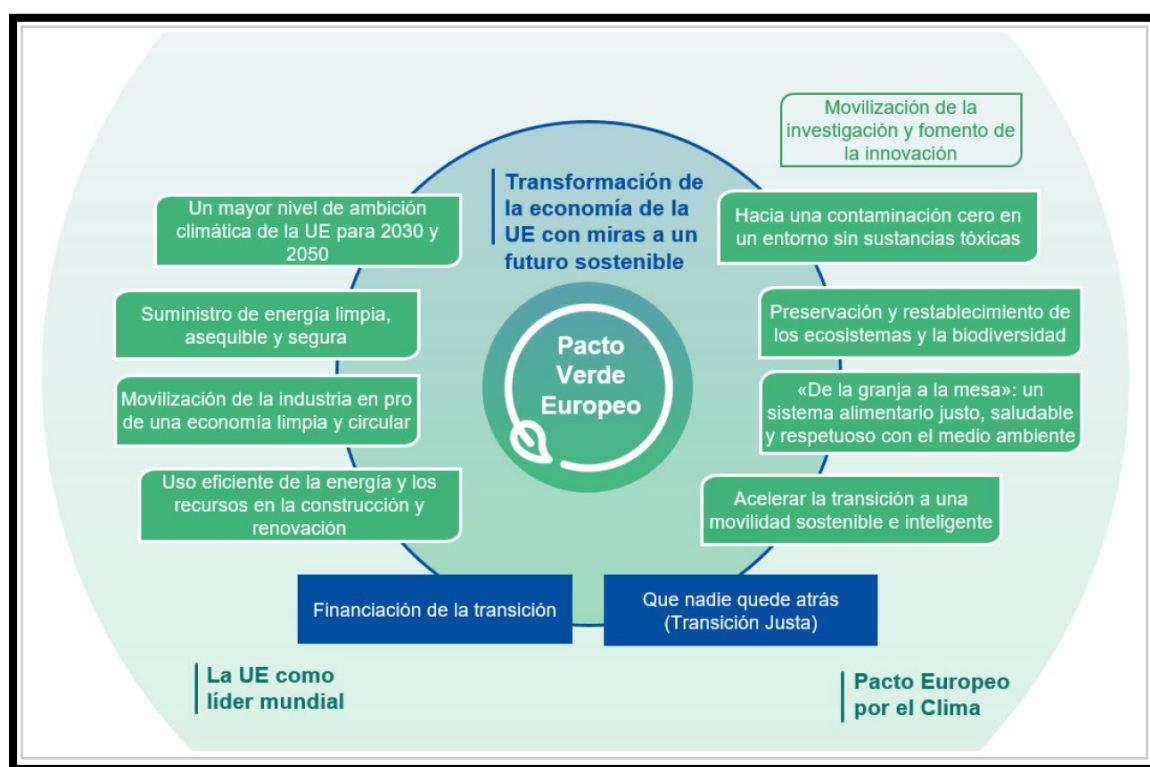


Figura 1. 1: Esquema del Pacto Verde Europeo (Comisión Europea, 2019)

Desde la Comisión Europea, se propone “El Pacto Verde Europeo” (Figura 1.1), integrado en la estrategia de la Agenda 2030 y en los Objetivos de Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas, en el que la agricultura tiene un importante papel. En este pacto se aboga por el uso de prácticas sostenibles, el fomento de la agroecología y la

producción ecológica. También se pretende reducir notablemente el uso de plaguicidas químicos y aumentar la superficie en agricultura ecológica (Comisión Europea, 2019).

La agenda 2030 busca, en el apartado de la agricultura, un desarrollo de las áreas rurales mediante la promoción de una producción sostenible, el fin del hambre en el mundo, una mayor seguridad alimentaria y mejorar la nutrición de la población (United Nations, 2015b). Con esta tesis doctoral se intenta fomentar una agricultura sostenible mediante el biocontrol de agentes patógenos y la disminución de pesticidas químicos, lo que conlleva una mayor seguridad alimentaria.

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) que plantea la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para el horizonte 2050 es una oportunidad para mejorar la vida de todos y así construir un mundo mejor. Varios de estos objetivos tienen relación con la presente tesis y se exponen a continuación. *El objetivo 9 industria, innovación e infraestructuras* es un objetivo incluido en esta tesis ya que busca facilitar el desarrollo sostenible mediante la investigación e inversión en innovaciones científicas. Otro objetivo que promueve esta tesis es el *objetivo 12 producción y consumo responsables*, que mediante el uso de bio-productos busca un cambio en los métodos de producción con el fin de lograr crecimiento económico y desarrollo sostenible. También es de relevancia *el objetivo 13 acción por el clima*, en esta tesis se integra una investigación que simula estos efectos y sus consecuencias para el biocontrol de enfermedades. Finalmente, *el objetivo 15 vida de los ecosistemas terrestres*, donde una de las acciones es detener la pérdida de biodiversidad y en referencia a esta tesis, el estudio de biodiversidad y aislamiento de agentes de biocontrol nativos y su interacción puede ayudarnos a mantener un acervo genético y a preservar esta diversidad que se encuentra amenazada (United Nations, 2015a). En síntesis, varios de los ODS especificados por la Organización de las Naciones Unidas están incluidos en esta tesis doctoral que busca una producción sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

La segunda estrategia de la Unión Europea es “la biodiversidad de aquí a 2030”. Este enfoque busca preservar la biodiversidad con el fin de obtener beneficios económicos directos, salvaguardar la seguridad alimentaria, y ser un elemento crucial frente a la lucha contra el cambio climático con el objetivo de mantener los ecosistemas (Comisión

Europea, 2020b). En esta tesis se hace un estudio de la biodiversidad de los microorganismos de biocontrol y un estudio en condiciones de cambio climático. También se aíslan agentes de biocontrol seguros que pueden proporcionar beneficios económicos directos mediante la reducción de la presencia de patógenos. Por tanto, es un plan totalmente integrado en esta tesis doctoral.

Y finalmente, la estrategia “de la granja a la mesa” la cual busca crear una cadena alimentaria que englobe consumidores, productores, clima y el medio ambiente. En esta estrategia se enfatiza la toma de medidas adicionales para reducir en un 50% el uso de plaguicidas químicos y en otro 50% el uso de los plaguicidas más peligrosos en el horizonte temporal 2030. La Comisión facilitará la introducción de plaguicidas que contengan sustancias biológicas activas y actuará para acortar los plazos de autorización de estos productos. También se pone de relevancia las nuevas amenazas fitosanitarias influenciadas por el cambio climático, por ello, la Comisión Europea apoya las nuevas técnicas innovadoras como la biotecnología y el desarrollo de bio-productos con el objetivo de aumentarla sostenibilidad. Estas acciones deben promover productos fitosanitarios más seguros que sean inocuos para los consumidores, el medio ambiente y que aporten beneficios a la sociedad en su conjunto (Comisión Europea, 2020a). Y es por ello, que esta tesis doctoral presenta el desarrollo de un bio-producto sostenible, inocuo para el medio ambiente y las personas, reduciendo el uso de plaguicidas químicos.

En conclusión, la sociedad demanda productos seguros tanto para el consumidor como para el medio ambiente. Todos estos factores nos llevan al uso de agentes de control biológico (ACB) como una alternativa que respeta todas estas premisas que promulgan una agricultura sostenible, ecológica y respetuosa con el medio ambiente, la salud vegetal, animal y la salud humana (Concepto de única salud- *One health*).

El sector agroalimentario (sector agrario e industria de alimentación y bebidas) representa el 10% del empleo, el 15% de las exportaciones de la región de Castilla y León y es el sector clave en la cohesión y equilibrio territorial para evitar la despoblación del medio rural (Analistas económicos de Andalucía, 2020). Uno de sus subsectores más

importantes es el vitivinícola, con más de 1.000 millones de euros en valor económico, 15.500 viticultores, 3.500 empleos y 665 bodegas registradas en Castilla y León (Soria rural, 2019). No obstante, hoy en día, se encuentra amenazado por las enfermedades de la madera de la vid, un conjunto de enfermedades fúngicas sin una solución curativa. La investigación en su control biológico, alternativa sostenible al químico, es una de las posibles soluciones (Gramaje et al., 2018; Mondello et al., 2018).

La eficacia y persistencia de los ACB no es siempre la adecuada debido a la gran multitud de factores que influyen en su aplicación en campo (hospedador, factores bióticos y factores ambientales) (Butt et al., 2001). La adaptación a esas condiciones ambientales es un elemento fundamental para el éxito de la aplicación de un agente de control biológico (Kredics et al., 2003).

Unos de los agentes de control biológico que más éxito han tenido como agente de biocontrol por su versatilidad, capacidad de adaptación, habilidad para colonizar todo tipo de sustratos etc.... son los hongos del género *Trichoderma* (Woo et al., 2014). Este género incluye hongos filamentosos ubicuos, antagonistas de patógenos, estimuladores del crecimiento y activadores de la respuesta defensiva de las plantas (Druzhinina et al., 2011)

El viticultor se encuentra indefenso frente a una nueva amenaza y una posible solución está en un manejo integrado de los viñedos y en el uso de nuevas herramientas de control de enfermedades y plagas (Mondello et al., 2018). Por lo que se plantea el uso de un agente de biocontrol *Trichoderma* spp. frente a uno de los principales problemas que tiene a día de hoy el viñedo, las enfermedades de la madera de la vid.

Uno de los hongos pioneros causantes de estas enfermedades de la madera de la vid es *Phaeoacremonium minimum*, detectado en los viñedos de toda Castilla y León (Martín et al., 2007; Martín, 2012). Este hongo es el causante de la enfermedad de Petri y del complejo de la yesca (Gramaje et al., 2018).

Con estas premisas, esta tesis se basa en el estudio de las interacciones existentes entre *Trichoderma*, el patógeno y el ambiente. El estudio de sus relaciones ayudará a entender

mejor los mecanismos de acción para poder controlar la enfermedad de manera eficaz y así optimizar la aplicación de los ACBs de manera sostenible y respetuosa con el medio.

Con el objetivo de encontrar un organismo de biocontrol adaptado a las condiciones edafoclimáticas y de manejo, es necesario realizar primeramente una prospección de un amplio número de viñedos de Castilla y León. Seguidamente, realizar una evaluación de la capacidad de biocontrol *in vitro* que puedan tener y seleccionar aquel o aquellos que mayor actividad tengan frente a *Phaeoacremonium minimum*. Una vez seleccionado aquel aislado que ejerza una mejor actividad de biocontrol, es necesario saber su comportamiento dentro de la planta de vid y mediante el uso de ingeniería genética conocer la distribución en los tejidos de la misma y cuáles son sus mecanismos de acción. Y finalmente, con el objetivo de optimizar su adaptación a las condiciones ambientales, es necesario estudiar la capacidad de producción de esporas, su adaptación a distintas condiciones de temperatura y su comportamiento sobre la planta de vid en condiciones de posibles eventos de cambio climático. La coevolución de los agentes de biocontrol, la adaptación al cambio climático y el cumplimiento del concepto de única salud ("*One health*") permitirá la obtención de agentes de control biológico eficaces, seguros y respetuosos con el medio ambiente.

Conforme a lo establecido en el Ministerio de Economía y Competitividad, el código UNESCO en el que mejor se puede englobar la presente tesis doctoral es: *3108.02 Disease control, biological*. Control biológico de enfermedades.

1.2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Analistas económicos de Andalucía (2020). *El sector agrario en Castilla y León 2020*, 26.
- Butt, T. M., Jackson, C., y Magan, N. (2001). Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential. (CABI: Wallingford, England), 1-8.
- Comisión Europea (2019). El Pacto Verde Europeo. en *Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones*. (Bruselas, 11.12.2019 COM(2019) 640 final), 28.
- Comisión Europea (2020a). Estrategia «de la granja a la mesa» para un sistema alimentario justo, saludable y respetuoso con el medio ambiente. en *Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones*. (Bruselas, 20.5.2020 COM(2020) 381 final), 22.
- Comisión Europea (2020b). Estrategia de la UE sobre la biodiversidad de aquí a 2030: Reintegrar la naturaleza en nuestras vidas. en *Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, Al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones* (Bruselas, 20.5.2020 COM(2020) 380 final), 26.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. a, Kenerley, C. M., Monte, E., et al. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 749-759. doi:10.1038/nrmicro2637.
- Geissen, V., Silva, V., Lwanga, E. H., Beriot, N., Oostindie, K., Bin, Z., et al. (2021). Cocktails of pesticide residues in conventional and organic farming systems in Europe – Legacy of the past and turning point for the future. *Environ. Pollut.* 278, 1-11. doi:10.1016/j.envpol.2021.116827.
- Gramaje, D., Urbez-Torres, J. R., y Sosnowski, M. R. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Dis.* 102, 12-39. doi:10.1094/PDIS-04-17-0512-FE.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., y Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 37-42.
- Martín, L. (2012). Caracterización molecular, fenotípica, patogénica y medios de control de *Phaeoacremonium aleophilum* y otros hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León. en (Tesis doctoral. Universidad de León. León.), 319.
- Martín, M. T., Cobos, R., Martín, M. T., y Cobos, R. (2007). Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathol. Mediterr.* 46, 18-25. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., et al. (2018). Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Dis.* 102, 1189-1217. doi:10.1094/PDIS-08-17-1181-FE.
- Soria rural (2019). El sector vitivinícola de CyL genera más de 1 . 000 millones de euros anuales. *Sorianoticias.com*, 1-7. Available at: <https://sorianoticias.com/noticia/2019-02-25-el-potencial-vinos-castilla-leon-se-exhibe-madrid-55938> [Accedido julio 14, 2021].
- United Nations (2015a). Sustainable Development Goals. Available at: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/> [Accedido julio 14, 2021].
- United Nations (2015b). Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. *Dep. Econ. Soc. Aff. Sustain. Dev.* Available at: <https://sdgs.un.org/2030agenda> [Accedido julio 14, 2021].
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., et al. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *Open Mycol. J.* 8, 71-126. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00337-2.

1.3. RESUMEN DE LAS PUBLICACIONES.

La presente tesis doctoral está constituida como compendio de publicaciones. Todas ellas pertenecen a revistas indexadas en el JCR y se refieren al uso de *Trichoderma* como agente de control biológico frente a las enfermedades de madera de vid (*Phaeoacremonium minimum*). Seguidamente, se ilustran las publicaciones que han sido el resultado de la presente tesis doctoral.

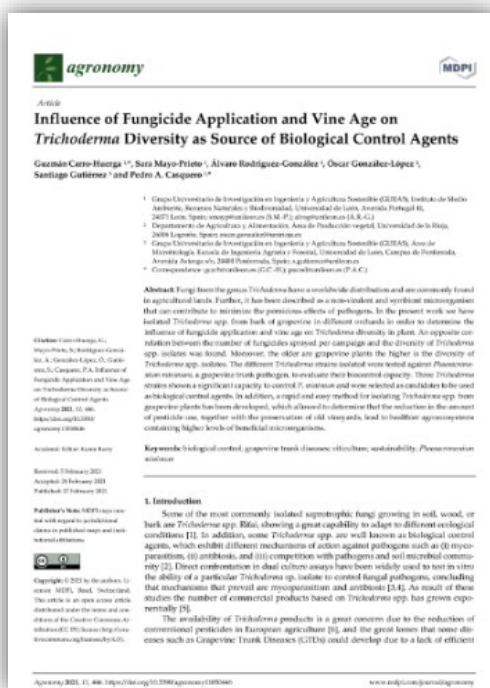
CAPÍTULO (5)

Título: Influence of fungicide application and vine age on *Trichoderma* diversity as source of biological control agents.

Revista: *Agronomy*, (2021), (11),446

doi: 10.3390/agronomy11030446

Autores: G. Carro-Huerga, S. Mayo-Prieto, Á. Rodríguez-González, Ó. González-López, S. Gutiérrez, P.A. Casquero.



Breve reseña: Con el fin de obtener agentes de control biológico adaptados a las condiciones de la región, se aislaron *Trichoderma* spp. nativas en viñedos de Castilla y León. Para ello, se evaluó su presencia y su relación con respecto a las prácticas de manejo. Así mismo, se ensayó su eficacia frente al patógeno *Phaeoacremonium minimum*, patógeno causante de enfermedades de la madera de la vid. Finalmente, se describen varias cepas con potencial de biocontrol.

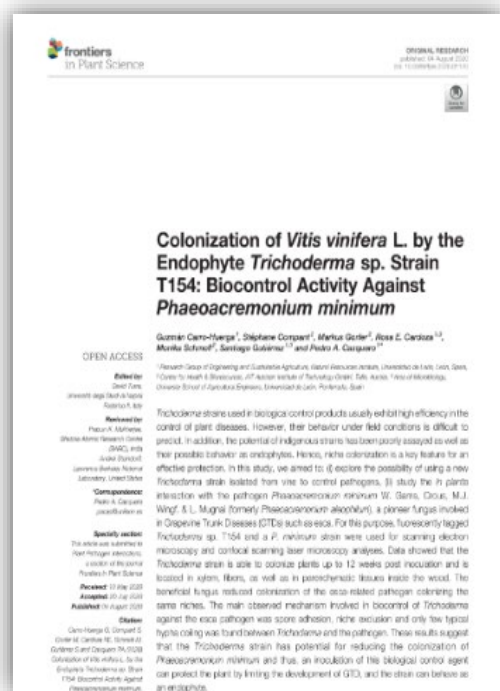
CAPÍTULO (6)

Título: Colonization of *Vitis vinifera* L. by the endophyte *Trichoderma* sp. strain T154: Biocontrol activity against *Phaeoacremonium minimum*.

Revista: *Frontiers in Plant Science*, (2020), (11),1170,

doi: 10.3389/fpls.2020.01170.

Autores: G. Carro-Huerga, S. Compant, M. Gorfer, R. E. Cardoza, M. Schmoll, S. Gutiérrez, P.A. Casquero..



Breve reseña: Una de las cepas seleccionadas como potencial agente de biocontrol, *Trichoderma* sp T154, fue modificado mediante ingeniería genética con el objetivo de introducir el gen *Td-Tom* que codifica para una proteína de color rojo. Mediante un extenso trabajo de microscopía confocal y electrónica de barrido, se evaluaron los mecanismos de acción de *Trichoderma*, la capacidad de colonización de la planta de vid y su interacción con el patógeno de vid *Phaeoacremonium minimum*. Finalmente, se demostró que la cepa *Trichoderma* sp. T154 es capaz de proteger a la planta y disminuir la presencia del hongo patógeno.

CAPÍTULO (7)

Título: The influence of temperature on the growth, sporulation, colonization, and survival of *Trichoderma* spp. in grapevine pruning wounds.

Revista: *Agronomy*, (2021), (11),1771,

doi: 10.3390/agronomy11091771

Autores: G. Carro-Huerga, S. Mayo-Prieto, Á. Rodríguez-González, S. Álvarez-García, S. Gutiérrez, P.A. Casquero.



Breve reseña: Varias cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de viñedos de Castilla y León son evaluadas en condiciones de laboratorio para comprobar su crecimiento a partir de micelio y de distintas concentraciones de esporas. Estas cepas son ensayadas a distintos valores de temperatura a los que se desarrollan los patógenos de las enfermedades de la madera de la vida con el fin de ver en condiciones *in vitro* su comportamiento. Finalmente, uno de los aislados seleccionados de *Trichoderma* sp. T154 fue capaz de colonizar significativamente la planta de vid durante el invierno, así como adaptarse a condiciones climáticas adversas.



Capítulo 2

Introducción

Índice de contenidos

2.1. EL CULTIVO DE LA VID.....	19
2.1.1. Origen e importancia actual en España y Castilla y León.	19
2.1.2.- Biología de la vid.	23
2.1.3.- Principales plagas y enfermedades.	26
2.2. ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID (EMV).	28
2.2.1.- Importancia y distribución geográfica.....	29
2.2.2.- Sintomatología y hongos implicados.....	31
2.3. <i>Phaeoacremonium</i> spp.	37
2.3.1.- Importancia del género <i>Phaeoacremonium</i>	37
2.3.2.- <i>Phaeoacremonium minimum</i>	40
2.3.3.- Control de <i>Phaeoacremonium minimum</i>	48
2.4. CONTROL DE ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID Y AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO, ÚLTIMOS AVANCES.	50
2.5. CONTROL BIOLÓGICO.....	53
2.6. <i>Trichoderma</i> spp.	55
2.6.1.- Descripción, sistemática y morfología	55
2.6.2.- Nicho ecológico.	57
2.6.3.- Actividad de biocontrol de <i>Trichoderma</i> spp.....	58
2.6.3.1 Interacción <i>Trichoderma</i> -patógeno	59
2.6.3.2 Interacción <i>Trichoderma</i> -planta	63
2.6.3.3 Interacción triple (<i>Trichoderma</i> -planta-patógeno).....	66
2.6.4.- Uso de <i>Trichoderma</i> en la viticultura.....	68
2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

Índice de figuras

Figura 2. 1: -A. Localización de Huelva y de la antigua ciudad. -B. Ubicación del antiguo poblado y de los viñedos sobre el plano actual de la ciudad de Huelva 1. Antigua ciudad de Huelva, 2. Plano de los viñedos (González de Canales et al., 2020).	19
Figura 2. 2: Cuadro de la sistemática de la vid según EPPO. (<i>European and Mediterranean Plant Protection Organization</i>)	23
Figura 2. 3: Morfología de la planta de vid; p: pámpanos, n:nietos (Reynier, 2005).	24
Figura 2. 4: Enfermedades de la madera de la vid.-A. Síntomas foliares característicos de eutiposis con hojas cloróticas y débiles crecimientos de pámpanos. -B Cordones y pulgares con ausencia de crecimientos con síntomas compatibles por decaimiento por <i>Botryosphaeria</i> . -C Planta colapsada durante el periodo de verano por apoplejía, perteneciente a la sintomatología de la yesca. -D Síntomas característicos en hojas de GLSD en variedad tinta prieto picudo, perteneciente a la sintomatología de la yesca. -E Síntomas característicos en hojas de GLSD en variedad blanca albarín blanco, perteneciente a la sintomatología de la yesca.	34
Figura 2. 5: -A. Sintomatología característica de la yesca con prudiciones secas y necrosis. -B. Tilosas producidas en la planta de vid joven. -C Coloraciones rojizas y pudriciones secas en madera.	36
Figura 2. 6: Clasificación taxonómica del género <i>Phaeoacremonium</i> según EPPO.....	38
Figura 2. 7: El complejo de la yesca. Los cinco síndromes del complejo de la yesca y sus agentes etiológicos. Adaptado de Mondello et al., 2018.	41
Figura 2. 8: Ciclo de la enfermedad de yesca y enfermedad de Petri en la planta de vid (Gramaje et al., 2020).	45
Figura 2. 9: -A. Pululano. -B Escitalona. -C Isosclerona (Fischer y Thines, 2017).	47
Figura 2. 10: Clasificación taxonómica del género <i>Trichoderma</i> según EPPO.....	55
Figura 2. 11: -A. Imagen de <i>Trichoderma</i> sp. en microscopía electrónica de barrido. -B. Imagen de <i>Trichoderma</i> sp. en microscopía confocal. -C. Colonia de <i>Trichoderma</i> sp. esporulada en placa de PDA tras 7 días.....	57
Figura 2. 12: Ventajas y desventajas del uso de <i>Trichoderma</i> en la agricultura, adaptado de (Kredics et al., 2021).	68

Índice de tablas

Tabla 2. 1: Superficie en miles de ha de los diez países con mayor superficie de viñedo (OIV, 2021):	21
Tabla 2. 2: Principales especies vegetales afectadas por <i>Phaeoacremonium</i> en España:.....	40
Tabla 2. 3: Listado de <i>Trichodermas</i> ensayados frente a enfermedades de madera de la vid:.....	51

2.1. EL CULTIVO DE LA VID.

2.1.1. Origen e importancia actual en España y Castilla y León.

Recientes investigaciones han propuesto que los primeros hallazgos sobre plantaciones vitícolas en el occidente mediterráneo estarían datados en torno al siglo IX antes de Cristo (a.C.) al norte de la actual ciudad de Huelva (Fig. 2.1-A-B). Sus huellas de cultivo revelan el empleo de la técnica de plantación del acodo, así como una serie de zanjas y fosas que conforman las líneas de cultivo (Vera Rodríguez y Echevarría Sanchez, 2013). Estos descubrimientos han sido confirmados mediante datación radiocarbónica y concluyen la inclusión del cultivo de la uva por parte de los fenicios en la península durante la segunda mitad del siglo X a.C. (incluso anterior a lo inicialmente expuesto) (González de Canales et al., 2020).

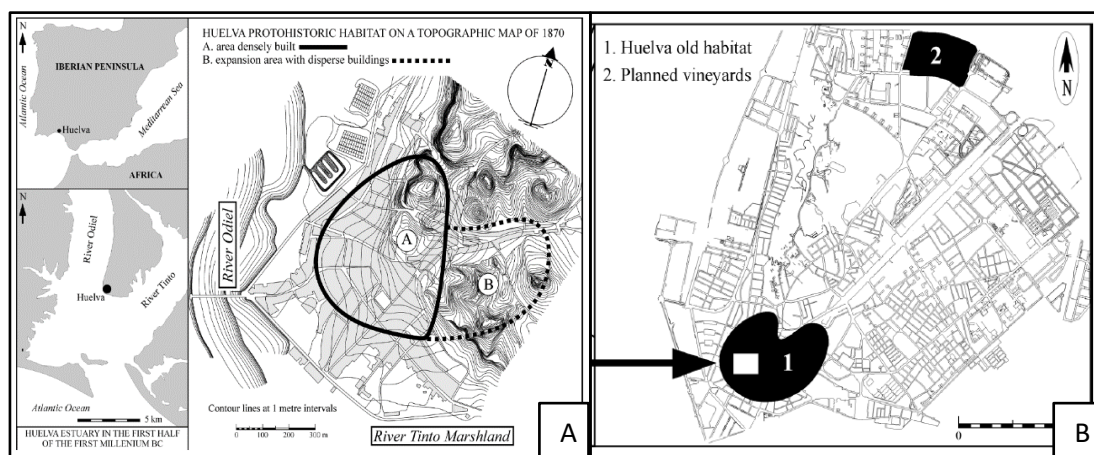


Figura 2. 1: -A. Localización de Huelva y de la antigua ciudad. -B. Ubicación del antiguo poblado y de los viñedos sobre el plano actual de la ciudad de Huelva 1. Antigua ciudad de Huelva, 2. Plano de los viñedos (González de Canales et al., 2020).

Así mismo, las primeras evidencias del vino en la Península Ibérica datan de inicios del siglo VIII a.C. en el Castillo de Doña Blanca, ubicado en la actual provincia de Cádiz (Celestino Pérez, 2009), junto con la presencia de semillas de uva en dicho castillo (Juan-Tresserras, 1999) y el hallazgo de ánforas de tradición fenicia datadas entre el s. VI-V a.C. (Quesada Sanz, 2009), también se ha confirmado la presencia de una instalación vinícola por parte de pueblos ibéricos desde finales del s. VII a.C. en el yacimiento del alto de Benimaquía (Alicante); así como numerosos yacimientos de la zona levantina (Valencia, Alicante) que constatan el desarrollo de la viticultura a partir del siglo V a. C (Bartolomé y Fernandez, 2016).

Si se evalúa la meseta norte (actual Castilla y León), no es hasta el 200 a.C. cuando se identifican en el poblado vacceo de Cauca (Segovia) restos de vid cultivada, lo que sugiere un consumo en fresco de la uva o su llegada a través del comercio (Blanco García, 2009). Otro importante hallazgo es el de los restos del poblado Vacceo de Pintia (Padilla de Duero, Valladolid), donde se ha hallado la presencia de vino junto con otras bebidas fermentadas en el interior de ánforas desde comienzos del siglo IV a.C. hasta mediados del siglo I después de Cristo (d.C.) (Romero Carnicero et al., 2009). Esto demuestra las primeras evidencias del consumo de vino en la actual Denominación de Origen de Ribera del Duero hace más de 2.400 años.

En la actualidad, la superficie mundial se estima en 7,3 millones de hectáreas (ha) incluyendo toda la superficie de viñedo dedicada a vino, zumo, uva de mesa, pasas e incluso viñedos jóvenes que no están en producción. España representó en 2020 una reducción del 0,6% frente a 2019, situándose en una superficie total de 961.000 ha (Tabla 2.1) (OIV, 2021).

España destina más del 95 % de la superficie cultivada a la uva de vinificación. En 2020 el suelo dedicado era de 949.565 ha, la cifra más baja de toda la serie histórica con una ligera reducción frente a 2019 del -0,34%. Castilla y León es la tercera Comunidad Autónoma con mayor superficie de viñedo y aumentó con respecto al 2019 un 4,2% hasta llegar a las 72.891 ha en 2020 (OEMV, 2020).

Tabla 2. 1: Superficie en miles de ha de los diez países con mayor superficie de viñedo (OIV, 2021):

Países	2016	2017	2018	2019 ^a	2020 ^b
España	975	968	972	966	961
Francia	786	788	792	794	797
China	770	760	779	781	785
Italia	693	699	701	713	719
Turquía	468	448	448	436	431
Estados Unidos	439	434	408	407	405
Argentina	224	222	218	215	215
Chile	209	207	208	210	207
Portugal	195	194	192	195	194
Rumanía	191	191	191	191	190

^a datos provisionales

^b Previsión de datos

Las variedades para uva de vinificación que mayor superficie ocupan en España son la variedad tempranillo con 201.502 ha en variedades tintas y la variedad airén que representa 204.699 ha en variedades blancas. En Castilla y León, las variedades con superficies por encima de las 1.000 ha son: tempranillo con 38.928 ha, mencía con 5.063 ha, garnacha tinta con 4.349 ha y prieto picudo con 2.864 ha en variedades tintas, y verdejo con 18.902 ha, palomino con 2.015 ha, doña blanca con 1.496 ha y sauvignon blanc 1.478 ha en variedades blancas (MAPA, 2021).

Además de los aspectos biológicos referidos a la variedad de uva, su cultivo está muy influenciado por la ubicación de la parcela, el clima, el suelo y las prácticas de manejo, todo ello le confiere un carácter diferencial al vino que se expresa como *terroir* (Leeuwen y Seguin, 2006). Este aspecto diferenciador se refuerza mediante las figuras de calidad de los productos alimentarios (entes públicos que velan por preservar la calidad de los alimentos vinculados a su origen) (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea,

2012). Esto ha causado gran impacto en el mundo vitivinícola y la mayoría de los productores de vid se han asociado en figuras como las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) o las Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP), las cuales, mediante sus propios reglamentos, regulan todas las posibles variables que puedan existir en el cultivo de la vid, en especial en Castilla y León (Alonso, 2012).

Los aspectos legales tienen una gran relevancia debido a que existe una legislación muy estricta tanto a nivel europeo como a nivel nacional. Estos aspectos se engloban en el Reglamento (UE) nº 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre de 2013, por el que se crea la Organización Común de Mercados (OCM) de los productos agrarios, que fija la existencia de un sistema de autorización de nuevas plantaciones con un aumento de hasta un 1% anual. Esta ley ha hecho desaparecer al anterior sistema de plantación basado en los derechos de plantación. En el ámbito nacional, la Ley 24/2003 del 10 de julio de la Viña y del Vino da un marco legislativo en España. Y más concretamente a nivel autonómico, la Ley 8/2005, de 10 de junio, de la Viña y del Vino de Castilla y León establece el marco jurídico para la producción, elaboración y comercialización en Castilla y León, siendo todos estos condicionantes determinantes para el cultivo de la vid.

Por tanto, estas particularidades han llevado al cultivo de la vid, a día de hoy, a ser un importante baluarte del sector primario. Solo en Castilla y León ofrece empleo a 19.000 personas, quienes más de 15.000 son viticultores, y con un valor económico de más de 1.000 millones de euros (Vinetur, 2019).

En conclusión, el cultivo de la vid es de gran relevancia histórica, económica y social en España y Castilla y León lo que justifica su estudio. La variedad de vinificación tempranillo es la más adecuada para realizar los ensayos debido a su amplia difusión en el territorio nacional.

2.1.2.- Biología de la vid.

La vid pertenece al género *Vitis* L.(Figura 2.2) y es uno de los 15 géneros de la familia Vitaceae (WFO, 2021). Este género taxonómico comprende dos grandes secciones: *Euvitis*, al que pertenecen la mayoría de especies cultivadas, y *Muscadinia*, de menor importancia, que posee tres especies (Fortes y Pais, 2016).

Dominio: Plantae
Phylum: Magnoliophyta
Clase: Angiospermae
Orden: Vitales
Familia: Vitaceae
Género: <i>Vitis</i>
Especie: <i>Vitis vinifera</i>

Figura 2. 2: Cuadro de la sistemática de la vid según EPPO. (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*)

A día de hoy, el cultivo de la vid necesita del uso de un portainjerto (especie de vid generalmente americana que aporta la parte radicular) por imposición legal (artículo 5.4 de la Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino) y una variedad (parte aérea de una especie de vid generalmente europea) y ambas se

unen por el punto del injerto. El uso del portainjerto o patrón fue motivado por la aparición en Europa a principios del siglo XX de la plaga *Daktulosphaira vitifoliae* Fitch conocida como filoxera, la cual devastó la mayoría de la superficie de viñedo existente hasta ese momento (Piqueras-Haba, 2005). Las principales especies utilizadas como portainjertos derivan, principalmente, de los cruces de *Vitis riparia* Michaux, *Vitis berlandieri* Planchon, *Vitis rupestris* Scheele y *Vitis solonii* Planchon, aunque en la actualidad se están investigando nuevos cruces y revaluando sus usos debido a los cambios ambientales y de manejo que se pueden suceder en el futuro (Marín et al., 2021).

En relación a la variedad, la especie más utilizada es *Vitis vinifera* L. y se considera que hay más de 5.000 variedades conocidas y catalogadas aunque, la mayoría, no tienen aprovechamiento agrícola debido a su escasa productividad o la baja calidad de su uva; destacando en España las variedades tempranillo y airén como se indicó anteriormente (Gómez, 1993). Dentro de *V. vinifera* se distinguen las vides silvestres conocidas como subespecies "*sylvestris*" y las domesticadas, aquellas que se utilizan en la viticultura actual, que son identificadas como subespecies "*sativa*", ambas distinguibles por sus semillas y polen. En la viticultura moderna, el vocablo correcto para referirse al término

variedad es la palabra cultivar la cual deriva de la combinación de cultivo y variedad. En el caso de los cultivares europeos de vid, sus orígenes estarían en la domesticación de las variedades y también por cruces con otras variedades (Jackson, 2008).

Morfología y ciclo fenológico.

En relación con la morfología de una planta de vid (Figura 2.3), se puede distinguir un tronco que se divide en brazos (madera vieja) que portan madera de poda la cual se clasifica según el número de yemas. Se denominan pulgares si poseen menos de dos yemas claramente vistas y el término es varas si poseen más de dos o tres yemas claramente vistas. Sobre éstos, se desarrollan los pámpanos que a su vez pueden ramificarse en nietos (Reynier, 2005).

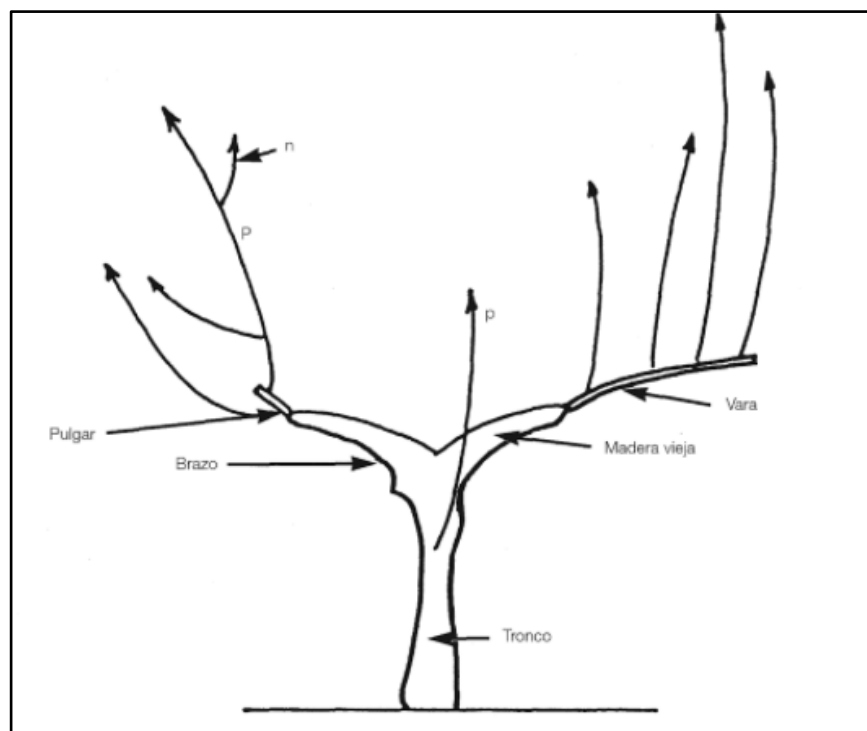


Figura 2. 3: Morfología de la planta de vid; p: pámpanos, n:nietos (Reynier, 2005).

El ciclo fenológico anual de cultivo consta de las siguientes fases según Reynier (2005):

- **Fase de reposo invernal:** la planta está en parada vegetativa y se vuelve a reactivar mediante los lloros (exudación de savia por las heridas de poda efectuadas en el invierno).
- **Fase de desborre:** las yemas se hinchan debido al aumento de la temperatura ambiental y comienza la brotación y crecimiento de los pámpanos (crecimientos de la madera del año en estado herbáceo) hasta que se detienen a finales de agosto. Durante el mes de junio se produce la floración en un tipo de inflorescencia llamada racimo. A continuación, se realiza la fecundación y la evolución de estos ovarios fecundados pasa por diversas etapas hasta completar su maduración. En primer lugar, discurren por una etapa herbácea comprendida entre el cuajado y el envero (fase durante la cual los frutos conocidos como bayas cambian de color su piel). La siguiente etapa es la maduración, que se caracteriza por la acumulación de azúcares en los granos de uvas.
- **Fase de agostamiento:** los pámpanos pierden su carácter herbáceo y se lignifican pasando a denominarse sarmientos. Estos crecimientos del año de distinta longitud poseen en su interior las yemas que darán lugar a la cosecha siguiente.

Sistema de conducción.

Se denomina sistema de conducción al conjunto de la disposición de los elementos permanentes de la planta, el tipo de poda, el sistema de empalizamiento y manejo de la vegetación con diferentes consecuencias en su potencial productivo y cualitativo (Yuste Bombín, 2001). Este sistema se encontrará en equilibrio cuando la superficie foliar se adecúe a las posibilidades del medio, las exigencias de la variedad y los objetivos de la producción (Smart y Robinson, 1991). A día de hoy los dos modos de conducción tradicional descritos en España, según Yuste Bombín (2001), son:

- **Vaso:** modo de conducción en que las plantas se disponen en un tronco sobre cuya parte superior se insertan los elementos vegetales en forma radial sin empalizamientos y dando una posición libre y globosa, poseen generalmente brazos cortos y podados en pulgares.
- **Espaldera:** modo de conducción provisto de un sistema de empalizamiento para conducir la vegetación en una dirección más o menos vertical generando un tipo de vegetación lineal continua que puede ser más o menos abierto en función de la estructura. En la mayoría de los casos, además del tronco, consta de cordones permanentes formados por pulgares o varas de renovación apoyados sobre un alambre de formación. Estos modernos sistemas de formación en espaldera de alta densidad presentan un mayor número de heridas de poda (Gramaje et al., 2018).

Para los estudios llevados a cabo en la presente tesis doctoral se utilizaron plantas injertadas sobre vid americana de *V. vinifera* subsp. *vinifera*. La época de muestreo según el ciclo fenológico y las heridas de poda han sido un punto de evaluación importante debido a la tendencia de los nuevos sistemas modernos de manejo a su mayor proliferación.

2.1.3.- Principales plagas y enfermedades.

La situación cambiante existente, debido al nuevo escenario de cambio climático (Masson-Delmonte et al., 2021), exige una reevaluación de las principales plagas y enfermedades que afectan a la viticultura. Por tanto, según Bois *et al.*, 2017, las principales plagas y enfermedades que preocupan a los viticultores son el oídio, el mildiu, la podredumbre gris, las virosis y las enfermedades de la madera de la vid.

El mildiu es una enfermedad que llega a Europa en la década de 1870 a partir de una única línea genética de las cinco existentes en Norteamérica y su presencia en el continente Europeo sirvió como punto de partida para la difusión por el resto de las zonas vitícolas del mundo (Fontaine et al., 2021). Está causada por el oomiceto

Plasmopara viticola (Berk. & M.A. Curtis) Berl. y De Toni, y es de gran importancia por las importantes pérdidas que puede llegar a producir. Las principales investigaciones se han centrado en la optimización de productos cúpricos, la obtención de nuevas moléculas y formulaciones para prevenir la enfermedad. Se han obtenido fungicidas modernos de base química altamente eficientes que, aplicados conforme a las condiciones climatológicas, pueden prevenir la aparición de cualquier daño causado por esta enfermedad (Gessler et al., 2011). En hojas, este patógeno se manifiesta con la apariencia de “manchas de aceite” en el haz que se corresponden con “pelusilla” blanca en el envés. En el racimo, se caracteriza por curvaturas en forma de S, oscurecimiento del raquis y posterior recubrimiento de película blanquecina. Las condiciones necesarias para una infección primaria son esporas maduras, brotes de vid de ,al menos, 10 centímetros, lluvia superior a 10 mm en uno o dos días y temperatura media superior a los 12°C (Arias Giralda et al., 1988).

El oídio es otra enfermedad causada por el hongo *Erysiphe necator* Schwein., ampliamente extendida en España, que, en condiciones climáticas favorables puede causar la pérdida total de la cosecha. Llegó a Inglaterra desde Norteamérica en 1845 y se difundió a Francia y de ahí al resto de Europa. La aplicación de azufre es el principal método de control debido a su eficacia, bajo coste, ausencia de resistencias y su aparente percepción como sustancia natural. Pero la poda, deshojado y el sistema de formación tienen un papel clave para la disminución de la afección de esta enfermedad (Gadoury et al., 2012). Los síntomas se caracterizan por la aparición de polvo blanco en el haz y el envés de las hojas. En brotes y sarmientos se pueden visualizar manchas de color verde oscuro a tonos achocolatados, pero los daños más importantes se localizan en los racimos, ya que un ataque importante puede provocar la detención del crecimiento de la piel y la aparición de agrietamiento y rajado de las bayas. La temperatura es el factor climático que más influencia tiene, alcanzando el óptimo entre 25 y 28°C (Arias Giralda et al., 1988).

La podredumbre gris es una patología causada por *Botrytis cinerea* Pers. . Provoca importantes daños en la zona norte y mediterránea de España cuando las condiciones climáticas de humedad, principalmente, son favorables. Puede afectar a todos los

órganos verdes de la cepa, pero los mayores daños son causados en el racimo. Se manifiesta en floración-cuajado y durante el periodo de envero-recolección, donde las bayas presentan un aspecto característico de podridos y sobre su superficie se desarrolla un hongo de color grisáceo. El ataque en ambos periodos produce una disminución importante de la cosecha, además de una disminución de la calidad de los vinos cuando el ataque se produce en el periodo de envero-recolección. Se puede controlar el ciclo de esta enfermedad mediante la información del clima (principalmente humedad), el estado fenológico de la planta y la caracterización del patógeno en la parcela (Arias Giralda et al., 1988).

Las principales virosis que afectan a las plantas de vid actualmente en España según Martín Gil *et al.*, 2014 son: el entrenudo corto infeccioso, virosis afines de la vid (*grapevine fanleaf virus*, GFLV y *arabic mosaic virus*, ArMV) y el enrollado de la vid (*grapevine leafroll-associated virus 1*, GLRaV-1 y *grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3). Los principales métodos de control sobre los que se centran las investigaciones son la producción de material vegetal sano certificado, la reducción de la presencia de los vectores que transportan estos virus y la producción de variedades resistentes mediante ingeniería genética (Maliogka et al., 2015).

Y finalmente, las enfermedades de la madera de la vid (EMV), a día de hoy son un problema de importancia mundial que produce grandes pérdidas económicas y que carece actualmente de una única solución efectiva (Gramaje et al., 2018). Estas enfermedades serán descritas en los apartados siguientes.

2.2. ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID (EMV).

Están causadas por un conjunto de hongos patógenos cuya característica común es la alteración interna de la madera de las plantas de vid debido a una necrosis, infección vascular o una pudrición seca. Estas plantas tienen un decaimiento generalizado ya sea por retrasos en la brotación, reducción en el desarrollo, clorosis en hojas y/o marchitez, apoplejías o decaimiento de la planta. También suelen aparecer síntomas foliares característicos del tipo de enfermedad al que estén asociados (Gramaje et al., 2018).

2.2.1.- Importancia y distribución geográfica.

Aunque ya hay registro de la presencia de las EMV desde finales del siglo XIX, su gran impacto en las plantas de vid ha sido reconocido recientemente. Ha habido un incremento de la incidencia de estas enfermedades en los últimos años debido a varios factores. El primero ha sido el incremento significativo en la producción de planta de vid y su plantación durante la década de los años 90, aumentando también la movilidad de material potencialmente contaminado por todo el mundo. La prevalencia de los síntomas visuales se manifiesta ahora, por lo que su presencia se hace aún más constatable. También existe un cambio en los métodos de producción durante las últimas décadas, en los que se ha pasado de viñedos en vaso con bajas densidades de plantación a plantaciones en espaldera con una mayor densidad. Estos nuevos viñedos tienen la posibilidad de podas mecánicas, lo que deriva en un mayor número de heridas de poda (Gramaje et al., 2018). Y finalmente, la prohibición del arsenito de sodio junto a otros fungicidas debido a los daños para la salud y el medio ambiente asociados a su uso (Decoin, 2001), retirando del mercado los únicos productos que eliminaban eficazmente los hongos causantes de las EMV (Larignon et al., 2008).

Estas enfermedades se consideran una amenaza para el sector vitivinícola mundial debido a las grandes pérdidas económicas causadas, la ausencia de métodos curativos, el incremento de plantas asintomáticas contaminadas en los viñedos, el incremento de la superficie de viñedos afectados a nivel mundial, la muerte de la planta y su coste de reposición y así como la dificultad de su control una vez establecida en la misma (Rubio y Garzón, 2011; Fontaine, 2016; Gramaje et al., 2016).

Europa es considerado el continente con la mayor superficie de viñedo, representando el 65% de la producción mundial y el 70% de las exportaciones de vinos en el mundo y las EMV son una gran amenaza a la viticultura europea (Fontaine, 2016). En el caso de Francia, el país con la segunda mayor extensión de viñedo del mundo y el segundo en producción de vino (OIV, 2021), se estima que, al menos, el 13% de sus viñedos están afectados por las EMV (Grossman y Doublet, 2012). Las pérdidas estimadas en este país son de hasta 1.000 millones de Euros, dificultando el cultivo de la vid para obtener

rendimientos económicos (Lorch, 2014). La extensión de las EMV en Francia varía con respecto a la zona vitícola, pero las plantas improproductivas (muertas, perdidas, replantadas o en proceso de restauración) por las EMV representan una parte significativa de las pérdidas por encima del 50% en regiones como Burdeos y Borgoña (Bruez et al., 2013). Otro importante país a reseñar es Italia, que destaca por ser el principal productor de vino del mundo y el cuarto país en superficie de viñedo (OIV, 2021). En la región italiana de Sicilia han sido reportadas plantas con síntomas compatibles con EMV en un 15% (Sidoti et al., 2000). En todo el sur de Italia hasta el 80% de plantas de vid han sido asociadas con síntomas compatibles por las EMV (Romanazzi et al., 2009).

Finalmente, España es el país con la mayor superficie de viñedo del mundo (OIV, 2021) y se pueden identificar por regiones la incidencia de las EMV.

En Castilla-La Mancha, principal zona vitícola en extensión de España y una de las más importantes del mundo (MAPA, 2021), se han realizado un gran número de estudios en los últimos 20 años para la identificación y la caracterización de las EMV (Gramaje et al., 2020). Un ensayo de caracterización de sensibilidad varietal del banco de germoplasma localizado en la DO La Mancha describe un 0,57% de plantas muestreadas con síntomas externos compatibles por las EMV y el 38,3% de las variedades evaluadas mostraron estos síntomas (Chacón-Vozmediano et al., 2021). También, en la DO Manchuela se evaluó una parcela para el seguimiento de EMV durante 15 años. El ensayo se realizó entre 2004 y 2018, y alcanzó un porcentaje acumulado de mortalidad en el último año del mismo de casi el 10% en la variedad monastrell y del 5,13% en la variedad bobal. Destaca el incremento anual de plantas muertas al cambiar el sistema de conducción de vaso a espaldera (Gramaje et al., 2020).

En Castilla y León, hubo un significativo aumento en la incidencia de las EMV de un 1,8% en 2001 a un 7% en 2006 (Martín y Cobos, 2007). En las prospecciones llevadas a cabo en 2015, en más del 50% de las parcelas muestreadas se ha detectado la presencia de las EMV, siendo las figuras de calidad más afectadas la DO Toro y la DO Tierra del

Vino de Zamora. También destacan las variedades con mayor afección como tempranillo, garnacha y garnacha tintorera (Barajas et al., 2019).

En Navarra, se evaluó la incidencia de las EMV en plantas jóvenes de tempranillo sobre distintos patrones. Los datos de evaluación de la incidencia de EMV para las campañas 2016, 2017 y 2018 demostraron unos síntomas erráticos en referencia a la yesca y decaimientos por *Botryosphaeria* pero en el caso de la eutipiosis mostraron una incidencia acumulada de más del 10 % para el portainjerto 161-49 C (Gramaje et al., 2020).

En resumen, las EMV en España son un importante problema por lo que son incluidas dentro de las líneas estratégicas de I+D+I 2021/2024 por parte de la Plataforma Tecnológica del Vino (PTV). La PTV es el principal agente de innovación y cohesionador del sector vitivinícola español y en esta línea estratégica se busca profundizar en el conocimiento y en la prevención de las enfermedades de la madera de la vid dentro del área de viticultura (Plataforma Tecnológica del Vino, 2021).

2.2.2.- Sintomatología y hongos implicados.

Las EMV pueden clasificarse según la edad de la planta, aquellas que afectan a plantas de vid jóvenes (principalmente pie negro y enfermedad de Petri) y a los viñedos establecidos (yesca, eutipiosis, decaimiento por *Botryosphaeria* y excoriosis). Todas estas enfermedades causan elevados costes adicionales a los viticultores debido a la reposición de plantas afectadas o muertas (Armengol, 2017). Cada una de estas enfermedades puede ser caracterizada de forma individual como se expone a continuación:

Enfermedad de Petri

La enfermedad de Petri afecta a plantas de vid jóvenes, generalmente al material de propagación de los viveros y al establecimiento de nuevas plantaciones (Gramaje y Armengol, 2011; Gramaje et al., 2018). La primera referencia es dada por el profesor Lionello Petri en 1912 donde dos especies de *Cephalosporium* y una de *Acremonium* son asociadas a estrías necróticas en la madera y decaimientos de plantas de vid (Petri, 1912).

Los síntomas externos incluyen retrasos en el desarrollo, brotes con entrenudos cortos, hojas de menor tamaño, escasa vitalidad de las plantas y finalmente la muerte de las mismas (Gramaje y Armengol, 2011). Esta enfermedad se puede reconocer por la presencia de compuestos fenólicos de color oscuro en los haces del xilema (Rooney-Latham et al., 2005). Se observan punteaduras negras cuando se cortan transversalmente y estrías de color marrón a negro en los cortes longitudinales. Todos estos síntomas se visualizan en el interior de troncos y brazos (Mostert et al., 2006b). Las principales especies asociadas con esta enfermedad son una combinación de *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous & M.J. Wingf. & L. Mugnai) Crous & W. Gams y varias especies de *Phaeoacremonium* W. Gams, Crous & M.J. Wingf. (Mostert et al., 2006b). Recientemente se han descrito hasta 29 especies del género *Phaeoacremonium*, 6 especies del género *Cadophora* y *Pleurostoma richardsiae* que también están asociadas a esta enfermedad (Gramaje et al., 2018).

Pie negro

Es una enfermedad de gran importancia en la mayoría de las zonas vitícolas del mundo y afecta a los viveros y a los viñedos jóvenes. Externamente, las plantas de vid presentan crecimientos débiles, clorosis internervial y necrosis llegando incluso a no brotar (Agustí-Brisach y Armengol, 2013).

Todas estas sintomatologías externas las hacen difícil de distinguir de desórdenes abióticos o incluso de la enfermedad de Petri. Internamente, se puede identificar por coloraciones oscuras, tejidos hundidos y lesiones necróticas en las raíces y por decoloraciones pardo rojizas en la base del tronco de las plantas afectadas (Gramaje et al., 2018). Al retirar la corteza se pueden observar decoloraciones oscuras, estrías y necrosis de color marrón oscuro a negro en el tejido vascular de la madera desde el extremo basal del patrón (Halleen et al., 2006).

Se incluyen, como agentes causantes, diversas especies de los géneros *Campylocarpon* Halleen, Schroers & Crous, *Cylindrocladiella* Boesew, *Dactylonectria* L. Lombard & Crous, *Ilyonectria* P. Chaverri & C. Salgado, *Neonectria* Wollenw., *Pleiocarpon* L. Lombard & D.

Aiello, y *Theλονectria* P. Chaverri & C. Salgado (Gramaje et al., 2018; Berlanas et al., 2019, 2020).

Eutipiosis

La eutipiosis suele afectar a los viñedos a partir del sexto año y los síntomas se manifiestan más evidentemente durante la primavera (Munkvold, 2001) . Los síntomas externos incluyen brotes con crecimientos raquíticos y hojas cloróticas que a menudo poseen necrosis marginales (Fig 2.4-A) (Gramaje et al., 2018). Los síntomas internos se caracterizan por necrosis internas en forma de cuña en la sección transversal de brazos y troncos. Estos síntomas empiezan en el exterior del xilema y se propagan hasta la médula de forma progresiva causando la muerte de pulgares y brazos (Gramaje et al., 2018). Se comprobó que la incidencia de este patógeno es mayor cuanto mayor es la superficie total expuesta tras la poda, independientemente del tamaño de poda de los pulgares y por lo tanto, la reducción de la superficie total de poda en plantas de la variedad Shiraz, reducía la incidencia y severidad de la eutipiosis (Henderson et al., 2021).

El principal agente causal más virulento y prevalente es *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. (Carter, 1988, 1991). Los síntomas foliares están causados por metabolitos secundarios tóxicos producidos por éste patógeno (Mahoney et al., 2005) y es el único agente causal capaz de producir los síntomas en hojas (Trouillas y Gubler, 2010). Recientemente se ha descrito la presencia de *E. lata* en Sudamérica (Chile), zona que había estado libre de la presencia de este patógeno (Lolas et al., 2020).

Se han descrito otros géneros pertenecientes a la familia *Diatrypaceae* que también causan esta enfermedad como son *Anthostoma* Nitschke, *Cryptosphaeria* Ces. & De Not., *Cryptovalsa* Ces. & De Not. Ex Fuckel, *Diatrype* Fr., *Diatrypella* (Ces. & De Not.) De Not., and *Eutypella* (Nitschke) Sacc. (Trouillas y Gubler, 2010; Luque et al., 2012; Pitt et al., 2013a; Rolshausen et al., 2014).

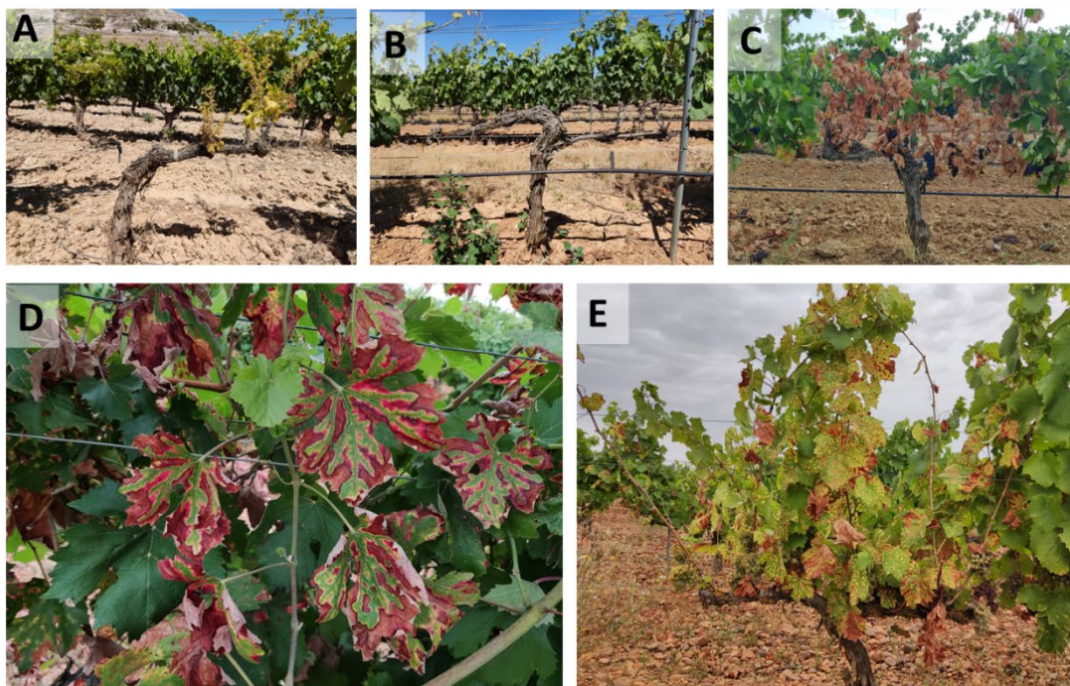


Figura 2. 4: Enfermedades de la madera de la vid.-A. Síntomas foliares característicos de eutiposis con hojas cloróticas y débiles crecimientos de pámpanos. -B Cordones y pulgares con ausencia de crecimientos con síntomas compatibles por decaimiento por *Botryosphaeria*. -C Planta colapsada durante el periodo de verano por apoplejía, perteneciente a la sintomatología de la yesca. -D Síntomas característicos en hojas de GLSD en variedad tinta prieto picudo, perteneciente a la sintomatología de la yesca. -E Síntomas característicos en hojas de GLSD en variedad blanca albarín blanco, perteneciente a la sintomatología de la yesca.

Decaimiento por *Botryosphaeria*

El decaimiento por *Botryosphaeria* es posible encontrarlo en viñedos adultos de más de 8 años pero también se han observado chancros y muerte de plantas en material de propagación de viveros (Gramaje y Armengol, 2011). Los síntomas de esta enfermedad se asocian con ausencia del crecimiento de los pámpanos durante la primavera en los pulgares afectados, muerte de las yemas, hojas cloróticas y decaimientos (Fig 2.4 -B) (Urbez-Torres, 2011). El principal síntoma en madera es la presencia de chancros en forma de cuña o necrosis circulares centrales o no uniformes en las secciones transversales de la madera afectada (Gramaje et al., 2018).

Se han descrito, hasta la fecha, 26 especies referidas a la familia Botryosphaeriaceae que pertenecen a los géneros *Botryosphaeria* Ces. & De Not., *Diplodia* Fr., *Dothiorella* Sacc., *Lasiodyplodia* Ellis & Everh., *Neofusicoccum* Crous, Slippers & A.J.L. Phillips,

Neoscytalidium Crous & Slippers, *Phaeobotryosphaeria* Speg., y *Spencermartinsia* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous, causantes del decaimiento por *Botryosphaeria* (Urbez-Torres, 2011; Pitt et al., 2013a, 2013b, 2015; Rolshausen et al., 2013; Yang et al., 2017).

Neofusicoccum parvum (Pennycook & Samules) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Diplodia seriata* De Not y *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not, son los hongos aislados más frecuentemente (Urbez-Torres, 2011). Algunos de ellos como *N. parvum* y *D. seriata* se ha demostrado en condiciones de laboratorio que son capaces de metabolizar rápidamente los estilbenos, sustancias con actividad biológica frente a patógenos que emite la planta de vid, así como de presentar una elevada actividad enzimática, que ,en conjunto, serían importantes factores de virulencia frente a la planta de vid (Labois et al., 2021). Varias especies de estos géneros (*Neofusicoccum*, *Diplodia* y *Dothiorella*) son capaces de producir una gran cantidad de enzimas extracelulares amilasas, celulasas, lacasas, lipasas, pectinasas, pectin-lisas, y proteasas (Esteves et al., 2014).

Excoriosis

Los síntomas causados por esta enfermedad son muy similares a los que suceden en los decaimientos por *Botryosphaeria*; presencia de chancros y ausencia de desarrollo de los pulgares afectados con especial afección en las zonas con climas templados y húmedos durante la época de desarrollo vegetativo (Úrbez-Torres et al., 2013). La principal especie es *Diaporthe ampelina* Berk. & M.A. Curtis (syn. *Phomopsis viticola* Sacc.), la cual causa la infección conocida como excoriosis en Europa (Punithalingam, 1979) y phomopsis en Estados Unidos (Pearson y Goheen, 1994).

Yesca

Enfermedad que ya era conocida en la época de los griegos y los romanos (Mugnai et al., 1999). Tradicionalmente se han descrito en los viñedos dos formas de esta enfermedad, crónica y apopléjica (Gramaje et al., 2018). La forma apopléjica de yesca (Fig 2.4-C) se caracteriza por un decaimiento repentino de la planta entera o de los brazos o de varios

pámpanos (Gramaje et al., 2018). En la forma crónica se observa el síntoma foliar más característico que se corresponde con un patrón tigreado en las hojas (Surico, 2009). Se observan decoloraciones en las hojas con bordes secos y con patrones de coloración rojizos en las variedades tintas (Fig 2.4-D) y coloraciones amarillas en las variedades blancas (Fig 2.4-E). Estas hojas presentan arrugamientos, quemaduras y decaimientos. También es frecuente observar secado de los racimos (Mugnai et al., 1999).

En ambos casos, la sintomatología aparece a finales de primavera o durante el verano. La expresión de los síntomas puede variar de año a año y ser errática, lo que dificulta su seguimiento. Los síntomas internos en la madera se caracterizan por punteaduras negras en el xilema rodeadas de decoloraciones rosas a marrones, con estrías necróticas vasculares o pudriciones secas (Fischer, 2002). En los apartados posteriores se describirá con más profundidad la problemática de la etiología de esta enfermedad.

Actualmente la yesca se encuentra en estrecha relación con la enfermedad de Petri (Fig. 2.5), habiéndose postulado como hongos iniciadores de estas enfermedades a *P. minimum* y *P. chlamydospora* (Mugnai et al., 1999).

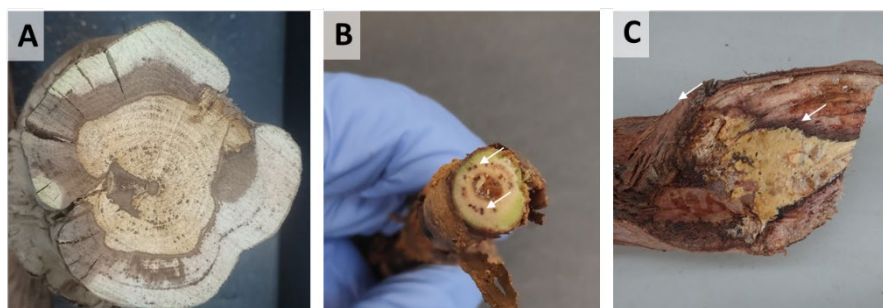


Figura 2. 5: -A. Sintomatología característica de la yesca con pudriciones secas y necrosis. -B. Tilosas producidas en la planta de vid joven. -C Coloraciones rojizas y pudriciones secas en madera.

Otro aspecto importante es el efecto de las temperaturas y la deficiencia de agua en la planta y los patógenos, siendo muy diferente el efecto causado según el patógeno, planta, intensidad, duración y tipo de estrés. Por lo que es necesario un mayor número de estudios en relación a una respuesta combinada de estreses con el fin de interpretar bien la relación entre el patrón, la variedad y la relación con los estreses abióticos y las EMV (Songy et al., 2019).

En conclusión, la problemática de las enfermedades de la madera de la vid es un problema a nivel mundial sin una solución. El presente estudio se centrará sobre uno de los principales patógenos en Castilla y León y agente etiológico de la yesca y enfermedad de Petri que es *P. minimum*, y se estudiará en relación con las condiciones climáticas con especial incidencia en la temperatura.

2.3. *Phaeoacremonium* spp.

Anterior a su definición como género, fueron descritas cepas de *Acremonium* y *Cephalosporium* que causaban decaimientos de plantas de vid (Petri, 1912; Chiarappa, 1959). Una de las cepas anteriormente descritas de *Cephalosporium* (CBS 239.74) fue revaluada y se confirmó que morfológicamente era diferente a la especie causante de decaimientos en plantas leñosas *Phialophora parasitica* Ajello, Georg & C.J.K. Wang. Por tanto, en base a *P. parasitica* y cepas similares provenientes de humanos y de varias muestras de especies leñosas incluida la vid, fue definido el nuevo género *Phaeoacremonium* que será descrito a continuación (Crous et al., 1996; Mostert et al., 2006b).

2.3.1.- Importancia del género *Phaeoacremonium*.

Descripción, sistemática y morfología.

La primera referencia a *Phaeoacremonium* está asociada a un nuevo género de hifomicetos en el año 1996 y se establecieron cinco nuevas especies asociadas al mismo: *Phaeoacremonium aleophilum*, *P. angustius*, *P. chlamydosporum*, *P. inflatipes*, *P. rubrigenum* y se reasignó una especie más que anteriormente pertenecía al género *Phialophora* con la nueva denominación de *Phaeoacremonium parasiticum*. Su denominación es debida a que sus características morfológicas se encuentran entre las del género *Phialophora* y del género *Acremonium* (Crous et al., 1996). Aunque en la actualidad están descritas en el Index Fungorum 69 especies (Index Fungorum, 2021), están aceptadas 62 especies del género *Phaeoacremonium* (Marin-Felix et al., 2019; Crous et al., 2021). Se debe reseñar el cambio realizado dentro de este género por la especie *Phaeomoniella chlamydospora*,

anteriormente denominada como *Phaeocremonium chlamydosporum*, y que actualmente está clasificada dentro del género *Phaeomoniella* (Crous y Gams, 2000). Este patógeno es uno de los principales hongos pioneros de las EMV (Gramaje et al., 2018).

Dominio: Fungi
Phylum: Ascomycota
Clase: Sordariomycetes
Orden: Togniniales
Familia: Togniniaceae
Género: <i>Phaeocremonium</i>

Figura 2. 6: Clasificación taxonómica del género *Phaeocremonium* según EPPO.

El género *Phaeocremonium* fue confirmado como anamorfo de *Togninia* (Mostert et al., 2003) y se realizó un amplio estudio sobre su taxonomía, determinando las claves para la identificación de sus distintas especies

(Mostert, 2006). Pero tras el movimiento

general micológico de “Un hongo-Un nombre”/“*One fungus-One name*” (Taylor, 2011), *Togninia* fue excluido de esta clasificación, con la reasignación de varias especies y su definición como sinonimia de *Phaeocremonium* (Gramaje et al., 2015). *Phaeocremonium* pertenece a la familia *Togniniaceae* (Fig. 2.6).

Para la clasificación de los caracteres de cultivo se ha utilizado tradicionalmente el medio de cultivo de extracto de malta con agar al 2%. También se ha descrito la producción de un pigmento amarillo sobre medio de cultivo de patata dextrosa y agar (PDA), su tasa de cultivo a 25°C y la temperatura máxima de crecimiento, aunque se recomienda combinarlo con identificaciones de carácter molecular para poder identificar plenamente la especie (Mostert et al., 2005). Para su identificación a nivel de especie son recomendados el análisis de las secuencias del marcador *TUB2* que codifica para la subunidad de la beta tubulina y *act* (proteína de la actina) (Jayawardena et al., 2019). Incluso una combinación de un mayor número de genes marcadores permite una clasificación aún más precisa (Úrbez-Torres et al., 2014). Es considerado como un género monofilético de taxones, por lo que todos provienen de un único ancestro común (Gramaje et al., 2015). En lo referido a sus características morfológicas generales, posee un micelio verrugoso con conidióforos pigmentados y con células conidiógenas fialídicas y conidios aseptados hialinos cuya forma varía de oblongoelipsoidal a

alantoide. Generalmente los conidios se reúnen en cabezas en los ápices de las fiálides (Gramaje et al., 2015).

Patogenicidad y enfermedades asociadas

Aunque está asociado a más de 40 especies vegetales de plantas generalmente leñosas a las que causa estrías necróticas (Marin-Felix et al., 2019), el principal hospedador de este patógeno es la planta de vid (Mostert et al., 2006b; Gramaje et al., 2015; Spies et al., 2018). En la actualidad se han descrito hasta 30 especies que afectan al cultivo de la vid en el mundo (Gramaje et al., 2015; Spies et al., 2018; Crous et al., 2021), siendo la especie *Phaeoacremonium minimum* [antes *Phaeoacremonium aleophilum*, en 2015 fue renombrada como *Phaeoacremonium minimum* (Tulasne & C. Tulasne) D. Gramaje, L. Mostert & Crous (Gramaje et al., 2015)], la más prevalente en la mayoría de los viñedos (Larignon y Dubos, 2000; Mostert et al., 2006a; Martín y Cobos, 2007; Gramaje et al., 2011b). Estudios de patogenicidad de especies de este género sobre plantas de vid han demostrado que las especies de *Phaeoacremonium mortoniae* y *P. minimum* (anteriormente *P. aleophilum*) causaron una disminución significativa en el peso de las raíces y que *Phaeoacremonium parasiticum*, *P. angustius*, *P. inflatipes* y *P. venezuelense* causaron síntomas foliares significativos (Aroca y Raposo, 2009).

Se ha descrito como causante de la enfermedad tópica en humanos Phaeohyphomycosis (Gramaje et al., 2015) y se ha descrito como patógeno de las larvas de escarabajos de la madera, artrópodos y también capaz de permanecer en diversos suelos (Jayawardena et al., 2019).

A continuación, se presentan las especies del género *Phaeoacremonium* descritas como agentes patógenos en especies vegetales de cultivo en España (Tabla 2.2).

Tabla 2. 2: Principales especies vegetales afectadas por *Phaeoacremonium* en España:

ESPECIE VEGETAL	ENFERMEDAD	ESPECIE PATÓGENA	REFERENCIA
ALBARICOQUE <i>Prunus armeniaca</i>	Decaimiento	<i>P. venezuelense</i>	(Olmo et al., 2014)
ALMENDRO <i>Prunus amygdalus</i>	Decaimiento	<i>P. iranimum</i>	(Gramaje et al., 2012)
		<i>P. amygdalinum</i>	(Gramaje et al., 2012)
OLIVO <i>Olea europaea</i>	Decaimiento	<i>P. italicum</i>	(Agustí-Brisach et al., 2021)
		<i>P. minimum</i>	(Agustí-Brisach et al., 2021)
		<i>P. parasiticum</i>	(Agustí-Brisach et al., 2021)
		<i>P. scolyti</i>	(Agustí-Brisach et al., 2021)
PISTACHO <i>Pistacia vera</i>	Decaimiento	<i>P. minimum</i>	(López-Moral et al., 2020)
VID <i>Vitis vinifera</i>	Yesca/enfermedad de Petri	<i>P. cinereum</i>	(Gramaje et al., 2009a)
		<i>P. fraxinopennsylvanicum</i>	(Gramaje et al., 2007)
		<i>P. hispanicum</i>	(Gramaje et al., 2009a)
		<i>P. inflatipes</i>	(Gramaje et al., 2009a)
		<i>P. iranimum</i>	(Gramaje et al., 2009a)
		<i>P. krajdenii</i>	(Gramaje et al., 2011a)
		<i>P. minimum</i>	(Armengol et al., 2001)
		<i>P. parasiticum</i>	(Aroca et al., 2006)
		<i>P. scolyti</i>	(Gramaje et al., 2008)
		<i>P. sicilianum</i>	(Gramaje et al., 2009a)
<i>P. viticola</i>	(Aroca et al., 2008)		

Elaboración propia a partir de (Gramaje et al., 2020).

2.3.2.- *Phaeoacremonium minimum*

Está considerado como uno de los agentes etiológicos de la enfermedad de Petri y de la yesca, enfermedades descritas en el apartado anterior (Gramaje et al., 2018). Sin embargo, la etiología de la yesca ha sido un tema de discusión durante los últimos 20 años y, a día de hoy, no se ha alcanzado un consenso (Gramaje et al., 2018). Según Surico et al. 2006 se considera como complejo de la yesca (Fig 2.7), y el hongo *P. minimum* está descrito como agente etiológico en cuatro de las cinco enfermedades que lo forman: la enfermedad de Petri, el estriado necrótico de la madera, la enfermedad del tigreado de la hoja de vid (GLSD) y la yesca propiamente dicha. En el caso de la podredumbre blanda, está causado por *Fomitiporia* spp. y otros hongos basidiomicetos.

Complejo de la yesca				
Inferior a 1-7 años de edad		Edad de la planta		Mayor de 8 años
Estriado necrótico	Enfermedad de Petri	GLSD	Podredumbre blanda	Yesca propiamente dicha
				
				
				

Figura 2. 7: El complejo de la yesca. Los cinco síndromes del complejo de la yesca y sus agentes etiológicos. Adaptado de Mondello et al., 2018.

Esto es debido a que se han aislado otras bacterias endofíticas y otros hongos patógenos de la misma madera afectada por esta enfermedad (Hofstetter et al., 2012; Bruez et al., 2014, 2015). Por lo que, a día de hoy, permanece incierta la relación que tienen los distintos patógenos y microorganismos en el desarrollo de esta enfermedad.

Principales hipótesis.

La principal hipótesis en la yesca, es la infección de las plantas jóvenes por los hongos del género *Phaeoacremonium* (siendo el principal y más prevalente *P. minimum*) y *Phaeomoniella chlamydospora* quienes provocan los síntomas de la yesca. Posteriormente, esto permite el desarrollo de hongos basidiomicetos aunque no se ha demostrado por los postulados de Koch la acción de muchos de ellos (Gramaje et al., 2018). Se han descrito algunos géneros de basidiomicetos como *Inocutis* Fiasson & Niemela, *Inonotus* P. Karst, *Fomitiporella* Murrill, *Fomitiporia* Murrill, *Phellinus* Quel, y *Stereum* Hill ex Pers. (Cloete et al., 2015; Guerin-Dubrana et al., 2019). Recientemente se ha confirmado que *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. es el principal hongo patógeno basidiomiceto asociado a la yesca (Bruez et al., 2021), aunque también se han descrito varias especies de *Cadophora* relacionadas con la afección de esta enfermedad (Travadon et al., 2015).

Así mismo, la principal hipótesis de los síntomas característicos en hojas (GLSD) propone que son derivados de dos acciones concomitantes. El primero es la producción de elicitores o toxinas por parte de los hongos traqueomicóticos como *P. minimum* y *P. chlamydospora*, y el segundo es la oclusión de los haces vasculares de la planta por tilosas y geles derivados de la presencia de estos hongos en los mismos haces. Esta última acción

provoca que la planta no pueda nutrirse correctamente y muestren esos síntomas resultado de multicarencias nutricionales (Bortolami et al., 2019).

La oclusión de los haces vasculares sucede debido a la generación de estreses bióticos y/o abióticos. Los hongos traqueomicóticos *P. minimum* y *P. chamydospora* entran en los haces vasculares de la planta y ésta, con el fin de detener su avance, forma estructuras de fenoles en forma de tilosas, geles, compuestos fenólicos no estructurales, suberina y almidón en los haces del xilema, provocando una menor capacidad de nutrición de las hojas, lo que termina en la sintomatología característica de multicarencia o incluso la muerte de la planta. Aunque la planta logra detener el avance de los patógenos, provoca su propia muerte por la oclusión de sus haces vasculares (Mugnai et al., 1999; Sun et al., 2008; Pouzoulet et al., 2017).

Características biológicas y genéticas.

P. minimum se ha descrito con un óptimo de crecimiento entre 25°C y 30°C y con un rango de temperatura máximo y mínimo entre 10°C y 35°C (Valtaud et al., 2009). También se ha definido como su óptimo de actividad de agua entre -0,3 y -2,3 (MPa) con una disminución del 50% de su crecimiento en valores de -4 a -5 MPa (Whiting et al., 2001). Se ha estudiado la presencia de micovirus en esta especie, y a diferencia del resto de patógenos de la vid, los virus afectan a este patógeno solo en tejidos de plantas sintomáticas, sugiriendo una posible coevolución donde los virus no reducen el efecto patógeno de *P. minimum* (Nerva et al., 2019). En relación a la variabilidad biológica, se identificaron hasta 42 diferentes haplotipos de muestras recolectadas de viñedos de *P. minimum* (Péros et al., 2000). La afeción de este patógeno puede variar dependiendo del cultivar al que afecte (Sparapano et al., 2001) y al tipo de patrón, siendo el portainjerto 161-49C el menos susceptible en condiciones de cultivo en España junto con otras especies de este género (Gramaje et al., 2010b). También se estudiaron 58 aislados de *P. minimum* representativos de distintos puntos de España, concluyendo que estas poblaciones provienen de 4 introducciones independientes con un genotipo diferenciado. No obstante, se hallaron idénticos genotipos en distintas zonas geográficas,

lo que sugiere una infección por el movimiento de este material (Gramaje et al., 2013). Aunque un estudio sobre 36 aislados de *P. minimum* de Castilla y León mediante la secuenciación de 6 regiones genómicas determinó que existían considerables diferencias entre aislados de esta Comunidad Autónoma (Martín et al., 2014).

Para la identificación de *P. minimum* se desarrollaron oligonucleótidos específicos a partir del gen que codifica para la beta-tubulina en el intrón 1 (palFI1 y palRI1) (Martín et al., 2012). También se ha descrito otro procedimiento para identificar esta especie mediante el diseño de los oligonucleótidos PalQF y PalQR de otra región distinta del gen beta-tubulina (intrones 1 y 2) (Pouzoulet et al., 2013) y de la actina (Reid et al., 2006) utilizando PCR a tiempo real a partir de muestras de planta de vid. El uso de la tecnología de ADN-macroarray permitió la identificación de varias especies del género *Phaeoacremonium* junto con otras especies que causan las EMV al mismo tiempo, siendo una técnica rápida y muy adecuada para la identificación de este tipo de enfermedades (Úrbez-Torres et al., 2015). También el uso de ensayos serológicos a partir de los polipéptidos secretados por *P. minimum* podría ser una herramienta más para su identificación (Fleurat-Lessard et al., 2014).

Epidemiología

P. minimum vive en el xilema y la médula como un endófito y puede ser transportado a través de la savia (Feliciano y Gubler, 2001). Este hongo puede colonizar corteza, médula y fibras del xilema, incluso puede aparecer en el lumen de los haces del xilema como se explicó anteriormente (Pierron et al., 2015). Este patógeno es posible encontrarlo en sarmientos podados y sin podar de la planta de vid (Larignon y Dubos, 2000). También puede ser inoculado en el suelo a partir de estos restos de poda y ser patógeno del propio suelo e infectar las raíces de las plantas de vid a partir de estos inóculos naturales de *P. minimum* (Gramaje et al., 2015). Al llegar la primavera, *P. minimum* aumenta su actividad por las condiciones ambientales que favorecen la entrada en actividad de la planta de vid, lo que provoca una mayor dispersión de las conidias y ascosporas por parte de agua, vientos e insectos principalmente (Mostert et al., 2006b; Moyo et al., 2014). Las ascosporas son liberadas durante periodos de lluvia o por la acción de sistemas de

aspersión e infectan las heridas de poda (Larignon y Dubos, 2000; Eskalen et al., 2004, 2007). Las heridas de poda son la principal fuente de entrada de los patógenos de las EMV (Gramaje et al., 2018) y éstas permanecen susceptibles a una infección por este patógeno hasta 4 meses después de la poda (Eskalen et al., 2004). Recientemente, esta especie junto con *P. inflatipes* fue confirmado como inóculo aéreo en heridas de poda en campos de viveros de Sudáfrica y también se confirmó que la principal liberación de las esporas coincide con las principales épocas de poda durante primavera e invierno (Halleen et al., 2020). El ciclo completo de esta infección junto con otros microorganismos puede visualizarse en la figura 2.8.

También se han encontrado aislamientos de *P. minimum* en galerías de *Xylotrechus arvicola* Olivier en el interior de la planta de vid (García Benavides et al., 2013), y se identificó este patógeno a partir de artrópodos que portaban sus esporas en viñedos (Moyo et al., 2014).

El propio material vegetal proveniente de vivero puede ser una fuente de inóculo de gran importancia (Gramaje y Armengol, 2011). En varios estudios sobre planta de vid proveniente de plantas madre de vivero, varias especies de *Phaeoacremonium* fueron aisladas y entre ellas *P. minimum* (Fourie y Halleen, 2004; Aroca et al., 2010). Por tanto, son necesarias unas prácticas de manejo que reduzcan el riesgo de infección durante el proceso de propagación (Gramaje y Di Marco, 2015).

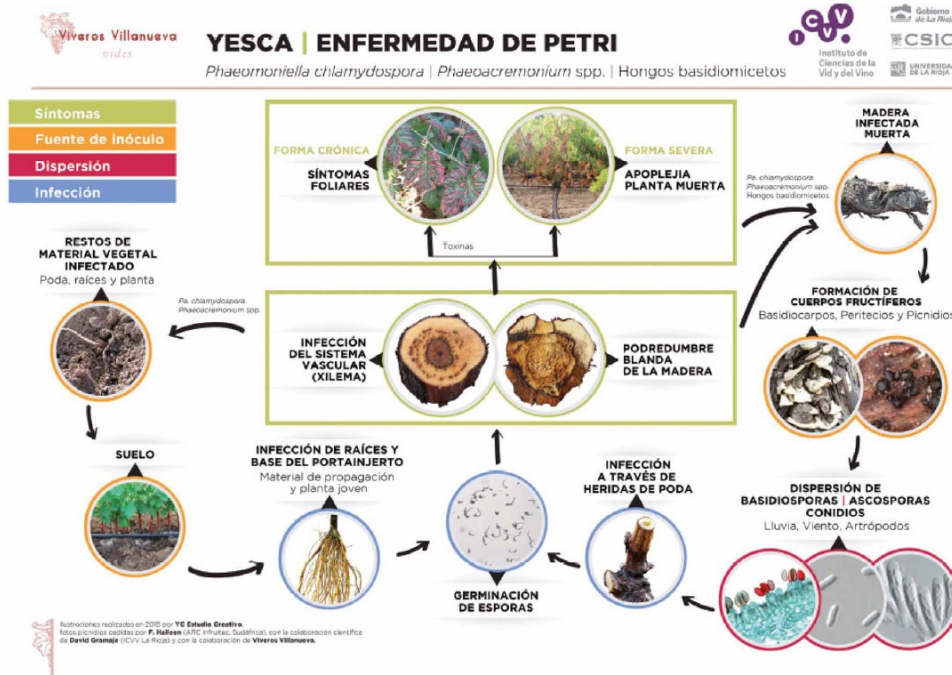


Figura 2. 8: Ciclo de la enfermedad de yesca y enfermedad de Petri en la planta de vid (Gramaje et al., 2020).

Recientemente también se ha descrito en China la presencia de este hongo como agente etiológico de EMV (Ye et al., 2020), y junto al hongo *Fomitiporia punctata* también se le ha asociado como agente causal de la yesca (Ye et al., 2021).

En conclusión, la presencia de este patógeno en otras especies vegetales y su gran rango de dispersión geográfica hace que exista gran diversidad de fuentes de inóculo viable, lo que provoca una gran dificultad en la descripción de la epidemiología de este género (Gramaje et al., 2015).

Fitotoxinas

Este hongo es capaz de producir una gran variedad de compuestos químicos con acción fitotóxica frente a las plantas de vid (Andolfi et al., 2011). En primer lugar, están los metabolitos lipofílicos de bajo peso molecular, los cuales se han podido aislar de cultivos líquidos de *P. minimum*. Destacan la escitalona y la isosclerona que pertenecen a la familia de los pentaquetidos. Estos compuestos tienen la capacidad de causar decoloraciones en las hojas, clorosis y punteaduras internerviales o necróticas (Evidente

et al., 2000). Incluso hasta 7 compuestos más derivados de la familia química de las naftalenonas pentaquétidas fueron identificados como compuestos fitotóxicos para la planta de vid a partir de este hongo (Abou-Mansour et al., 2004).

En segundo lugar, están los compuestos hidrofílicos de alto peso molecular, entre los que destacan los polisacáridos. El más relevante es el pululano, aislado de un cultivo líquido de *P. minimum* que provoca en la vid síntomas compatibles con los descritos en plantas con yesca (Sparapano et al., 2000). También se han descrito polipéptidos tóxicos, con una estructura química todavía desconocida, que han sido capaces de ser aislados de cultivos líquidos de *P. minimum* como factores de virulencia en las plantas de vid (Luini et al., 2010). Aunque ensayos con métodos inmunológicos para detección de estos compuestos en *P. minimum* y *P. chlamydospora* permiten concluir su relevancia como otra herramienta adicional (Fleurat-Lessard et al., 2010, 2014). Incluso estos polipéptidos pueden variar cualitativa y cuantitativamente dependiendo de la temperatura a la que se excreten, produciendo diferentes cambios en la fisiología de la planta de vid (Pontini et al., 2014).

Por otro lado, se ha estudiado el efecto conjunto de ambas familias químicas, metabolitos lipofílicos e hidrofílicos, y se ha evaluado la relación de la bioacumulación de escitalona, isosclerona y pululano (Fig. 2.9). Así como de los metabolitos de defensa producidos por la planta en respuesta a este ataque, concluyendo que la concentración por parte de la planta de compuestos fenólicos de defensa y por tanto su capacidad de defensa, depende en gran medida de la variedad de vid (Bruno y Sparapano, 2006).

Además *P. minimum* posee enzimas de actividad extracelular capaces de degradar polisacáridos como las hemicelulosas, celulosas y ligninas (Valtaud et al., 2009) a diferencia de *P. chlamydospora* que no mostró actividad enzimática en ninguna de ellas (Bruno y Sparapano, 2006).

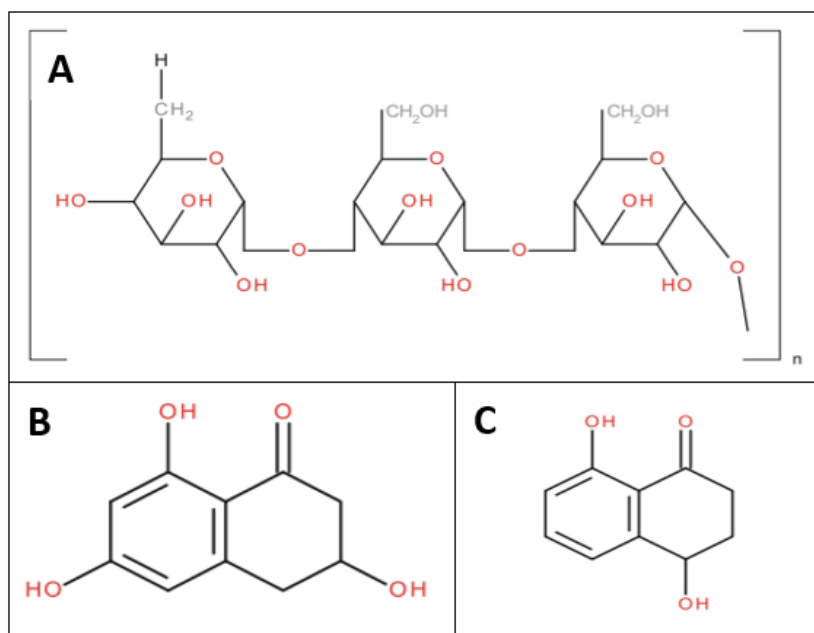


Figura 2. 9: -A. Pululano. -B Escitalona. -C Isosclerona (Fischer y Thines, 2017).

Aplicación de las ómicas en *Phaeoacremonium minimum*

La aplicación de las estrategias ómicas (genómica, proteómica, metabolómica, etc..) tienen un gran impacto en la agricultura (Van Emon, 2016). En el caso de *P. minimum* se han llevado a cabo diversos estudios que se citan a continuación.

En el campo de la genómica, se han secuenciado 2 genomas completos de dos aislados de *P. minimum* ambos de plantas de vid y que se encuentran a disposición de la comunidad científica para su análisis: el aislado *P. minimum* 1119 (Massonnet et al., 2018) y el aislado *P. minimum* UCR PA7 (Blanco-Ulate et al., 2013).

Un estudio de transcriptómica reveló que *P. minimum* es capaz de aumentar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y sólo algunos genes que codifican para óxido-reductasas se regularon positivamente, mientras que otros fueron regulados negativamente en plantas de vid (Fischer et al., 2016).

Otra investigación sobre genómica y transcriptómica de aislados de *P. minimum* puso de manifiesto la importancia de las variaciones estructurales en el genoma y su implicación en las rutas biosintéticas asociadas al metabolismo secundario (Massonnet et al., 2018). En relación a este estudio, otro análisis de meta-transcriptómica permitió identificar el

papel potencial de los factores de virulencia de *P. minimum* en relación a la planta de vid (Morales-Cruz et al., 2018).

El uso de la metabolómica en *V. vinifera* de la variedad chardonnay tras la inoculación de *P. minimum* y en plantas sometidas a estrés hídrico, evidenció la presencia de hasta 28 metabolitos en el flujo de savia. Los resultados muestran que la falta de agua en la planta favoreció la aparición de un mayor número de metabolitos y el incremento de estos compuestos pareció estar modulado por la acción de los hongos (Lima et al., 2017).

La microbiómica es otro campo de estudio en el que el género *Phaeoacremonium* fue identificado sobre heridas de poda en viñedos del norte de España (Galicia) y junto con el resto de patógenos causantes de las EMV tuvo una incidencia mayor en la época de poda tardía (febrero) (Martínez-Diz et al., 2020b). También en otro estudio sobre la distribución metataxonómica de los microorganismos en el suelo rizosférico, raíces y base del patrón, este género aparece en tejidos interiores de raíces de plantas asintomáticas como posibles fuentes de inóculos de futuras enfermedades (Martínez-Diz et al., 2019). La identificación a nivel de especie requeriría el uso de *shotgun metagenomic* pero su coste, la sobreabundancia de ADN en muestras de vid y el gran número de lecturas, lo convierten a día de hoy en un método muy costoso en poblaciones naturales en viñedos (Zarraonaindia et al., 2015; Belda et al., 2017).

2.3.3.- Control de *Phaeoacremonium minimum*

En relación a la planta de vid, recientes estudios para el control de este patógeno demuestran que el uso de compuestos de base cúprica son efectivos para la reducción de la presencia de *P. minimum* en portainjertos y variedades de vid (Battiston et al., 2021). El agua ácida electrolizada es otro procedimiento que fue capaz de controlar en condiciones *in vitro* el crecimiento del micelio y de la germinación de conidias de este hongo, disminuyendo también el nivel de infección tras tres años de experimento en vivero (Di Marco et al., 2019). El uso de tratamientos de agua caliente (HWT) permitió reducir la presencia de *P. minimum* de forma significativa (Gramaje et al., 2010a). Este

tratamiento se ha demostrado inocuo para la planta de vid, sin afectar a la composición del mosto, el rendimiento de la cosecha ni de la viabilidad de las plantas (Gramaje et al., 2014).

La combinación de flusilazol y carbendazima mostró control en el desarrollo de este patógeno (Serra et al., 2011). También esta combinación se mostró efectiva tras aplicarse antes del almacenamiento en conservación de frío durante el proceso viverístico (Gramaje et al., 2009b). Sin embargo, el uso de agentes químicos como la carbendazima han demostrado que *Phaeoacremonium minimum* tiene la capacidad de desarrollar resistencias a esta familia de los benzimidazoles (Martín y Martín, 2013). También se ha utilizado como método alternativo la endoterapia vegetal, que consiste en la inyección por el xilema de una sustancia fitosanitaria, en este caso glutaraldehído, un compuesto orgánico que fue capaz de reducir a más del 75% el reaslamiento de este patógeno (Del Frari et al., 2018).

El control biológico es también otra alternativa que puede ser utilizada y que está siendo promovida por la Unión Europea (Comisión Europea, 2019). Un ejemplo es el aislado *Epicoccum layense* E24 que fue capaz de controlar de forma eficiente *in vitro* a *P. minimum* y de reducir la incidencia de éste y otros patógenos de las EMV en el sistema radicular de la vid (Del Frari et al., 2019). También el uso de las actinobacterias *Streptomyces* sp. VV/R1 y *Streptomyces* sp. VV/R4 redujeron su crecimiento *in vitro* y en condiciones de campo redujeron su concentración en la parte radicular en planta joven (Álvarez-Pérez et al., 2017). La combinación de varios agentes de biocontrol pueden disminuir la presencia de varios patógenos entre ellos *P. minimum* en su sistema radicular (Martínez-Diz et al., 2020a). Sin embargo, el uso de agentes de biocontrol no lo ha terminado de controlar de forma efectiva en todas las condiciones de cultivo en viñedo (Berlanas et al., 2018). Y finalmente, el uso de *Trichoderma atroviride* SC1 se mostró efectivo en el sistema radicular para controlar *P. minimum* en vivero (Pertot et al., 2016). Todos estos ensayos con agentes de biocontrol han sido descritos en el sistema radicular pero sus efectos frente a *P. minimum* en la parte aérea no se han evaluado hasta la fecha.

Finalmente, los métodos descritos previamente deben formar parte de una estrategia integrada desde el vivero, en la que se combinen en primer lugar los métodos químicos,

físicos y biológicos, ya que la eficiencia en la reducción de la incidencia de los patógenos que causan enfermedades de vid es significativamente mayor (Gramaje et al., 2016), y en segundo lugar los métodos culturales y de manejo como es el tipo de poda, ambos de gran importancia para reducir los inóculos de patógenos de vid (Travadon et al., 2016; Henderson et al., 2021).

El control de este patógeno en otros cultivos como en kiwi, *Actinidia deliciosa* (A.Chev.) C.F. Liang & A.R. Ferguson, ha mostrado como método más eficaz la aplicación en suelo de la cepa comercial de *T. afroharizianum* T22 que es capaz de reducir significativamente la necrosis de las plantas y favorecer un mayor crecimiento del sistema radicular (Roberti et al., 2017).

Debido a su identificación clínica como agente de enfermedades patogénicas en humanos (Gramaje et al., 2015), se han descrito antifúngicos como el voriconazol, el posaconazol o la anfotericina B con acción frente a aislados de *P. minimum* y de otras especies de este género (Espinel-Ingroff et al., 2001; Badali et al., 2015).

2.4. CONTROL DE ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID Y AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO, ÚLTIMOS AVANCES.

Desde los años 90 hasta la actualidad, los investigadores de todo el mundo han evaluado una gran cantidad de materias activas y agentes de control biológico con el fin de controlar las EMV (Mondello et al., 2018). En lo que respecta a España, a julio de 2021, los productos autorizados para aplicar en el cultivo de la vid dentro del Registro de Productos Fitosanitarios son los siguientes:

- Para el control de la yesca:
 - *Trichoderma atroviride* (Cepa SC1).
 - *Trichoderma atroviride* (cepa I-1237).
- Para el control de la eutipiosis:
 - *Trichoderma atroviride* (Cepa I-1237).

- Para el control de enfermedades fúngicas de la madera:
 - o *Trichoderma asperellum* (cepa ICC012) + *Trichoderma gamsii* (Cepa ICC080).
- Para el control de *Black Dead Arm* (BDA):
 - o *Trichoderma atroviride* (Cepa I-1237).
- Heridas de poda:
 - o Piraclostrobin 0,5% + Boscalida 1%.
- Prevenir desecación de plantas:
 - o Dimenteno 96%.

Así mismo, se expone un listado de los productos biológicos que contienen *Trichoderma* junto con sus características (nombre comercial, composición, concentración de inoculación en unidades formadoras de colonias (CFU)/mL y modo de aplicación) y que son empleados para el control de las EMV:

Tabla 2. 3: Listado de *Trichoderma* spp. ensayados frente a EMV:

Nombre comercial	Composición	Concentración	Modo de aplicación	Referencia
BIOTRICO	<i>T. harzianum</i>	4,8 x 10 ⁴ CFU/mL con sucrosa al 0.2%	Líquido	(Kotze et al., 2011)
BLINDAR®	<i>T. asperellum</i> <i>icc12+</i> <i>T. gamsii</i> <i>icc80</i>	3x10 ⁶ CFU/mL ó 3X10 ⁵ CFU/mL	Líquido	Hoja de especificaciones técnicas.: https://isagro.es/blindar/
ECO77®, T77	<i>T. atroviride</i>	10 ⁶ CFU/mL	Líquido	(Halleen et al., 2010; Kotze et al., 2011) Hoja de especificaciones técnicas.: https://agrauxine.com/es/produit/esquive-wp/
I-1237 ESQUIVE® TRICHODERMA ATROVIRIDE	<i>T. atroviride</i>	10 ⁷ CFU/mL	Pasta semisólida	Hoja de especificaciones técnicas.: https://agrauxine.com/es/produit/esquive-wp/
I-1237 ESQUIVE® TRICHODERMA ATROVIRIDE	<i>T. atroviride</i>	2,66 x 10 ⁶ CFU/mL	Líquido	Hoja de especificaciones técnicas.: https://agrauxine.com/es/produit/esquive-wp/
TRICHODERMA ATROVIRIDE, ISOLATE UST1	<i>T. atroviride</i>	10 ⁸ CFU/mL	Líquido	(Mutawila et al., 2016a)

Tabla 2. 3: Listado de nombres comerciales de *Trichoderma* frente a enfermedades de madera de la vid (continuación):

Nombre comercial	Composición	Concentración	Modo de aplicación	Referencia
TRICHODERMA ATROVIRIDE SC1	<i>T. atroviride</i>	4x10 ⁷ CFU/mL	Líquido	(Pertot et al., 2016)
TRICHODERMA HARZIANUM AG1	<i>T. harzianum</i>	10 ⁹ CFU/mL	Líquido	(John et al., 2005, 2008)
TRICHODERMA +GLIOCLADIUM	T41,T77,T90,T29 5 y T169	10 ⁶ CFU/mL	Líquido	(Fourie y Halleen, 2004)
T. LONGIBRACHIATUM STRAIN 6	<i>T. longibrachiatum</i>	1,8x10 ⁶ CFU/mL	Líquido	(Di Marco et al., 2004)
TRICHODEX® T. HARZIANUM T39	<i>T. harzianum</i>	4X10 ⁶ CFU/mL	Líquido	(Di Marco et al., 2004)
TRICHOFLOW-T™	<i>T. harzianum</i>	2x 10 ⁸ CFU/mL	Líquido	(Fourie y Halleen, 2004)
USPP-T1	<i>T. atroviride</i>	10 ⁶ CFU/mL	Líquido	(Kotze et al., 2011; Mutawila et al., 2011a)
USPP-T2	<i>T. atroviride</i>	10 ⁶ CFU/mL	Líquido	(Kotze et al., 2011; Mutawila et al., 2011a)
USPP-T1+T2, MIX DE DOS CEPAS DE TRICHODERMA	<i>T. atroviride</i>	10 ⁶ CFU/mL	Líquido	(Mutawila et al., 2011a)
VINTEC TRICHODERMA ATROVIRIDE SC1	<i>T. atroviride</i>	2x10 ⁷ CFU/mL	Líquido	Hoja de especificaciones técnicas: https://belchim.es/productos/vintec/
VINEVAX™	Seis cepas de <i>T. harzianum</i> y una de <i>T. atroviride</i>	5x10 ⁶ CFU/mL	Líquido	(Kotze et al., 2011)
VINEVAX™	<i>T. atroviride</i> . Contiene 5 cepas.	5x10 ⁶ CFU/mL	Líquido	Hoja de especificaciones técnicas: http://agrimm.co.nz/vinevax-pruning-wound-dressing/
VINEVAX™	<i>T. atroviride</i> . Contiene 5 cepas.	5x10 ⁷ CFU/mL	Pasta semisólida	Hoja de especificaciones técnicas: http://agrimm.co.nz/vinevax-pruning-wound-dressing/

Elaboración propia: *Trichoderma* como sustancias activas de productos biológicos hasta julio de 2021.

Finalmente, se exponen los agentes de biocontrol del género *Trichoderma* que se encuentran autorizados en el Registro de Productos Fitosanitarios a julio de 2021:

- *Trichoderma asperellum* (cepa ICC012).
- *Trichoderma asperellum* (cepa T25).

- *Trichoderma asperellum* (cepa T34).
- *Trichoderma asperellum* (cepa TV-1).
- *Trichoderma atroviride* (cepa T11).
- *Trichoderma atroviride* cepa SC1.
- *Trichoderma atroviride* (cepa I-1237).
- *Trichoderma gamsii* (cepa ICC080).
- *Trichoderma harzianum* Rifai (Cepa T-22).

2.5. CONTROL BIOLÓGICO

La alternativa que mejor se adapta a las futuras normativas europeas de producción sostenible, ecológica y que respeta la salud del consumidor y del productor es el control biológico (Comisión Europea, 2019, 2020a, 2020b). Se puede definir como control biológico a la explotación de agentes vivos para combatir organismos perjudiciales (patógenos, plagas o malas hierbas) con diversos propósitos y así causar beneficios al ser humano (Stenberg et al., 2021). Adicionalmente, el empleo de estos organismos biológicos como biopesticidas y como bioestimulantes proyecta para el horizonte 2022-2025 un gran beneficio económico (Sessitsch et al., 2018).

Para la aplicación de estos agentes de control biológico (ACB), se debe tener en consideración el concepto *One health* (una única salud). Este concepto engloba la salud humana, la salud animal y la salud de los ecosistemas (sanidad vegetal, biodiversidad, presencia de pesticidas etc.), los cuales coexisten y están interrelacionados. Cualquier desequilibrio o cambio en alguno de estos pilares afectará negativamente al resto (American Veterinary Medical Association, 2008).

En el caso de los ecosistemas, actualmente hay un importante reto como es la influencia del cambio climático, motivado por un aumento de las temperaturas y eventos climáticos extremos (Masson-Delmonte et al., 2021). Los efectos en la viticultura se harán notar debido a que un aumento en la temperatura adelantará la fenología del cultivo, los periodos más cálidos de lo habitual durante el verano afectarán a la composición de los

racimos, el incremento del estrés hídrico afectará a los rendimientos y los eventos climáticos extremos serán más frecuentes (olas de calor, heladas, inundaciones) etc...(van Leeuwen y Darriet, 2016). Por tanto, la viticultura debe adaptarse a este cambio mediante el uso de herramientas moleculares (Gomès et al., 2021), evaluando los posibles impactos (Fraga et al., 2012), prediciendo los distintos escenarios que pueden suceder (Santillán et al., 2019) y escogiendo las mejores zonas para el cultivo (Malheiro et al., 2010). Un ejemplo de ello es la optimización del manejo agronómico y enológico de las variedades de vid en la DO León conforme a las variables bioclimáticas y de suelo, como demuestra una reciente investigación en la que se establecen las mejores zonas para el cultivo de las diferentes variedades autorizadas por la Denominación de Origen (del Río et al., 2021). Otro ejemplo es la proyección de las zonas en Europa que son más adecuadas para el cultivo de la vid y los efectos en las zonas actuales de producción según varios índices bioclimáticos (Cardell et al., 2019).

Por tanto, la adecuación a las condiciones agronómicas y climáticas son de una importancia capital para que un ACB tenga éxito en su actividad. **La hipótesis inicial de esta tesis** parte de la presencia de ACB en las propias plantas que se han adaptado a las condiciones de manejo, agronómicas, de suelo y de clima (Lyu et al., 2021). El proceso consiste en el aislamiento de estas especies que naturalmente se han adaptado (Laine, 2006), seleccionarlas por su acción frente a los patógenos diana (Vasseur-Coronado et al., 2021) y volver a inocularlas nuevamente en los nichos ecológicos donde es necesario defender a la planta, siendo este mecanismo uno de los principales creadores de diversidad biológica en el planeta tierra (Rausher, 2001).

Un ejemplo de la coevolución y adaptación con éxito es el caso de la filoxera, en la que las plantas americanas de *Vitis* spp. adquirieron mecanismos de resistencia al ataque de hojas y raíces por parte de este insecto (Whaspere y Helm, 1987). Otro ejemplo en la vid es la adquisición de resistencia al mildiu mediante el cruce de variedades resistentes (Bove et al., 2019). Tradicionalmente se ha utilizado a los híbridos, cruzamientos entre especies del género *Vitis*, que de forma natural habían adquirido un mayor o menor grado de resistencia frente a oídio, mildiu y podredumbre gris con el objetivo de conferir resistencias frente a estas enfermedades (Alleweldt, 1980). La presente tesis aboga por el

uso de microorganismos como elemento principal de la defensa de la planta frente al patógeno *P. minimum*. En este caso, uno de los más estudiados frente a las EMV (Mondello et al., 2018) y que mayores éxitos de comercialización ha tenido (Woo et al., 2014) es *Trichoderma*.

2.6. *Trichoderma* spp.

2.6.1.- Descripción, sistemática y morfología.

Dominio: Fungi
Phylum: Ascomycota
Clase: Sordariomycetes
Orden: Hypocreales
Familia: Hypocreaceae
Género: <i>Trichoderma</i>

Los hongos del género *Trichoderma* Pers. 1794 (syn. *Hypocrea*, Hypocreales) (Fig 2.10) son hongos micotróficos, fitosaprotrofos y ubicuos (Cai y Druzhinina, 2021). Este género de hongos fue descrito por primera vez por el micólogo Christiaan Hendrik Persoon a finales del siglo XVIII (Persoon,

Figura 2. 10: Clasificación taxonómica del género *Trichoderma* según EPPO.

1794). La mayoría de las investigaciones desde su descubrimiento fueron basadas en su teleomorfo (*Hypocrea*) como se ejemplifica en la revisión hecha por Jaklitsch y Voglmayr, 2013. Sin embargo, esta nomenclatura ya se encuentra en desuso tras el movimiento micológico "Un hongo-Un nombre"/"One fungus-One name" (Taylor, 2011). Conforme al acuerdo del congreso internacional de botánica de julio de 2011, se acuerda, según el Código Botánico de Nomenclatura (ICBN, artículo 59) (McNeill et al., 2006), considerar *Trichoderma* como nombre del género y priorizarlo frente a *Hypocrea*, que se lo considera como una sinonimia del mismo (Bissett et al., 2015). Anterior al 1 de enero de 2013 cuando entra en vigor este acuerdo, los aislados con estado sexual (teleomórfico) se denominaban *Hypocrea* mientras que el estado asexual (anamórfico o mitospórico) era asignado al género *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2011). A mediados del siglo XX, sólo unas pocas especies son descritas como pertenecientes a este género (Rifai, 1969). Sin embargo, en las últimas décadas, el gran número de identificaciones convierten a

Trichoderma en un género de gran riqueza en especies (Kubicek et al., 2008; Bissett et al., 2015; Jaklitsch y Voglmayr, 2015). Debido a la gran complejidad que implica la identificación de las especies de este género como es el caso de *T. harzianum* (Druzhinina et al., 2010) entre otros, se ha propuesto un protocolo de identificación molecular basado en el análisis de secuencias de las regiones ITS (“*Internal Transcribed Spacers*”), el gen que codifica para el factor de elongación de la transcripción 1 α (*tef1 α*) y el gen de la segunda subunidad mayor de la RNA polimerasa II (RPB2) (Cai y Druzhinina, 2021). Este protocolo para la identificación molecular de las especies de *Trichoderma* se puede encontrar en <https://trichoderma.info/2021/04/26/molecular-identification-protocol-for-trichoderma/>, perteneciente a la Comisión Internacional en taxonomía de *Trichoderma* (ICTT). Este sistema de identificación online multilocus fue verificado por Dou et al., 2020. Por lo que, tras un exhaustivo análisis de las bases de datos actuales, se han descrito correctamente a julio de 2020 hasta 375 especies pertenecientes a este género (Cai y Druzhinina, 2021). La investigación más reciente basada en estudios genómicos clasifica a las principales especies de este género en tres grandes linajes evolutivos, Sección *Longibrachiatum*, Sección *Trichoderma* y el Clado *Harzianum/Virens* (Kubicek et al., 2019).

Morfológicamente, los conidióforos son muy ramificados (Fig 2.11-A), con unas hifas principales que producen laterales emparejadas o no según la especie (Barnett y Hunter, 1998). Todas las hifas surgen con ángulo de 90° respecto al eje principal, presentando el típico aspecto piramidal con hifas emparejadas (Fig. 2.11 B) (Samuels 1996). Las conidias tienen forma elipsoidal con una pared lisa y con un solo núcleo, con un tamaño entre 3-5 x 2-4 micrómetros con una relación longitud-anchura mayor a 1,3 (Samuels, 1996).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* son capaces de colonizar sustratos muy diversos y producir gran cantidad de conidias, generalmente verdes o hialinas (Fig 2.11-C) (Kirk et al., 2001). *Trichoderma* tiene un rápido crecimiento entre 25 y 30°C, reduciéndolo a partir de 35°C. Cuando crece en medio patata-dextrosa-agar (PDA) presenta tonalidades blancas que, tras 3 o 10 días, según especies, tornan a un amarillo o verde por la formación de los conidios (Samuels, 1996).

En condiciones adversas, *Trichoderma* es capaz de producir clamidosporas con gran importancia en la supervivencia del hongo (Papavizas, 1985).

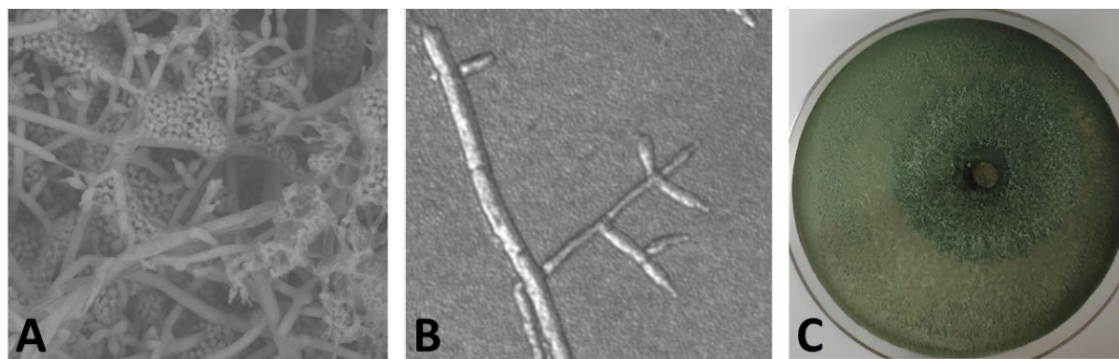


Figura 2. 11: -A. Imagen de *Trichoderma* sp. en microscopía electrónica de barrido. -B. Imagen de *Trichoderma* sp. en microscopía confocal. -C. Colonia de *Trichoderma* sp. esporulada en placa de PDA tras 7 días.

2.6.2.- Nicho ecológico.

Los hongos del género *Trichoderma* se encuentran entre los más comúnmente aislados como hongos saprófitos (Brotman et al., 2010). Generalmente, se encuentran en el suelo o creciendo sobre madera, corteza o un gran número de sustratos (Jaklitsch, 2009, 2011). Estas características lo convierten en un hongo oportunista y con gran potencial de colonización de distintos ambientes ecológicos (Druzhinina et al., 2011).

Estos hongos están descritos, *a priori*, como descomponedores de materia orgánica pero un análisis de los genomas de *Trichoderma reesei*, *T. atroviride* y *T. virens* demuestra que el micoparasitismo es el estilo de vida ancestral de *Trichoderma* pasando posteriormente a la colonización de la rizosfera (Kubicek et al., 2011). Un estudio posterior sobre las 12 especies más comunes de este género ofrece los datos de los principales genes adquiridos, así como los genes que están presentes en todas las especies (*Trichoderma core genome*) y su evolución en el tiempo desde el micoparasitismo hasta llegar a ser un hongo más generalista (Kubicek et al., 2019).

Trichoderma es capaz de colonizar las raíces y penetrar dentro de los espacios celulares de la planta sin alcanzar los vasos de ésta (Samolski et al., 2012; Ruano-Rosa et al., 2016). Incluso, se ha descrito como colonizador del nicho de la raíz como endófito sin causar

daños aparentes (Bae et al., 2009). El hongo se beneficia de los exudados de la planta (Woo y Lorito, 2007) y en ciertas condiciones de estrés la planta puede atraer a *Trichoderma* por medio de exudados (Marra et al., 2018). También se ha descrito que la producción de ácido salicílico protege de la entrada de este hongo (Alonso-Ramírez et al., 2014).

En el campo de la agricultura es importante el estudio sobre la tolerancia a las materias activas de pesticidas ya que pueden afectar a la actividad de biocontrol de las distintas especies de *Trichoderma* en los agroecosistemas (Wu et al., 2018; Ladi et al., 2020). Un ejemplo de ello es la caracterización de aislados de *Trichoderma* con capacidad de resistencia frente al antimicótico benzimidazol-2-yl-carbamato (MBC) (Goldman et al., 1993). Esto ha llevado a la obtención de aislados de *Trichoderma* resistentes a los benzimidazoles, que son fungicidas de gran importancia en agricultura, con el fin de ser utilizados en un manejo de control integrado en viñedo (Mutawila et al., 2015a). Otro ejemplo es su capacidad para actuar como potenciales agentes descontaminantes, destacando la cepa autóctona *Trichoderma hamatum* FBL587 que junto a *Rhizopus arrhizus* FBL578 son capaces de degradar el DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) en suelos agrícolas contaminados (Russo et al., 2019). Incluso se ha descrito al aislado de *T. harzianum* (T103), que es capaz de biocontrolar los principales patógenos de raíces (*Sclerotium rolfii* Sacc., *Fusarium oxysporum* Schldl. y *Macrophoma phaseolina* (Tassi) Goidanich) bajo condiciones de estrés, no solo causadas por la presencia de residuos de pesticidas, sino también por contaminación de metales pesados en el suelo (Mishra et al., 2016).

2.6.3.- Actividad de biocontrol de *Trichoderma* spp.

Los mecanismos de acción que *Trichoderma* puede ser capaz de desplegar en el agroecosistema pueden ser clasificados según los elementos que estén implicados: interacción *Trichoderma*-patógeno, interacción *Trichoderma*-Planta, interacción triple (*Trichoderma*-planta-patógeno) (Vinale et al., 2008). Conocer este tipo de relaciones es de vital importancia para entender cómo *Trichoderma* interactúa con estos factores y así

implementar estrategias basadas en este agente de biocontrol que mejoren los rendimientos del cultivo y su protección (Alfiky y Weisskopf, 2021).

2.6.3.1 Interacción *Trichoderma*-patógeno

Trichoderma es un oportunista secundario de rápido crecimiento, capaz de producir un gran número de enzimas degradadoras de la pared celular (CWDEs) y sustancias antibióticas (Vinale et al., 2008). Sus principales mecanismos de biocontrol en la confrontación directa frente a patógenos son el micoparasitismo (Harman y Kubicek, 1998) y la antibiosis (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998). Además, numerosos aislados de este género, son capaces de competir en la rizosfera debido a la capacidad de degradar gran cantidad de compuestos excretados por las raíces (Harman et al., 2004). Por lo tanto, se describen a continuación los tres principales mecanismos de acción frente a los patógenos: micoparasitismo y enzimas líticas, antibiosis y metabolitos secundarios y competición frente a patógenos y resto de la comunidad microbiana.

Micoparasitismo y enzimas líticas

En el micoparasitismo un hongo parásito se beneficia de su huésped con el fin de obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo. Cuando este mecanismo se da sobre células vivas causando un daño pequeño o no aparente se denomina balanceado o biotrófico. Por el contrario, algunos parásitos pueden causar daños severos hasta matar las células y se denominan destructivos o necrotróficos (Barnett, 1963).

En el caso de *Trichoderma*, este proceso es un complejo de eventos sucesivos que consisten en el reconocimiento del hospedador, ataque, penetración y muerte. Durante este proceso, *Trichoderma* secreta enzimas degradadoras de la pared celular (CDWEs) que hidrolizan la pared celular del patógeno (Woo et al., 2006). Inicialmente, *Trichoderma* localiza al patógeno por quimiotropismo (Lu et al., 2004). Esta detección a distancia se debe a la producción de forma constitutiva de CWDEs, como por ejemplo exoquitinasas (Woo et al., 2004), así como la implicación de genes que codifican para los

transportadores ABC, como por ejemplo el gen *Tabbc2* cuya expresión se reguló positivamente en presencia de metabolitos, incluidas micotoxinas, producidas por patógenos (Ruocco et al., 2009). Una vez que *Trichoderma* establece contacto con el huésped, las hifas se adhieren o se enroscan alrededor de las de su presa pudiendo formar estructuras tipo apresorio (Murmanis et al., 1988; Harman et al., 2004), y, en ese momento, se producen CWDEs y sustancias antibióticas que causarían poros en la pared celular del patógeno (Schirmbock et al., 1994; Mukherjee et al., 2011). Las principales CWDEs son las quitinasas, glucanasas y proteasas. Dentro de ellas, las quitinasas destacan como las mejor estudiadas en el caso de *Trichoderma*, ya que están implicadas en el mantenimiento de la propia pared fúngica y en la degradación de la pared celular de otras especies fúngicas (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012). Un ejemplo es el gen CHIT 42 que codifica la endoquitinasa *ech42*, cuya disrupción provoca una disminución en la actividad de biocontrol por parte de *Trichoderma harzianum* P1 (Woo et al., 1999). También se han purificado y caracterizado un gran número de glucanasas como las correspondientes al grupo de las β -1,4-glucanasas o celulasas, β -1,3-glucanasas y β -1,6-glucanasas (Lorito et al., 1993, 1994). Uno de los genes que están implicados en la síntesis de estas glucanasas es el *nag1* (Zeilinger et al., 2003). En el caso de las proteasas, PRB1 fue la primera descrita en *T. harzianum* (Geremia et al., 1993).

Finalmente, *Trichoderma* digiere el contenido celular del huésped hasta la desintegración de las hifas (Rousseau et al., 1996).

Metabolitos secundarios y antibiosis

Trichoderma es capaz de producir un gran número de metabolitos secundarios con efectos beneficiosos sobre las plantas (Vinale y Sivasithamparam, 2020) y con actividad de biocontrol frente a patógenos (Keswani et al., 2019).

Se define como metabolito secundario a compuestos de bajo peso molecular que no son utilizados para el desarrollo ni crecimiento del hongo y le permiten una ventaja adaptativa (Gutiérrez, 2017). Para su caracterización en los hongos filamentosos a los que pertenece *Trichoderma*, se los puede clasificar en base a cuatro clases de compuestos

precursores: péptidos no ribosomales, poliquétidos, terpenos y derivados de dimetilaliltriptófano (DMATs) (Hoffmeister y Keller, 2007). Dentro de estos metabolitos secundarios, hay algunos que tiene actividad antibiótica y ,en el caso de *Trichoderma*, destacan los peptaiboles de la familia de los péptidos no ribosomales, los poliquétidos y los terpenos (Cardoza et al., 2005).

Los péptidos no ribosomales se caracterizan porque su síntesis es llevada a cabo por enzimas péptido sintetetas no ribosomales (NRPS) y dentro de estos compuestos que *Trichoderma* es capaz de producir, destacan los peptaiboles. Éstos, son capaces de mediar en la interacción con la planta y tener actividad antifúngica (Gutiérrez, 2017). También se ha demostrado que los peptaiboles actúan de manera conjunta a los CWDEs, inhibiendo el crecimiento de los hongos patógenos (Hermosa et al., 2014).

Los poliquétidos son otro complejo grupo con diversas funciones biológicas, destacando aquellos con actividad antibiótica. En la síntesis de estos compuestos participan una o más poliquétido-sintasas (PKs). Dos de los principales compuestos poliquetídicos descritos en *Trichoderma* son las aspinolidas (Asp) y las pironas (Gutiérrez, 2017). En el caso de las aspinolidas se han descrito hasta 6 tipos, y se ha demostrado que una de ellas, la AspC, tiene actividad antifúngica y fitotóxica (Malmierca et al., 2015). En lo que respecta a las pironas, la 6-pentil-2H-piran-2-ona (6PP) fue el primer compuesto volátil aislado de *Trichoderma* (Clyadon 1987). Este compuesto produce una fuerte inhibición frente a hongos y oomicetos como *Plasmopara viticola* (Lazazzara et al., 2021) pero su efecto es transitorio y permanece muy poco en el ambiente (Hanson, 2005). También se ha demostrado que aislados de *Trichoderma* son capaces de inhibir el crecimiento de hongos implicados en las EMV mediante el 6PP (Mutawila et al., 2015b).

Los terpenos son un gran grupo de metabolitos secundarios que destacan por su aplicación farmacológica (Gutiérrez, 2017). En el caso de *Trichoderma* se han descrito varios grupos de terpenos con actividad antifúngica como las ergokoninas (Vicente et al., 2001) y las viridinas (Howell et al., 1993). En la síntesis de estos compuestos se utilizan como precursores compuestos intermediarios de la síntesis de importantes moléculas estructurales como sería el caso del ergosterol, compuesto muy importante para el mantenimiento de la integridad estructural de la membrana plasmática fúngica

(Cardoza et al., 2006). Dentro de estos compuestos, se encuentra también un grupo de sesquiterpenos denominados trichotecenos con propiedades tóxicas para plantas y animales (Proctor et al., 2020). En la actualidad se ha descrito la producción de estos compuestos en un número reducido de especies de *Trichoderma*, como es el caso por ejemplo de *T. arundinaceum* y *T. brevicompactum* (Nielsen et al., 2005; Malmierca et al., 2016).

En el caso de los derivados de dimetilalilriptófano (DMATs) principalmente son alcaloides producidos por la contaminación de las plantas herbáceas por *Claviceps purpurea* aunque también destacan los derivados del ácido lisérgico con actividad de biocontrol (Gutiérrez, 2017). Hasta la fecha, no se han descrito metabolitos de esta familia química producidos por *Trichoderma*.

Competición frente a patógenos y resto de la comunidad microbiana

La competición por el carbono, el nitrógeno u otros factores de crecimiento junto con la competencia por el espacio o sitios específicos de infección pueden ser utilizados por los BCA frente a los patógenos (Vinale et al., 2008). Tradicionalmente ha sido complicado demostrar hasta qué punto *Trichoderma* es capaz de ejercer su acción por la capacidad de competición o por micoparasitismo y antibiosis (Harman, 2006).

Aun así, *Trichoderma* ha sido descrito como un hongo capaz de movilizar nutrientes de forma mucho más eficaz que sus competidores (Benítez et al., 2004). La movilización de hierro por parte de *T. asperellum* puede ayudar a combatir enfermedades en tomate (Segarra et al., 2010), y recientemente se ha demostrado que aislados de *Trichoderma* son capaces de competir por los nutrientes frente a los principales patógenos de las EMV, mostrando reducciones significativas en su crecimiento (Wallis, 2021).

En los últimos años, esta interacción ha tomado una gran relevancia debido a las técnicas del análisis de la microbiota del suelo y que permite, en el caso del viñedo, hacer una aproximación más exacta del concepto *terroir* en los viñedos (Belda et al., 2017). Los análisis de la comunidad microbiana (Zarraonaindia et al., 2015) podrían permitir

evaluar cómo influencia la presencia de *Trichoderma* al resto de microorganismos. Un ejemplo de ello es la influencia de *T. atroviride* SC1 en suelos agrícolas sobre la comunidad microbiana (Chammem et al., 2021).

2.6.3.2 Interacción *Trichoderma*-planta.

Algunas especies de *Trichoderma* son capaces de colonizar la superficie de las raíces produciendo cambios significativos en su metabolismo (Harman et al., 2004) y estas relaciones se pueden clasificar en:

Colonización de la planta

Existe una amplia bibliografía sobre la colonización en las raíces por parte de *Trichoderma* y el efecto positivo que produce sobre la planta: activación de genes en la respuesta defensiva de la planta, promoción del crecimiento, disponibilidad de nutrientes (Yedidia et al., 2003; Hanson y Howell, 2004; Harman et al., 2004). En el caso de la vid, aislados de *Trichoderma* han provocado un mayor número de raíces secundarias y mayor peso de su sistema radicular al ser aplicados frente al control de *Phaeoconiella chamydospora* y *Phaeoacremonium minimum* (Di Marco y Osti, 2007). Recientemente, se ha demostrado que aislados de *Trichoderma* han sido capaces de colonizar con éxito el sistema radicular de la planta y generar una activación en los genes de defensa de la planta (Stempien et al., 2020).

Sin embargo, *Trichoderma* también es capaz de colonizar heridas de poda de cultivos leñosos (Schubert et al., 2008), especialmente se ha demostrado su éxito sobre la planta de vid (John et al., 2004, 2005, 2008; Mutawila et al., 2011b). Se ha podido optimizar la mejor época de aplicación de *Trichoderma* para la protección frente a heridas de poda que puedan ser la entrada de hongos causantes de las EMV (Mutawila et al., 2016a). Se ha descrito un comportamiento diferente conforme al tipo de cultivar al que se quiera aplicar (Mutawila et al., 2011a). No obstante, su efecto sobre la planta y los mecanismos

que despliega *Trichoderma* para el control de los patógenos aún no se han descrito en heridas de poda.

Promoción del crecimiento de la planta

Trichoderma es capaz de incrementar la productividad de los cultivos mediante la promoción del crecimiento de la planta y el desarrollo de raíces laterales (Harman et al., 2004; Harman, 2006). Aunque no todas las especies de *Trichoderma* son capaces de estimular el desarrollo de las plantas (Hermosa et al., 2012). En el caso de la vid, especies de *Trichoderma* no tuvieron efecto sobre la biomasa radicular (Berlanas et al., 2018) e incluso llegaron a reducir significativamente su peso con respecto al control (van Jaarsveld et al., 2021).

Ensayos en campo demuestran que cepas de *Trichoderma* (Ej. *T. harzianum* T22 y *T. atroviride* P1) incrementan el rendimiento de tomate, lechuga y pimiento en condiciones de campo (Vinale et al., 2004). Un compuesto sideróforo, quelante de hierro, denominado ácido harziánico producido por *T. harzianum* M10 (Vinale et al., 2009) es capaz de promover el crecimiento de las plantas pero también incrementar la germinación de semillas, así como tener actividad antifúngica (Sivasithamparam et al., 2013; Vinale et al., 2014). Algunas especies de *Trichoderma*, como *T. atroviride* y *T. virens* han demostrado capacidad de producción de ácido indol-acético (IAA) provocando la regulación de esta hormona en la rizosfera de la planta, pudiendo tener efectos beneficiosos o negativos en el crecimiento según la concentración en la que se encuentre (Contreras-Cornejo et al., 2009). *Trichoderma* también produce ácidos orgánicos que disminuyen el pH del suelo y permiten la solubilización de fosfatos, micronutrientes y en especial hierro, manganeso y magnesio, lo que favorece el metabolismo de la planta (Benítez et al., 2004).

Inducción de la respuesta defensiva de la planta

Trichoderma es un importante colonizador de la raíz que juega un rol clave en el comportamiento de la planta con el ambiente ya que, además de los mecanismos anteriormente descritos, puede inducir respuestas inmunes más rápidas y fuertes mediante el mecanismo conocido como *priming* (Morán-Diez et al., 2021).

En el caso de *Trichoderma*, esta protección sobre la planta se puede identificar mediante 4 formas de protección: 1) la protección sólo dura unas horas, 2) la señalización celular aumenta la respuesta sistémica de la planta y puede durar varios días y finalmente termina decayendo, 3) *priming* de larga duración y 4) herencia a las generaciones sucesivas. Las dos últimas formas de protección pueden durar desde dos semanas hasta las siguientes generaciones (Morán-Diez et al., 2021).

En el cultivo de la vid, el uso de *Trichoderma atroviride* STE-U 6514 con demostrada capacidad para la protección de heridas de poda (Kotze et al., 2011), puede, al menos parcialmente, inducir mecanismos de resistencia en la planta de vid tras 48 horas (Mutawila et al., 2016b). También se ha descrito una respuesta de inducción de genes de defensa tras 21 días de la inoculación de *Trichoderma* pero fuertemente dependiente del tipo de portainjerto y del tipo de aislado (Stempien et al., 2020).

Influencia del suelo y el ambiente en la interacción *Trichoderma*-planta

Los factores abióticos pueden ser otro elemento clave para una agricultura sostenible (Santoyo et al., 2017) y que influyen de forma decisiva en el crecimiento exitoso por parte de *Trichoderma* (Kredics et al., 2003). Se han descrito como factores con mayor relevancia en los microorganismos del suelo, el pH, la calidad y cantidad del carbono orgánico, el oxígeno en el suelo y su estado redox, la disponibilidad de humedad del suelo y nutrientes del suelo (Fierer, 2017). El crecimiento de *Trichoderma* también puede verse favorecido por valores de pH más bajos, cercanos al ácido y por debajo de pH 7 (Longa et al., 2008). En relación a los nutrientes, la aplicación de abonos nitrogenados en cobertera durante el ciclo de cultivo del trigo, favoreció el crecimiento del aislado *T. harzianum* T34 e influyó en la composición de la comunidad microbiana (Illescas et al.,

2020). Además de los nutrientes, el nivel de materia orgánica o conductividad pueden tener una influencia importante en la concentración en suelo de *Trichoderma* dependiendo del aislado que se inocule (Mayo-Prieto et al., 2021). Adicionalmente, el uso de abonos orgánicos en combinación con *Trichoderma* puede potenciar su acción de biocontrol (Asghar y Kataoka, 2021). En viñedos, el estudio de la microbiómica puede ayudar a relacionar también los factores abióticos que más influencia tienen en las comunidades microbianas del suelo como el pH y la relación carbono : nitrógeno y en el caso de las comunidades de las hojas y de las bayas tiene una mayor influencia el carbono del suelo (Zarraonaindia et al., 2015). Así mismo, no se han descrito los factores agroecológicos que pueden influir en las poblaciones de *Trichoderma* por lo que su estudio sería interesante con el fin de poder favorecer sus poblaciones.

2.6.3.3 Interacción triple (*Trichoderma*-planta-patógeno)

Esta interacción es la menos estudiada en comparación con las anteriores evaluaciones dos a dos debido a la complejidad de dicho estudio incluso en condiciones *in vitro*, aunque es la que mejor simula las condiciones de interacción natural (Vinale et al., 2008). Algunos ejemplos pueden ser encontrados en los que se evalúa esta interacción.

Mediante el uso de la proteómica, se estudió la interacción entre *Trichoderma*, la planta de alubia *Phaseolus vulgaris* L. y el patógeno *Botrytis cinerea*. Con este estudio se identificaron un gran número de proteínas relacionadas con los procesos de defensa de la planta, factores de virulencia del patógeno y de inducción de resistencias por parte de *Trichoderma* (Marra et al., 2006). También se puede evaluar la producción de fitohormonas con este tipo de interacciones. En otro estudio, la producción de ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno y ácido abscísico por parte de la planta de melón, *Cucumis melo* L., fue evaluado en presencia de agentes de biocontrol como *Trichoderma* y el hongo micorrízico arbuscular *Rhizoglyphus irregulare* (Błaszk., Wubet, Renker & Buscot) Sieverd., G.A. Silva & Oehl (Sieverding et al., 2014) (anteriormente *Glomus intraradices* N.C. Schenck & G.S. Sm.) y del patógeno *F. oxysporum*. Aunque se encontraron efectos sinérgicos en la reducción de la enfermedad no se observó este mismo efecto en la

modulación de la alteración hormonal por parte del patógeno (Martínez-Medina et al., 2010). Finalmente, el uso de mutantes de *T. atroviride* con capacidad para producir la GFP (*Green fluorescent protein*), mediante la expresión del gen *gfp* bajo el control de promotores de genes codificantes para CWDEs, permitió monitorizar el nivel de la expresión de estos genes *in vivo* durante el proceso de colonización de *Trichoderma* en la planta (pepino, *Cucumis sativus* L.) y frente a los patógenos (*Rhizoctonia solani* J.G. Kühn y *Pythium ultimum* Trow), así como evaluar su localización en la planta (Lu et al., 2004).

El estudio de este tipo de interacción es la más interesante ya que puede proporcionar datos relevantes sobre la realidad en los cultivos. Por lo tanto, realizar un estudio sobre esta interacción en la presente tesis será de mayor aplicabilidad.

Finalmente, cabe reseñar que algunas especies de *Trichoderma* pueden tener efectos perjudiciales. *T. aggressivum* ha sido descrito como agente patógeno del cultivo de champiñones (Hatvani et al., 2007). También, aislados de la especie *T. longibrachiatum* han sido descritos como una especie oportunista capaz de causar enfermedad en personas inmunodeprimidas (Sandoval-Denis et al., 2014). Así mismo *T. longibrachiatum* fue descrito como uno de los principales hongos filamentosos causantes del *Cork-tain* en los corchos de las botellas de vino, por su capacidad de transformar compuestos precursores de los clorofenoles (residuos de agroquímicos) mediante la clorofenol-O-metil-transferasa en los compuestos 2,4,6-tricoloroanisoles responsables de este defecto en los vinos (Coque et al., 2003). Todas estas características positivas y negativas descritas en la presente memoria son resumidas en la Figura 2.12.

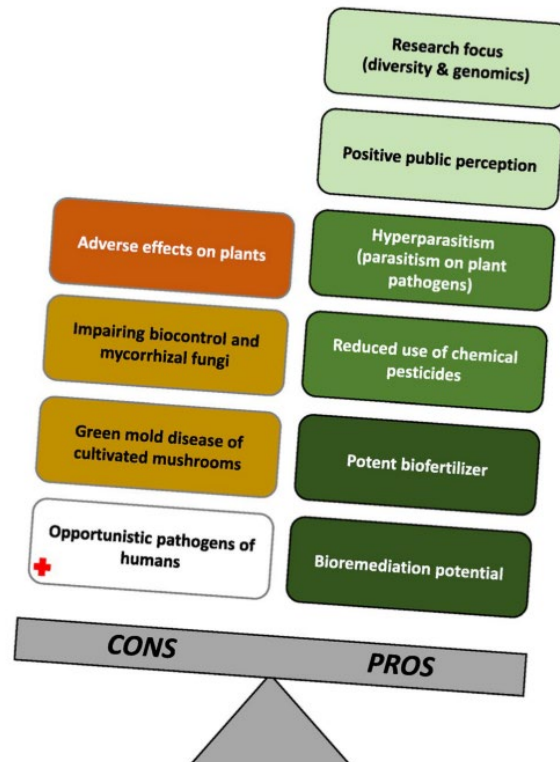


Figura 2. 12: Ventajas y desventajas del uso de *Trichoderma* en la agricultura, adaptado de (Kredics et al., 2021).

2.6.4.- Uso de *Trichoderma* en la viticultura.

La Unión Europea tiene entre sus políticas principales la reducción del uso de agroquímicos en la agricultura (Comisión Europea, 2019). La primera estrategia se basa en el manejo ecológico (OM; *Organic Management*) de los cultivos, la cual concede prioridad a técnicas que no requieran productos fitosanitarios (Unión Europea, 2018). La otra estrategia es la gestión integrada de plagas (IPM, *Integrated Pest Management*), que se define como la evaluación cuidadosa de todos los métodos de protección vegetal disponible para evitar el desarrollo de poblaciones nocivas con el fin de mantener el uso de productos fitosanitarios y otras formas de intervención en niveles que estén económica y ecológicamente justificados. Este método busca la alteración mínima de los agroecosistemas y promueve los mecanismos naturales del control de plagas (Unión Europea, 2009). Ambas estrategias de manejo son compatibles con el uso de un agente de control biológico y es un elemento clave para el manejo de ambos sistemas (Baker et al., 2020). Por tanto, *Trichoderma* constituye una alternativa de presente y futuro para la

agricultura mediante el uso de distintos mecanismos de acción frente a las principales enfermedades de la vid:

- Oídio (*E. necator*) : Se han obtenido aislamientos de *Trichoderma* capaces de generar resistencia inducida frente a este patógeno en la planta de vid (Sawant et al., 2020). Su uso en combinación con aplicaciones de azufre ha permitido controlar esta enfermedad de forma significativa respecto al uso únicamente del azufre. También se demostró que *Trichoderma* era capaz de micoparasitar a *E. necator* (Sawant et al., 2017).

- Mildiu (*P. viticola*): La aplicación de tratamientos alternativos como agentes de biocontrol y uso de cultivares resistentes tiene un papel secundario (Gessler et al., 2011). Aunque, se ha demostrado que la cepa *T. harzianum* T39 es capaz de inducir los genes de resistencia implicados en la defensa de la planta frente a este patógeno generando una respuesta de *priming* sobre la planta (Perazzolli et al., 2011; Banani et al., 2014). Así como los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) producidos por los aislados *Trichoderma asperellum* T34, *T. harzianum* T39 y *T. atroviride* SC1 son capaces de inducir mecanismos de defensa en la planta de vid frente a este patógeno (Lazazzara et al., 2021).

- Podredumbre gris (*B. cinerea*): Durante los últimos años la investigación en el control de esta enfermedad mediante el uso de agentes biofungicidas basados en microorganismos se ha incrementado. Esto es debido a la importancia que la sociedad da a los residuos de los pesticidas en los alimentos y el efecto negativo en el medio ambiente que causan los productos de síntesis química (Fillinger y Elad, 2015). A pesar de ello, pocos agentes de biocontrol están disponibles en el mercado debido a su irregular eficacia. Aunque recientes estudios demuestran que el uso combinado de agentes de biocontrol (*Trichoderma* entre ellos) tienen un alto nivel de eficacia para el control de *B. cinerea*. Y con similares resultados en comparación frente a los fungicidas tradicionales (Pertot et al., 2017).

En lo que respecta a las EMV, uno de los principales agentes de biocontrol comercializados más estudiados es *Trichoderma atroviride* SC1. Éste fue aislado de un avellano con decaimiento en el norte de Italia (Savazzini et al., 2008) y ha sido aprobado como sustancia activa de biocontrol desde 2015 (European Food Safety Authority, 2015). Este aislado es capaz de proteger a la planta durante el proceso de injertado en el vivero

frente a *Phaeoacremonium minimum* y *Phaeomoniella chlamydospora* (Pertot et al., 2016). También tiene la capacidad de reducir la infección por parte de algunos patógenos causantes de las EMV tanto en viveros como en viñedos de nueva plantación (Berbegal et al., 2020). El efecto que causa su inclusión en la comunidad microbiana del suelo durante las dos primeras semanas se ha demostrado de gran importancia, aunque posteriormente, los efectos de las condiciones ambientales son mucho mayores (Longa et al., 2009). Recientes estudios también sobre su influencia en la microbiota del suelo según su forma de aplicación, demuestran distintos efectos en base a la formulación de la aplicación de *T. atroviride* SC1. Este agente de biocontrol afecta a la comunidad microbiana de hongos y bacterias modificando su abundancia e índices de biodiversidad al ser inoculado mediante pellets de madera (Chammem et al., 2021).

También se han descrito a los aislados *T. asperellum* (cepa ICC012) y *T. gamsii*, (cepa ICC080), ambos han sido objeto de estudio para optimizar su identificación en campo (Gerin et al., 2018), como agentes de biocontrol capaces de reducir los síntomas de yesca asociados a la GLSD en un periodo de 7 años (Bigot et al., 2020). Otro agente de biocontrol evaluado como protector de heridas de poda es la cepa de *T. atroviride* I-1237, registrada frente al tratamiento de la yesca y al decaimiento por *Botryosphaeria* (Reis et al., 2017).

Sin embargo, resultados inconsistentes en el control de las EMV por parte de aislados de *Trichoderma* siguen siendo encontrados en los distintos ensayos (Berlanas et al., 2018; Martínez-Diz et al., 2021; van Jaarsveld et al., 2021). Por lo que se debe profundizar en el estudio de estas causas y en la búsqueda de agentes de biocontrol que protejan la planta de vid.

En condiciones de laboratorio, aislados de las especies *T. gamsii*, *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. citrinoviride* han mostrado actividad insecticida con distinto grado de control frente a la plaga taladro de la vid *X. arvicola*. Estos aislados de *Trichoderma* fueron ensayados frente a las distintas etapas del ciclo de vida de este insecto y mostraron actividad ovicida, larvicida y frente a adultos de esta plaga (Rodríguez-González et al., 2017, 2018).

No sólo *Trichoderma* tiene actividad de biocontrol frente a enfermedades y plagas, sino que también puede tener efectos positivos sobre las uvas. La aplicación del aislado *T. harzianum* T22 y de uno de sus metabolitos secundarios (6PP) sobre la planta de vid, regulan el pH e incrementan la cantidad total de polifenoles en las uvas cerca de un 30%, incrementando consecuentemente la actividad antioxidante de las mismas en torno a un 50%-60%. La acumulación de estas sustancias en la uva es particularmente relevante, pues representan un parámetro cualitativo con efecto directo sobre la calidad del vino (Pascale et al., 2017).

2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abou-Mansour, E., Couché, E., y Tabacchi, R. (2004). Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms? *Phytopathol. Mediterr* 43, 75-82. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-1728.
- Agustí-Brisach, C., y Armengol, J. (2013). Black-foot disease of grapevine: An update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathol. Mediterr.* 52, 245-261. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-12662.
- Agustí-Brisach, C., Jiménez-Urbano, J. P., del Carmen Raya, M., López-Moral, A., y Trapero, A. (2021). Vascular fungi associated with branch dieback of olive in super-high-density systems in Southern Spain. *Plant Dis.* 105, 797-818. doi:10.1094/PDIS-08-20-1750-RE.
- Alfiky, A., y Weisskopf, L. (2021). Deciphering *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *J. Fungi* 7, 1-18. doi:10.3390/jof7010061.
- Alleweldt, G. (1980). The breeding of fungus- and phylloxera-resistant grapevine varieties. *Proc. 3rd Int. Symp. Grape Breeding, Davis (California)*, 242-250.
- Alonso-Ramírez, A., Poveda, J., Martín, I., Hermosa, R., Monte, E., y Nicolás, C. (2014). Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Mol. Plant Pathol.* 15, 823-831. doi:10.1111/mpp.12141.
- Alonso, J. L. (2012). «Vinos de calidad y denominaciones de origen: fricciones recientes en los consejos reguladores. La experiencia de Castilla y León», en *Los productos con indicación geográfica en el sistema agroalimentario español*, 109-124.
- Álvarez-Pérez, J. M., González-García, S., Cobos, R., Olego, M. Á., Ibañez, A., Díez-Galán, A., et al. (2017). Use of endophytic and rhizosphere actinobacteria from grapevine plants to reduce nursery fungal graft infections that lead to young grapevine decline. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1-16. doi:10.1128/AEM.01564-17.
- American Veterinary Medical Association (2008). One health: A new professional imperative. *One Heal. Initiat. Task Force Final Rep.*, 76. Available at: https://www.avma.org/KB/Resources/Reports/Documents/onehealth_final.pdf.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., y Evidente, A. (2011). Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins (Basel)*. 3, 1569-1605. doi:10.3390/toxins3121569.
- Arias Giralda, A., Cabezuelo Perez, P., Castillo Lopez, R., Cortes Martín, J., Coscolla Ramon, R., Gracia Aguaron, M., et al. (1988). *Los parásitos de la vid. Estrategias de lucha*. Segunda Ed. , ed. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación Madrid: Ediciones Mundi Prensa.
- Armengol, J. (2017). Enfermedades fúngicas de madera de la vid. Una visión general del problema. *Enoviticultura* 46, 6-15.
- Armengol, J., Vicent, A., Torne, L., García-Figueres, F., y García-Jiménez, J. (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathol. Mediterr.* 40, 325-329. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-1621.
- Aroca, A., García-Figueres, F., Bracamonte, L., Luque, J., y Raposo, R. (2006). A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 115, 195-202. doi:10.1007/s10658-006-9008-5.
- Aroca, Á., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J., y Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoconiella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 126, 165-174. doi:10.1007/s10658-009-9530-3.
- Aroca, A., Luque, J., y Raposo, R. (2008). First report of *Phaeoacremonium viticola* affecting grapevines in Spain. *Plant Pathol.* 57, 386. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01656.x.
- Aroca, A., y Raposo, R. (2009). Pathogenicity of *Phaeoacremonium* species on grapevines. *J. Phytopathol.* 157, 413-419. doi:10.1111/j.1439-0434.2008.01513.x.

- Asghar, W., y Kataoka, R. (2021). Effect of co-application of *Trichoderma* spp. with organic composts on plant growth enhancement, soil enzymes and fungal community in soil. *Arch. Microbiol.* 203, 4281-4291. doi:10.1007/s00203-021-02413-4.
- Badali, H., Khodavaisy, S., Fakhim, H., De Hoog, G. S., Meis, J. F., y Chowdhary, A. (2015). *In vitro* susceptibility profiles of eight antifungal drugs against clinical and environmental strains of *Phaeoacremonium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7818-7822. doi:10.1128/AAC.01733-15.
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L., et al. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Bot.* 60, 3279-3295. doi:10.1093/jxb/erp165.
- Baker, B. P., Green, T. A., y Loker, A. J. (2020). Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. *Biol. Control* 140, 1-9. doi:10.1016/j.biocontrol.2019.104095.
- Banani, H., Roatti, B., Ezzahi, B., Giovannini, O., Gessler, G., Pertot, I., et al. (2014). Characterization of resistance mechanisms activated by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole to downy mildew in different grapevine cultivars. *Plant Pathol.* 63, 334-343. doi:10.1111/ppa.12089.
- Barajas, E., Rubio, J. A., Rojo, F. J., González, J. C., y Caminero, C. (2019). Situación de las enfermedades de madera en el viñedo de Castilla y León. *Tierras Castilla y León*, 70-76.
- Barnett, H. L. (1963). The nature of mycoparasitism by fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 17, 1-14. doi:10.1146/annurev.mi.17.100163.000245.
- Barnett, H. L., y Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4^o Edition. Minnesota, United States: APS Press.
- Bartolomé, J. M., y Fernandez, C. (2016). *De la cepa a la mesa: Estudios históricos entorno al vino*. León.
- Battiston, E., Compant, S., Antonielli, L., Mondello, V., Clément, C., Simoni, A., et al. (2021). *In planta* activity of novel copper(II)-based formulations to inhibit the esca-associated fungus *Phaeoacremonium minimum* grapevine propagation material. *Front. Plant Sci.* 12, 1-17. doi:10.3389/fpls.2021.649694.
- Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., y Acedo, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the «terroir» concept. *Front. Microbiol.* 8, 1-12. doi:10.3389/fmicb.2017.00821.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., y Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249-260.
- Berbegal, M., Ramón-Albalat, A., León, M., y Armengol, J. (2020). Evaluation of long-term protection from nursery to vineyard provided by *Trichoderma atroviride* SC1 against fungal grapevine trunk pathogens. *Pest Manag. Sci.* 76, 967-977. doi:10.1002/ps.5605.
- Berlanas, C., Andrés-Sodupe, M., López-Manzanares, B., Maldonado-González, M. M., y Gramaje, D. (2018). Effect of white mustard cover crop residue, soil chemical fumigation and *Trichoderma* spp. root treatment on black-foot disease control in grapevine. *Pest Manag. Sci.* 74, 2864-2873. doi:10.1002/ps.5078.
- Berlanas, C., Berbegal, M., Elena, G., Laidani, M., Cibriain, J. F., Sagües, A., et al. (2019). The fungal and bacterial rhizosphere microbiome associated with grapevine rootstock genotypes in mature and young vineyards. *Front. Microbiol.* 10, 1-16. doi:10.3389/fmicb.2019.01142.
- Berlanas, C., Ojeda, S., López-Manzanares, B., Andrés-Sodupe, M., Bujanda, R., del Pilar Martínez-Diz, M., et al. (2020). Occurrence and diversity of black-foot disease fungi in symptomless grapevine nursery stock in Spain. *Plant Dis.* 104, 94-104. doi:10.1094/PDIS-03-19-0484-RE.
- Bigot, G., Sivilotti, P., Stecchina, M., Lujan, C., Freccero, A., y Mosetti, D. (2020). Long-term effects of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii* on the prevention of esca in different

- vineyards of Northeastern Italy. *Crop Prot.* 137, 1-5. doi:10.1016/j.cropro.2020.105264.
- Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W., y Samuels, G. J. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus* 6, 263-295. doi:10.5598/imafungus.2015.06.02.02.
- Blanco-Ulate, B., Rolshausen, P., y Cantu, D. (2013). Draft genome sequence of the ascomycete *Phaeoacremonium aleophilum* strain UCR-PA7, a causal agent of the esca disease complex in grapevines. *Genome Announc.* 1, 1-2. doi:10.1128/genomeA.00390-13.
- Blanco García, J. F. (2009). «Los inicios del consumo de uva y ¿del cultivo de la vid? en Cauca vaccea», en *El vino y el banquete en la Europa prerromana*, eds. C. Sanz Mínguez y F. Romero Carnicero (Valladolid: Vaccea Monografías 2. Centro de estudios Vacceos «Federico de Wattenberg» de la Universidad de Valladolid.), 213-224.
- Bois, B., Zito, S., Calonnet, A., y Ollat, N. (2017). Climate vs grapevine pests and diseases worldwide: The first results of a global survey. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* 51, 133-139. doi:10.20870/oeno-one.2016.0.0.1780.
- Bortolami, G., Gambetta, G. A., Delzon, S., Lamarque, L. J., Pouzoulet, J., Badel, E., et al. (2019). Exploring the hydraulic failure hypothesis of esca leaf symptom formation. *Plant Physiol.* 181, 1163-1174. doi:10.1104/pp.19.00591.
- Bove, F., Bavaresco, L., Caffi, T., y Rossi, V. (2019). Assessment of resistance components for improved phenotyping of grapevine varieties resistant to downy mildew. *Front. Plant Sci.* 10, 1-10. doi:10.3389/fpls.2019.01559.
- Brotman, Y., Kapuganti, J. G., y Viterbo, A. (2010). *Trichoderma*. *Curr. Biol.* 20, R390-R391. doi:10.1016/j.cub.2010.02.042.
- Bruetz, E., Haidar, R., Alou, M. T., Vallance, J., Bertsch, C., Mazet, F., et al. (2015). Bacteria in a wood fungal disease: Characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. *Front. Microbiol.* 6, 1-12. doi:10.3389/fmicb.2015.01137.
- Bruetz, E., Larignon, P., Bertsch, C., Robert-Siegwald, G., Lebrun, M.-H., Rey, P., et al. (2021). Impacts of sodium arsenite on wood microbiota of esca-diseased grapevines. *J. Fungi* 7, 1-18. doi:10.3390/jof7070498.
- Bruetz, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Fontaine, F., et al. (2013). Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathol. Mediterr.* 52, 262-275. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-11578.
- Bruetz, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J. P., Guerin-Dubrana, L., et al. (2014). Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. *PLoS One* 9, 1-15. doi:10.1371/journal.pone.0095928.
- Bruno, G., y Sparapano, L. (2006). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 69, 209-223. doi:10.1016/j.pmpp.2007.04.008.
- Cai, F., y Druzhinina, I. S. (2021). In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Divers.* 107, 1-69. doi:10.1007/s13225-020-00464-4.
- Cardell, M. F., Amengual, A., y Romero, R. (2019). Future effects of climate change on the suitability of wine grape production across Europe. *Reg. Environ. Chang.* 19, 2299-2310. doi:10.1007/s10113-019-01502-x.
- Cardoza, R. E., Vizcaíno, J. A., Hermosa, M. R., Sousa, S., González, F. J., Llobell, A., et al. (2006). Cloning and characterization of the *erg1* gene of *Trichoderma harzianum*: Effect of the *erg1* silencing on ergosterol biosynthesis and resistance to terbinafine. *Fungal Genet. Biol.* 43, 164-178. doi:10.1016/j.fgb.2005.11.002.
- Cardoza, R., Hermosa, R., Vizcaíno, J., Sanz, L., Monte, E., y Gutiérrez, S. (2005). Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. *Res. Signpost, Indian* 37, 1-22.

- Carter, M. (1988). «Eutypa dieback», en *Compendium of grape diseases*, ed. Pearson RC (Minnesota, United States: Goheen AC APS press), 32.
- Carter, M. (1991). «The status of *Eutypa lata* as a pathogen», en *Phytopathological Papers* (Kew, United Kingdom: International Mycological Institute), 32.
- Celestino Pérez, S. (2009). «La recepción del vino en Tartessos», en *El vino y el banquete en la Europa prerromana*, eds. C. Sanz Minguez y F. Romero Carnicero (Valladolid: Centro de estudios Vacceos «Federico Wattenberg» de la Universidad de Valladolid), 113-124.
- Chacón-Vozmediano, J. L., Gramaje, D., León, M., Armengol, J., Moral, J., Izquierdo-Cañas, P. M., et al. (2021). Cultivar susceptibility to natural infections caused by fungal grapevine trunk pathogens in la mancha designation of origin (Spain). *Plants* 10, 1-14. doi:10.3390/plants10061171.
- Chammem, H., Antonielli, L., Nesler, A., Pindo, M., y Pertot, I. (2021). Effect of a wood-based carrier of *Trichoderma atroviride* SC1 on the microorganisms of the soil. *J. Fungi* 7, 1-18. doi:10.3390/jof7090751.
- Chiarappa, L. (1959). Wood decay of the grapevine and its relationship with black measles disease. *Phytopathol. Mediterr* 49, 510-519.
- Cloete, M., Fischer, M., Mostert, L., y halleen (2015). Hymenochaetales associated with esca-related wood rots on grapevine with a special emphasis on the status of esca in South African vineyards. *Phytopathol. Mediterr.* 54, 299-312. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-16364.
- Comisión Europea (2019). El Pacto Verde Europeo. en *Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones*. (Bruselas, 11.12.2019 COM(2019) 640 final), 28.
- Comisión Europea (2020a). Estrategia «de la granja a la mesa» para un sistema alimentario justo, saludable y respetuoso con el medio ambiente. en *Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones*. (Bruselas, 20.5.2020 COM(2020) 381 final), 22.
- Comisión Europea (2020b). Estrategia de la UE sobre la biodiversidad de aquí a 2030: Reintegrar la naturaleza en nuestras vidas. en *Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, Al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones* (Bruselas, 20.5.2020 COM(2020) 380 final), 26.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortes-Penagos, C., y López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 149, 1579-1592. doi:10.1104/pp.108.130369.
- Coque, J. J. R., Alvarez-Rodríguez, M. L., y Larriba, G. (2003). Characterization of an inducible chlorophenol O-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* involved in the formation of chloroanisoles and determination of its role in cork taint of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5089-5095. doi:10.1128/AEM.69.9.5089-5095.2003.
- Crous, P. W., Cowan, D. A., Maggs-Kölling, G., Yilmaz, N., Thangavel, R., Wingfield, M. J., et al. (2021). Fungal planet description sheets: 1182–1283. *Persoonia - Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 46, 313-528. doi:10.3767/persoonia.2021.46.11.
- Crous, P. W., y Gams, W. (2000). *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 112-118. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-1530.
- Crous, P. W., Gams, W., Wingfield, M. J., y Van Wyk, P. S. (1996). *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with with and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia* 88, 786-796. doi:10.2307/3760973.
- Decoin, M. (2001). Grapevine products: news on withdrawals and restrictions. *Phytoma* 543, 28-33.
- Del Frari, G., Cabral, A., Nascimento, T., Ferreira, R. B., y Oliveira, H. (2019). *Epicoccum layuense*

- a potential biological control agent of esca-associated fungi in grapevine. *PLoS One* 14, 1-22. doi:10.1371/journal.pone.0213273.
- Del Frari, G., Costa, J., Oliviera, H., y Ferreira, R. B. (2018). Endotherapy of infected grapevine cuttings for the control of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium minimum*. *Phytopathol. Mediterr.* 57, 439-448. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-23515.
- del Río, S., Álvarez-Esteban, R., Alonso-Redondo, R., Hidalgo, C., y Penas, Á. (2021). A new integrated methodology for characterizing and assessing suitable areas for viticulture: A case study in Northwest Spain. *Eur. J. Agron.* 131. doi:10.1016/j.eja.2021.126391.
- Di Marco, S., y Osti, F. (2007). Applications of *Trichoderma* to prevent *Phaeoconiella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathol. Mediterr.* 46, 73-83.
- Di Marco, S., Osti, F., Bossio, D., Nocentini, M., Cinelli, T., Calzarano, F., et al. (2019). Electrolyzed acid water: A clean technology active on fungal vascular pathogens in grapevine nurseries. *Crop Prot.* 119, 88-96. doi:10.1016/j.cropro.2019.01.005.
- Di Marco, S., Osti, F., y Cesari, A. (2004). Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 108-115. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-1730.
- Dou, K., Lu, Z., Wu, Q., Ni, M., Yu, C., Wang, M., et al. (2020). MIST: A multilocus identification system for *Trichoderma*. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1-13. doi:10.1128/AEM.01532-20.
- Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Komo-Zelazowska, M., Mulaw, T. B., y Bissett, J. (2010). The *Trichoderma harzianum* demon: Complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evol. Biol.* 10, 1-14. doi:10.1186/1471-2148-10-94.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., et al. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 749-759. doi:10.1038/nrmicro2637.
- Eskalen, A., Feliciano, A. J., y Gubler, W. D. (2007). Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora*. *Plant Dis.* 91, 1100-1104. doi:10.1094/pdis-91-9-1100.
- Eskalen, A., Latham, S. R., y Gubler, W. D. (2004). Spore release of *Phaeoconiella chlamydospora* associated with grapevine cordons in California. *Phytopathology* 94, S28.
- Espinel-Ingroff, A., Boyle, K., y Sheehan, D. (2001). In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the literature. *Mycopathologia* 150, 101-115. doi:10.1023/A:1010954803886.
- Esteves, A. C., Saraiva, M., Correia, A., y Alves, A. (2014). Botryosphaeriales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Can. J. Microbiol.* 60, 1-36.
- European Food Safety Authority (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Trichoderma atroviride* strain SC1. *EFSA J.* 13, 1-33. doi:10.2903/j.efsa.2015.4092.
- Evidente, A., Sparapano, L., Andolfi, A., y Bruno, G. (2000). Two naphthalenone pentaketides from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 162-168.
- Feliciano, A. J., y Gubler, W. D. (2001). Histological investigations on infection of grape roots and shoots by *Phaeoacremonium* spp. *Phytopathol. Mediterr.* 40, 387-393.
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 579-590. doi:10.1038/nrmicro.2017.87.
- Fillinger, S., y Elad, Y. (2015). *Botrytis - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems.*, eds. S. Fillinger y Y. Elad Springer doi:10.1007/978-3-319-23371-0.
- Fischer, J., Compant, S., Pierron, R. J. G., Gorfer, M., Jacques, A., Thines, E., et al. (2016). Differing alterations of two esca associated fungi, *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* on transcriptomic level, to co-cultured *Vitis Vinifera* L Calli. *PLoS One* 11, 1-21. doi:10.1371/journal.pone.0163344.

- Fischer, M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycol. Prog.* 1, 315-324. doi:10.1007/s11557-006-0029-4.
- Fischer, R., y Thines, E. (2017). «Secondary metabolites of fungal vine pathogens», en *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, 181-207. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-85463-0_10.
- Fleurat-Lessard, P., Luini, E., Berjeaud, J.-M., y Roblin, G. (2010). Diagnosis of grapevine esca disease by immunological detection of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16, 455-463. doi:10.1111/j.1755-0238.2010.00106.x.
- Fleurat-Lessard, P., Luini, E., Berjeaud, J., y Roblin, G. (2014). Immunological detection of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungal pathogen found in esca disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 139, 137-150. doi:10.1007/s10658-013-0372-7.
- Fontaine, F. (2016). Grapevine Trunk Diseases . A review. *Int. Organ. Vine wine*, 1-24.
- Fontaine, M. C., Labbé, F., Dussert, Y., Delière, L., Richart-Cervera, S., Giraud, T., et al. (2021). Europe as a bridgehead in the worldwide invasion history of grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*. *Curr. Biol.* 31, 1-12. doi:10.1016/j.cub.2021.03.009.
- Fortes, A. M., y Pais, M. S. (2016). «Grape (*Vitis* species)», en *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (Elsevier Inc.), 257-286. doi:10.1016/B978-0-12-408117-8.00012-X.
- Fourie, P. H., y Halleen, F. (2004). Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Am. Phytopathol. Soc.* 88, 1241-1245. doi:10.1094/PDIS.2004.88.11.1241.
- Fraga, H., Malheiro, A. C., Moutinho-Pereira, J., y Santos, J. A. (2012). An overview of climate change impacts on European viticulture. *Food Energy Secur.* 1, 94-110. doi:10.1002/fes3.14.
- Gadoury, D. M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C., y Milgroom, M. G. (2012). Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): A fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Mol. Plant Pathol.* 13, 1-16. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00728.x.
- García Benavides, P., Martín Zamorano, P., Ocete, C. A., Maistrello, L., y Ocete, R. (2013). Biodiversity of pathogenic wood fungi isolated from *Xylotrechus arvicola* (Olivier) galleries in vine shoots. *OENO One* 47, 73. doi:10.20870/oeno-one.2013.47.2.1540.
- Geremia, R. A., Goldman, G. H., Jacobs, D., Ardrtes, W., Vila, S. B., Van Montagu, M., et al. (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* 8, 603-613. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01604.x.
- Gerin, D., Pollastro, S., Raguseo, C., Angelini, R. M. D. M., y Faretra, F. (2018). A ready-to-use single- and duplex-TaqMan-qPCR assay to detect and quantify the biocontrol agents *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii*. *Front. Microbiol.* 9, 1-9. doi:10.3389/fmicb.2018.02073.
- Gessler, C., Pertot, I., y Perazzolli, M. (2011). *Plasmopara viticola*: A review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 3-44. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-9360.
- Goldman, G. H., Temmerman, W., Jacobs, D., Contreras, R., Van Montagu, M., y Herrera-Estrella, A. (1993). A nucleotide substitution in one of the β -tubulin genes of *Trichoderma viride* confers resistance to the antimitotic drug methyl benzimidazole-2-yl-carbamate. *MGG Mol. Gen. Genet.* 240, 73-80. doi:10.1007/BF00276886.
- Gomès, É., Maillot, P., y Duchêne, É. (2021). Molecular tools for adapting viticulture to climate change. *Front. Plant Sci.* 12, 1-20. doi:10.3389/fpls.2021.633846.
- Gómez, P. M. (1993). *Apuntes de viticultura práctica*. 1ª Edición. , ed. E. Aedos.
- González de Canales, F., Montaña, A., y LLompart, J. (2020). The beginning of grape cultivation in the iberian peninsula: a reappraisal after the Huelva (Southwestern Spain) archaeological finds and new radiocarbon datings. *Onoba* 8, 35-42. doi:dx.doi.org/10.33776/onoba.v8i0.3651.

- Gramaje, D., Aguilar, M. I., y Armengol, J. (2011a). First report of *Phaeoacremonium krajdennii* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Dis.* 95, 615. doi:10.1094/pdis-11-10-0808.
- Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D., Mostert, L., et al. (2012). Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 28, 1-13. doi:10.3767/003158512X626155.
- Gramaje, D., Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., y Armengol, J. (2010a). Effect of hot-water treatments *in vitro* on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. *Ann. Appl. Biol.* 156, 231-241. doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00382.x.
- Gramaje, D., Alaniz, S., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., y Armengol, J. (2007). First report of *Phaeoacremonium mortoniae* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Dis.* 91, 1206. doi:10.1094/PDIS-91-9-1206A.
- Gramaje, D., Alaniz, S., Pérez-Sierra, A., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., y Armengol, J. (2008). First report of *Phaeoacremonium scolyti* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Dis.* 92, 836. doi:10.1094/PDIS-92-5-0836B.
- Gramaje, D., y Armengol, J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Dis.* 95, 1040-1055. doi:10.1094/PDIS-01-11-0025.
- Gramaje, D., Armengol, J., Barajas, E., Berbegal, M., Chacón-Vozmediano, J. L., Díaz-Losada, E., et al. (2020). *Guía sobre las enfermedades fúngicas de la madera de la vid.*, ed. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación - Gobierno de España.
- Gramaje, D., Armengol, J., Colino, M. I., Santiago, R., Moralejo, E., Olmo, D., et al. (2009a). First report of *Phaeoacremonium inflatipes*, *P. iranianum*, and *P. sicilianum* causing Petri disease of grapevine in Spain. *Plant Dis.* 93, 964-965. doi:10.1094/pdis-93-9-0964c.
- Gramaje, D., Armengol, J., y Ridgway, H. J. (2013). Genetic and virulence diversity, and mating type distribution of *Togninia minima* causing grapevine trunk diseases in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 135, 727-743. doi:10.1007/s10658-012-0110-6.
- Gramaje, D., Aroca, Á., Raposo, R., García-Jiménez, J., y Armengol, J. (2009b). Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. *Crop Prot.* 28, 1091-1097. doi:10.1016/j.cropro.2009.05.010.
- Gramaje, D., Baumgartner, K., Halleen, F., Mostert, L., Sosnowski, M. R., Úrbez-Torres, J. R., et al. (2016). Fungal trunk diseases: A problem beyond grapevines? *Plant Pathol.* 65, 355-356. doi:10.1111/ppa.12486.
- Gramaje, D., y Di Marco, S. (2015). Identifying practices likely to have impacts on grapevine trunk disease infections: a European nursery survey. *Phytopathol. Mediterr.* 54, 313-324. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-16317.
- Gramaje, D., García-Jiménez, J., y Armengol, J. (2010b). Field evaluation of grapevine rootstocks inoculated with fungi associated with Petri disease and esca. *Am. J. Enol. Vitic.* 61, 512-520. doi:10.5344/ajev.2010.10021.
- Gramaje, D., Mañas, F., Lerma, M. L., Muñoz, R. M., García-Jiménez, J., y Armengol, J. (2014). Effect of hot-water treatment on grapevine viability, yield components and composition of must. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20, 144-148. doi:10.1111/ajgw.12052.
- Gramaje, D., Mostert, L., y Armengol, J. (2011b). Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. *Phytopathol. Mediterr.* 50, S112-S126. doi:doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8723.
- Gramaje, D., Mostert, L., Groenewald, J. Z., y Crous, P. W. (2015). *Phaeoacremonium*: From esca disease to phaeoohyphomycosis. *Fungal Biol.* 119, 759-783. doi:10.1016/j.funbio.2015.06.004.
- Gramaje, D., Urbez-Torres, J. R., y Sosnowski, M. R. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Dis.* 102, 12-39. doi:10.1094/PDIS-04-17-0512-FE.

- Grossman, J., y Doublet, B. (2012). Maladies du bois de la vigne. Synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003–2008 au réseau d'épidémiologie-surveillance actuel. *Phytoma – La Défense des Végétaux*.
- Gruber, S. G., y Seidl-Seiboth, V. (2012). Self versus non-self: Fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* 158, 26-34. doi:10.1099/mic.0.052613-0.
- Guerin-Dubrana, L., Fontaine, F., y Mugnai, L. (2019). Grapevine trunk disease in European and Mediterranean vineyards: Occurrence, distribution and associated disease-affecting cultural factors. *Phytopathol. Mediterr.* 58, 49-71. doi:10.13128/Phytopathol_Mediterr-25153.
- Gutiérrez, S. (2017). *Lección inaugural curso académico 2017-2018: Aplicaciones biotecnológicas de los hongos filamentosos*. Campus de Ponferrada. Universidad de León.
- Halleen, F., Baloyi, M. A., Bester, M. C., y Mostert, L. (2020). Aerial inoculum patterns of Petri disease pathogens in South African vineyards and rootstock mother blocks. *Phytopathol. Mediterr.* 59, 515-536. doi:10.14601/Phyto-11370.
- Halleen, F., Fourie, P. H., y Crous, P. W. (2006). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 45, S555-S67. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-1845.
- Halleen, F., Fourie, P. H., y Lombard, P. J. (2010). Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South African J. Enol. Vitic.* 31, 125-132. doi:10.21548/31-2-1409.
- Hanson, J. R. (2005). The chemistry of the bio-control agent, *Trichoderma harzianum*. *Sci. Prog.* 88, 237-248. doi:10.3184/003685005783238372.
- Hanson, L. E., y Howell, C. R. (2004). Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 94, 171-176. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.2.171.
- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96, 190-194. doi:10.1094/PHYTO-96-0190.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., y Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43-56. doi:10.1038/nrmicro797.
- Harman, G. E., y Kubicek, C. P. (1998). «Volume 2: Enzymes, biological control and commercial applications», en *Trichoderma and Gliocladium*. (UK: CRC Press).
- Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., et al. (2007). Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology* 97, 532-537. doi:10.1094/PHYTO-97-4-0532.
- Hawksworth, D. L., Gibson, I. A. S., y Gams, W. (1976). *Phialophora parasitica* associated with disease conditions in various trees. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66, 427-431. doi:10.1016/s0007-1536(76)80212-4.
- Henderson, B., Sosnowski, M. R., McCarthy, M. G., y Scott, E. S. (2021). Incidence and severity of *Eutypa dieback* in grapevines are related to total surface area of pruning wounds. *Aust. J. Grape Wine Res.* 27, 87-93. doi:10.1111/ajgw.12465.
- Hermosa, R., Cardoza, R. E., Rubio, M. B., Gutiérrez, S., y Monte, E. (2014). «Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*», en *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (Elsevier), 125-137. doi:10.1016/B978-0-444-59576-8.00010-2.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., y Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17-25. doi:10.1099/mic.0.052274-0.
- Hoffmeister, D., y Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: Enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.* 24, 393-416. doi:10.1039/b603084j.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., y Gindro, K. (2012). What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Divers.* 54, 51-67. doi:10.1007/s13225-012-0171-z.
- Howell, C. R., Stipanovic, R. D., y Lumsden, R. D. (1993). Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Sci.*

- Technol.* 3, 435-441. doi:10.1080/09583159309355298.
- Illescas, M., Rubio, M. B., Hernández-Ruiz, V., Morán-Diez, M. E., Martínez de Alba, A. E., Nicolás, C., et al. (2020). Effect of Inorganic N top dressing and *Trichoderma harzianum* seed-inoculation on crop yield and the shaping of root microbial communities of wheat plants cultivated under high basal N fertilization. *Front. Plant Sci.* 11, 1-21. doi:10.3389/fpls.2020.575861.
- Index Fungorum (2021). Index fungorum. Available at: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>.
- Jackson, R. S. (2008). «Grape species and varieties», en *Wine Sciences principles and applications*, ed. Elsevier, 13-44. doi:10.1016/b978-012379062-0/50003-2.
- Jaklitsch, W. M. (2009). European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Stud. Mycol.* 63, 1-91. doi:10.3114/sim.2009.63.01.
- Jaklitsch, W. M. (2011). European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. *Fungal Divers.* 48, 1-250. doi:10.1007/s13225-011-0088-y.
- Jaklitsch, W. M., y Voglmayr, H. (2013). New combinations in *Trichoderma* (*Hypocreaceae* , *Hypocreales*). *Eur. PMC Funders Gr.* 1, 143-156. doi:10.5248/126.143.
- Jaklitsch, W. M., y Voglmayr, H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma*(*Hypocreacea*) in southern Europe and Macaronesia. *Stud. Mycol.* 80, 1-87. doi:10.1016/j.simyco.2014.11.001.
- Jayawardena, R. S., Hyde, K. D., Jeewon, R., Ghobad-Nejhad, M., Wanasinghe, D. N., Liu, N. G., et al. (2019). One stop shop II: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera: 26–50 (2019). *Fungal Divers.* 94, 41-129. doi:10.1007/s13225-019-00418-5.
- John, S., Scott, E. S., Wicks, T. J., y Hunt, J. S. (2004). Interactions between *Eutypa lata* and *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 95-104. doi:10.1400/14578.
- John, S., Wicks, T. J., Hunt, J. S., Lorimer, M. F., Oakey, H., y Scott, E. S. (2005). Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Aust. J. Grape Wine Res.* 14, 134-142. doi:10.1111/j.1755-0238.2008.00015.x.
- John, S., Wicks, T. J., Hunt, J. S., y Scott, E. S. (2008). Colonisation of grapevine wood by *Trichoderma harzianum* and *Eutypa lata*. *Aust. J. Grape Wine Res.* 14, 18-24. doi:10.1111/j.1755-0238.2008.00003.x.
- Juan-Tresserras, J. (1999). «El cultivo de la vid y la elaboración del vino en la Península Ibérica en la antigüedad aportaciones de los análisis de residuos», en *El Vi a l'antiguitat . Economia, producció i comerç al Mediterrani occidental: II Col·loqui Internacional d'Arqueologia Romana* (Museu de Badalona.Monografies Badalonines.), 87-92.
- Keswani, C., Singh, H. B., Hermosa, R., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y. W., et al. (2019). Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 9287-9303. doi:10.1007/s00253-019-10209-2.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., y Stalpers, J. . (2001). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. Wallingford, Oxon, UK : CAB International.
- Kotze, C., Van Niekerk, J., Mostert, L., Halleen, F., Fourie, P., Van Niekerk, J., et al. (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 247-263. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-8960.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., y Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 37-42.
- Kredics, L., Naeimi, S., Hatvani, L., Vágvölgyi, C., Cai, F., Druzhinina, I. S., et al. (2021). 'The Good, the Bad and the Ugly' in the shades of green: the genus *Trichoderma* in the spotlight. *Indian Phytopathol.* 74, 403-411. doi:10.1007/s42360-021-00352-0.
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M.,

- et al. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* 12, 1-15. doi:10.1186/gb-2011-12-4-r40.
- Kubicek, C. P., Komon-Zelazowska, M., y Druzhinina, I. S. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: From barcodes to biodiversity. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9, 753-763. doi:10.1631/jzus.B0860015.
- Kubicek, C. P., Steindorff, A. S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., et al. (2019). Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC Genomics* 20, 1-24. doi:10.1186/s12864-019-5680-7.
- Labois, C., Stempien, E., Schneider, J., Schaeffer-Reiss, C., Bertsch, C., Goddard, M. L., et al. (2021). Comparative study of secreted proteins, enzymatic activities of wood degradation and stilbene metabolization in grapevine *Botryosphaeria dieback* fungi. *J. Fungi* 7, 1-24. doi:10.3390/jof7070568.
- Ladi, E., Shukla, N., Bohra, Y., Tiwari, A. K., y Kumar, J. (2020). Copper tolerant *Trichoderma asperellum* increases bio-efficacy of copper against *Phytophthora infestans* in dual combination. *Phytoparasitica* 48, 357-370. doi:10.1007/s12600-020-00804-9.
- Laine, A. L. (2006). Evolution of host resistance: Looking for coevolutionary hotspots at small spatial scales. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273, 267-273. doi:10.1098/rspb.2005.3303.
- Larignon, P., Darné, G., Ménard, E., Desaché, F., y Dubos, B. (2008). Comment agissait l'arsénite de sodium sur l'esca de la vigne? How did the sodium arsenite act against the esca of the grapevine? *Progrès Agric. Vitic.* 125, 642-651.
- Larignon, P., y Dubos, B. (2000). Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 184-189. doi:10.14601/Phytopathol.
- Lazazzara, V., Vicelli, B., Bueschl, C., Parich, A., Pertot, I., Schuhmacher, R., et al. (2021). *Trichoderma* spp. volatile organic compounds protect grapevine plants by activating defense-related processes against downy mildew. *Physiol. Plant.* 172, 1950-1965. doi:10.1111/pp1.13406.
- Leeuwen, C. Van, y Seguin, G. (2006). The concept of *terroir* in viticulture. *J. Wine Res.* 17, 1-10. doi:10.1080/09571260600633135.
- Lima, M. R. M., Machado, A. F., y Gubler, W. D. (2017). Metabolomic study of Chardonnay grapevines double stressed with esca-associated fungi and drought. *Am. Phytopathol. Soc.* 107, 669-680. doi:10.1094/PHYTO-11-16-0410-R.
- Lolas, M. A., Castro, A., Polanco, R., Gainza-Cortés, F., Ferrada, E., Sosnowski, M. R., et al. (2020). First report of *Eutypa lata* causing dieback of grapevines (*Vitis vinifera*) in Chile. *Plant Dis.* 104, 2024. doi:10.1094/PDIS-12-19-2531-PDN.
- Longa, C. M. O., Pertot, I., y Tosi, S. (2008). Ecophysiological requirements and survival of a *Trichoderma atroviride* isolate with biocontrol potential. *J. Basic Microbiol.* 48, 269-277. doi:10.1002/jobm.200700396.
- Longa, C. M. O., Savazzini, F., Tosi, S., Elad, Y., y Pertot, I. (2009). Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1549-1557. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04117.x.
- López-Moral, A., del Carmen Raya, M., Ruiz-Blancas, C., Medialdea, I., Lovera, M., Arquero, O., et al. (2020). Aetiology of branch dieback, panicle and shoot blight of pistachio associated with fungal trunk pathogens in southern Spain. *Plant Pathol.* 69, 1237-1269. doi:10.1111/ppa.13209.
- Lorch, W. (2014). Fatal wood disease affects 12 percent of French vineyards. Available at: <https://www.wine-searcher.com/m/2014/10/fatal-wood-diseases-affect-12-percent-of-french-vineyards> [Accedido noviembre 29, 2019].
- Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L., et al. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83, 302-307.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Di Pietro, A., Woo, S. L., y Harman, G. E. (1994). Purification,

- characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84, 398-405.
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M., y Jansson, J. K. (2004). *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3073-3081. doi:10.1128/AEM.70.5.3073-3081.2004.
- Luini, E., Fleurat-Lessard, P., Rousseau, L., Roblin, G., y Berjeaud, J. M. (2010). Inhibitory effects of polypeptides secreted by the grapevine pathogens *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on plant cell activities. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74, 403-411. doi:10.1016/j.pmpp.2010.06.007.
- Luque, J., Garcia-Figueroles, F., Legorburu, F., Muruamendiaraz, A., Armengol, J., y Trouillas, F. P. (2012). Species of *Diatrypaceae* associated with grapevine trunk diseases in Eastern Spain. *Phytopathol. Mediterr.* 54, 528-540. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-9953.
- Lyu, D., Msimbira, L. A., Nazari, M., Antar, M., Pagé, A., Shah, A., et al. (2021). The coevolution of plants and microbes underpins sustainable agriculture. *Microorganisms* 9, 1-13. doi:10.3390/microorganisms9051036.
- Mahoney, N., Molyneux, R. J., Smith, L. R., Schoch, T. K., Rolshausen, P. E., y Gubler, W. D. (2005). Dying-arm disease in grapevines: Diagnosis of infection with *Eutypa lata* by metabolite analysis. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8148-8155. doi:10.1021/jf0510236.
- Malheiro, A. C., Santos, J. A., Fraga, H., y Pinto, J. G. (2010). Climate change scenarios applied to viticultural zoning in Europe. *Clim. Res.* 43, 163-177. doi:10.3354/cr00918.
- Maliogka, V. I., Martelli, G. P., Fuchs, M., y Katis, N. I. (2015). *Control of viruses infecting grapevine*. 1.ª ed. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.aivir.2014.11.002.
- Malmierca, M. G., Barua, J., McCormick, S. P., Izquierdo-Bueno, I., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., et al. (2015). Novel aspinolide production by *Trichoderma arundinaceum* with a potential role in *Botrytis cinerea* antagonistic activity and plant defence priming. *Environ. Microbiol.* 17, 1103-1118. doi:10.1111/1462-2920.12514.
- Malmierca, M. G., Izquierdo-Bueno, I., McCormick, S. P., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., Barua, J., et al. (2016). Trichothecenes and aspinolides produced by *Trichoderma arundinaceum* regulate expression of *Botrytis cinerea* genes involved in virulence and growth. *Environ. Microbiol.* 18, 3991-4004. doi:10.1111/1462-2920.13410.
- MAPA (2021). Superficie plantada de uva de vinificación a 31 de julio de 2020. 1-4. Available at: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/regulacion-de-los-mercados/organizaciones-comunes-de-mercado-y-regimenes-de-ayuda/ocm-vitivinicola/potencial-productivo.aspx>.
- Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., Wingfield, M. J., Akulov, A., Carnegie, A. J., Cheewangkoon, R., et al. (2019). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 2. *Stud. Mycol.* 92, 47-133. doi:10.1016/j.simyco.2018.04.002.
- Marín, D., Armengol, J., Carbonell-Bejerano, P., Escalona, J. M., Gramaje, D., Hernández-Montes, E., et al. (2021). Challenges of viticulture adaptation to global change: tackling the issue from the roots. *Aust. J. Grape Wine Res.* 27, 8-25. doi:10.1111/ajgw.12463.
- Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S. L., Ruocco, M., et al. (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Curr. Genet.* 50, 307-321. doi:10.1007/s00294-006-0091-0.
- Marra, R., Vitale, S., Turra, D., Reverberi, M., Fanelli, C., Vinale, F., et al. (2018). Root exudates of stressed plants stimulate and attract *Trichoderma* soil fungi. *Mol. plant- microbe Interact.* 10, 982-994. doi:doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0310-R.
- Martín Gil, Á., Ramos Sáez de Ojer, J. L., y Pérez, M. R. (2014). *Guía de gestión integrada de plagas: uva de transformación*. , ed. Ministerio de agricultura alimentación y medio ambiente Madrid Available at: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad->

- vegetal/GUIAUAVADETRANSFORMACION_tcm30-57934.pdf.
- Martín, L., y Martín, M. T. (2013). Characterization of fungicide resistant isolates of *Phaeoacremonium aleophilum* infecting grapevines in Spain. *Crop Prot.* 52, 141-150. doi:10.1016/j.cropro.2013.05.023.
- Martín, L., Sáenz de Miera, L. E., y Martín, M. T. (2014). AFLP and RAPD characterization of *Phaeoacremonium aleophilum* associated with vitis vinifera decline in Spain. *J. Phytopathol.* 162, 245-257. doi:10.1111/jph.12180.
- Martín, M. T., y Cobos, R. (2007). Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathol. Mediterr.* 46, 18-25. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Martín, M. T., Cobos, R., Martín, L., y López-Enríquez, L. (2012). Real-time PCR detection of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3985-3991. doi:10.1128/AEM.07360-11.
- Martínez-Diz, M. del P., Andrés-Sodupe, M., Bujanda, R., Díaz-Losada, E., Eichmeier, A., y Gramaje, D. (2019). Soil-plant compartments affect fungal microbiome diversity and composition in grapevine. *Fungal Ecol.* 41, 234-244. doi:10.1016/j.funeco.2019.07.003.
- Martínez-Diz, M. del P., Díaz-Losada, E., Andrés-Sodupe, M., Bujanda, R., Maldonado-González, M. M., Ojeda, S., et al. (2020a). Field evaluation of biocontrol agents against black-foot and Petri diseases of grapevine. *Pest Manag. Sci.* 77, 697-708. doi:10.1002/ps.6064.
- Martínez-Diz, M. del P., Díaz-Losada, E., Díaz-Fernández, Á., Bouzas-Cid, Y., y Gramaje, D. (2021). Protection of grapevine pruning wounds against *Phaeomoniella chlamydospora* and *Diplodia seriata* by commercial biological and chemical methods. *Crop Prot.* 143, 1-9. doi:10.1016/j.cropro.2020.105465.
- Martínez-Diz, M. del P., Eichmeier, A., Spetik, M., Bujanda, R., Díaz-Fernández, Á., Díaz-Losada, E., et al. (2020b). Grapevine pruning time affects natural wound colonization by wood-invading fungi. *Fungal Ecol.* 48, 1-13. doi:10.1016/j.funeco.2020.100994.
- Martínez-Medina, A., Pascual, J. A., Pérez-Alfocea, F., Albacete, A., y Roldán, A. (2010). *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. *Phytopathology* 100, 682-688. doi:10.1094/PHYTO-100-7-0682.
- Masson-Delmonte, V., Zhai, P., Pirani, A., Connors, S., Péan, C., Berger, S., et al. (2021). IPCC, 2021: climate change 2021: The physical science basis. contribution of working group I to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. In press. Cambridge University Press.
- Massonnet, M., Morales-Cruz, A., Minio, A., Figueroa-Balderas, R., Lawrence, D. P., Travadon, R., et al. (2018). Whole-genome resequencing and pan-transcriptome reconstruction highlight the impact of genomic structural variation on secondary metabolite gene clusters in the grapevine esca pathogen *Phaeoacremonium minimum*. *Front. Microbiol.* 9, 1-16. doi:10.3389/fmicb.2018.01784.
- Mayo-Prieto, S., Porteous-álvarez, A. J., Mezquita-García, S., Rodríguez-González, Á., Carro-Huerga, G., Del Ser-Herrero, S., et al. (2021). Influence of physicochemical characteristics of bean crop soil in *Trichoderma* spp. development. *Agronomy* 11, 1-14. doi:10.3390/agronomy11020274.
- Mceill, J., Barrie, F., Budet, H. M., Demoulin, V., y Hawksworth, D. (2006). International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, July 2005. en *Gantner Verlag, Reg. Veg.*, ed. L. Ruggell.
- Mishra, N., Khan, S. S., y Sundari, S. K. (2016). Native isolate of *Trichoderma*: a biocontrol agent with unique stress tolerance properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 1-23. doi:10.1007/s11274-016-2086-4.
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., et al. (2018). Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Dis.* 102, 1189-1217. doi:10.1094/PDIS-08-17-1181-FE.

- Morales-Cruz, A., Allenbeck, G., Figueroa-Balderas, R., Ashworth, V. E., Lawrence, D. P., Travadon, R., et al. (2018). Closed-reference metatranscriptomics enables *in planta* profiling of putative virulence activities in the grapevine trunk disease complex. *Mol. Plant Pathol.* 19, 490-503. doi:10.1111/mpp.12544.
- Morán-Diez, M. E., Martínez de Alba, Á. E., Rubio, M. B., Hermosa, R., y Monte, E. (2021). *Trichoderma* and the plant heritable priming responses. *J. Fungi* 7, 1-23. doi:10.3390/jof7040318.
- Mostert, L. (2006). Phylogeny and taxonomy of *Phaeoacremonium* and its relatives. en (Tesis doctoral. Wageningen University. Wageningen.), 249.
- Mostert, L., Crous, P. W., Groenewald, J. Z. (Ewald), Gams, W., y Summerbell, R. C. (2003). *Togninia* (Calosphaerales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia* 95, 646-659. doi:10.2307/3761941.
- Mostert, L., Groenewald, J. Z., Summerbell, R. C., Gams, W., y Crous, P. W. (2006a). Taxonomy and pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Stud. Mycol.* 54, 1-113. doi:10.3114/sim.54.1.1.
- Mostert, L., Groenewald, J. Z., Summerbell, R. C., Robert, V., Sutton, D. A., Padhye, A. A., et al. (2005). Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1752-67. doi:10.1128/JCM.43.4.1752-1767.2005.
- Mostert, L., Halleen, F., Fourie, P., y Crous, P. W. (2006b). A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and esca of grapevines. *Phytopathol. Mediterr.* 45, 12-29. doi:doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1844.
- Moyo, P., Allsopp, E., Roets, F., Mostert, L., y Halleen, F. (2014). Arthropods vector grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathology* 104, 1063-1069. doi:10.1094/PHYTO-11-13-0303-R.
- Mugnai, L., Graniti, A., y Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Dis.* 83, 404-418. doi:10.1094/PDIS.1999.83.5.404.
- Mukherjee, P. K., Wiest, A., Ruiz, N., Keightley, A., Moran-Diez, M. E., McCluskey, K., et al. (2011). Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. *J. Biol. Chem.* 286, 4544-4554. doi:10.1074/jbc.M110.159723.
- Munkvold, G. P. (2001). *Eutypa* dieback of grapevine and apricot. *Plant Heal. Prog.* 2, 1-9. doi:10.1094/php-2001-0219-01-dg.
- Murmanis, L. L., Highley, T. L., y Ricard, J. (1988). Hyphal interaction of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma polysporum* with wood decay fungi. *Mater. Und Org.* 23, 271-279.
- Mutawila, C., Fourie, P. H., Halleen, F., y Mostert, L. (2011a). Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 264-276. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-8981.
- Mutawila, C., Fourie, P. H., Halleen, F., y Mostert, L. (2011b). Histo-pathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 46-60. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-8643.
- Mutawila, C., Halleen, F., y Mostert, L. (2015a). Development of benzimidazole resistant *Trichoderma* strains for the integration of chemical and biocontrol methods of grapevine pruning wound protection. *BioControl* 60, 387-399. doi:10.1007/s10526-014-9647-y.
- Mutawila, C., Halleen, F., y Mostert, L. (2016a). Optimisation of time of application of *Trichoderma* biocontrol agents for protection of grapevine pruning wounds. *Aust. J. Grape Wine Res.* 22, 279-287. doi:10.1111/ajgw.12218.
- Mutawila, C., Stander, C., Halleen, F., Vivier, M. A., y Mostert, L. (2016b). Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Eutypa lata* and *Trichoderma atroviride* culture filtrates: expression of defence-related genes and phenotypes. *Protoplasma* 254, 863-879. doi:10.1007/s00709-016-

- 0997-4.
- Mutawila, C., Vinale, F., Halleen, F., Lorito, M., y Mostert, L. (2015b). Isolation, production and *in vitro* effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. *Plant Pathol.* 65, 104-113. doi:10.1111/ppa.12385.
- Nerva, L., Turina, M., Zanzotto, A., Gardiman, M., Gaiotti, F., Gambino, G., et al. (2019). Isolation, molecular characterization and virome analysis of culturable wood fungal endophytes in esca symptomatic and asymptomatic grapevine plants. *Environ. Microbiol.* 21, 2886-2904. doi:10.1111/1462-2920.14651.
- Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Zafari, D., y Thrane, U. (2005). Trichothecene production by *Trichoderma brevicompactum*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8190-8196. doi:10.1021/jf051279b.
- OEMV (2020). Superficie de viñedo en España 2020. *Obs. Español del Merc. del Vino*.
- OIV (2021). State of the world vitivinicultural sector in 2020. *Int. Organ. Vine Wine*, 1-15. Available at: <http://www.oiv.int/public/medias/7298/oiv-state-of-the-vitivinicultural-sector-in-2019.pdf>.
- Olmo, D., Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., León, M., y Armengol, J. (2014). First report of *Phaeoacremonium venezuelense* associated with wood decay of apricot trees in Spain. *Plant Dis.* 98, 1001. doi:10.1094/PDIS-12-13-1198-PDN.
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23, 23-54.
- Parlamento Europeo, y Consejo de la Unión Europea (2012). Reglamento (UE) N° 1151/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de noviembre de 2012, sobre los regímenes de calidad de los productos agrícolas y alimenticios. *D. Of. la Unión Eur. Ser. L343/1*, 1-29. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R1151&from=es>.
- Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., et al. (2017). *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop Prot.* 92, 176-181. doi:10.1016/j.cropro.2016.11.010.
- Pearson, R., y Goheen, C. (1994). «Phomopsis cane and leaf spot.», en *Compendium of Grape Diseases*, ed. W. B. Hewitt & R. C. Pearson (Minnesota, United States: APS Press), 17-18.
- Perazzolli, M., Roatti, B., Bozza, E., y Pertot, I. (2011). *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biol. Control* 58, 74-82. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.04.006.
- Péros, J. P., Jamaux-Desprésaux, I., y Berger, G. (2000). Population genetics of fungi associated with esca disease in French vineyards. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 150-155. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-1553.
- Persoon, C. H. (1794). *Diposita methodica fungorum*. *Romers Neues Mag Bot* 1, 81-128.
- Pertot, I., Giovannini, O., Benanchi, M., Caffi, T., Rossi, V., y Mugnai, L. (2017). Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Prot.* 97, 85-93. doi:10.1016/j.cropro.2017.01.010.
- Pertot, I., Prodorutti, D., Colombini, A., y Pasini, L. (2016). *Trichoderma atroviride* SC1 prevents *Phaeoacremonium chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* infection of grapevine plants during the grafting process in nurseries. *BioControl* 61, 257-267. doi:10.1007/s10526-016-9723-6.
- Petri, L. (1912). Osservazioni sopra le alterazioni del legno della vite in seguito a ferite. *Le Stazioni Sper. Agrar. Ital.* 45, 501-547.
- Pierron, R., Gorfer, M., Berger, H., Jacques, A., Sessitsch, A., Strauss, J., et al. (2015). Deciphering the niches of colonisation of *Vitis vinifera* L. by the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum* using a gfp marked strain and cutting systems. *PLoS One* 10, 1-22. doi:10.1371/journal.pone.0126851.
- Piqueras-Haba, J. (2005). La filoxera en España y su difusión espacial: 1878-1926. *Cuad. Geogr.* 77, 101-136.

- Pitt, W. M., Huang, R., Steel, C. C., y Savocchia, S. (2013a). Pathogenicity and epidemiology of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevines in Australia. *Australas. Plant Pathol.* 42, 573-582. doi:10.1007/s13313-013-0221-3.
- Pitt, W. M., Úrbez-Torres, J. R., y Trouillas, F. P. (2013b). *Dothiorella vidmadera*, a novel species from grapevines in Australia and notes on *Spencermartinsia*. *Fungal Divers.* 61, 209-219. doi:10.1007/s13225-013-0244-7.
- Pitt, W. M., Úrbez-Torres, J. R., y Trouillas, F. P. (2015). *Dothiorella* and *Spencermartinsia*, new species and records from grapevines in Australia. *Australas. Plant Pathol.* 44, 43-56. doi:10.1007/s13313-014-0332-5.
- Plataforma Tecnológica del Vino (2021). Agenda estratégica de innovación del sector del vino 2021/2024. *PTV*, 87.
- Pontini, S., Fleurat-Lessard, P., Béré, E., Berjeaud, J. M., y Roblin, G. (2014). Impact of temperature variations on toxic effects of the polypeptides secreted by *Phaeoacremonium aleophilum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 87, 51-58. doi:10.1016/j.pmpp.2014.06.002.
- Pouzoulet, J., Mailhac, N., Couderc, C., Besson, X., Daydé, J., Lummerzheim, M., et al. (2013). A method to detect and quantify *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 10163-10175. doi:10.1007/s00253-013-5299-6.
- Pouzoulet, J., Scudiero, E., Schiavon, M., y Rolshausen, P. E. (2017). Xylem vessel diameter affects the compartmentalization of the vascular pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine. *Front. Plant Sci.* 8, 1-13. doi:10.3389/fpls.2017.01442.
- Proctor, R. H., McCormick, S. P., y Gutiérrez, S. (2020). Genetic bases for variation in structure and biological activity of trichothecene toxins produced by diverse fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 5185-5199. doi:10.1007/s00253-020-10612-0.
- Punithalingam, E. (1979). *Phomopsis viticola*. UK, CAB International Wallingford doi:10.1079/DFB/20056400635.
- Quesada Sanz, F. (2009). «Producción y consumo del vino entre los iberos», en *El vino y el banquete en la Europa prerromana*, eds. C. Sanz Mínguez y F. Romero Carnicero (Valladolid: Vaccea Monografías 2. Centro de estudios Vacceos «Federico de Wattenberg» de la Universidad de Valladolid), 125-142.
- Rausher, M. D. (2001). Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411, 857-864. doi:10.1038/35081193.
- Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., y Lund, S. T. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* 6, 1-11. doi:10.1186/1471-2229-6-27.
- Reis, P., Letousey, P., Rego, C., Lesaffre, A., Care, P., Henri, R., et al. (2017). *Trichoderma atroviride* strain I-1237: colonization of pruning wounds against grapevine wood diseases. *Phytopathol. Mediterr. (Abstract retrieved from Abstr. oral poster Present. given 10th Int. Work. Grapevine Trunk Dis. Reims, Fr. 4-7 July 2017.)* 56, 513-588. doi:10.13140/RG.2.2.17892.27523.
- Reynier, A. (2005). *Manual viticultura*. 6ª Edición. , ed. E. Mundi-Prensa.
- Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116, 1-56.
- Roberti, R., Osti, F., Innocenti, G., Rombolà, A. D., y Di Marco, S. (2017). An environmentally sustainable approach for the management of *Phaeoacremonium minimum*, the main agent of wood diseases in *Actinidia deliciosa*. *Eur. J. Plant Pathol.* 148, 151-162. doi:10.1007/s10658-016-1079-3.
- Rodríguez-González, Á., Carro-Huerga, G., Mayo-Prieto, S., Lorenzana, A., Gutiérrez, S., Peláez, H. J., et al. (2018). Investigations of *Trichoderma* spp. and *Beauveria bassiana* as biological control agent for *Xylotrechus arvicola*, a major insect pest in Spanish vineyards. *J. Econ. Entomol.*, 1-7. doi:10.1093/jee/toy256.
- Rodríguez-González, A., Mayo, S. S., González-López, O., Reinoso, B., Gutierrez, S., Casquero,

- P. A., et al. (2017). Inhibitory activity of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma* spp. on the insect pests *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrisomelidae: Bruchinae). *Environ. Monit. Assess.* 189, 1-8. doi:10.1007/s10661-016-5719-z.
- Rolshausen, P. E., Akgül, D. S., Perez, R., Eskalen, A., y Gispert, C. (2013). First report of wood canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on grapevine in California. *Plant Dis.* 97, 1511-1511. doi:10.1094/PDIS-04-13-0451-PDN.
- Rolshausen, P. E., Baumgartner, K., Travadon, R., Fujiyoshi, P., Pouzoulet, J., y Wilcox, W. F. (2014). Identification of *Eutypa* spp. causing Eutypa dieback of grapevine in Eastern North America. *Plant Dis.* 98, 483-491. doi:10.1094/PDIS-08-13-0883-RE.
- Romanazzi, G., Murolo, S., Pizzichini, L., y Nardi, S. (2009). Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 125, 277-290. doi:10.1007/s10658-009-9481-8.
- Romero Carnicero, F., Sanz Mínguez, C., y Górriz Gañán, C. (2009). «El vino entre las élites vacceas. De los más antiguos testimonios a la consolidación de su consumo», en *El vino y el banquete en la Europa prerromana*, eds. C. Sanz Mínguez y F. Romero Carnicero (Valladolid: Vaccea Monografías 2. Centro de estudios Vacceos «Federico de Wattenberg» de la Universidad de Valladolid.), 225-250.
- Rooney-Latham, S., Eskalen, A., y Gubler, W. D. (2005). Occurrence of *Togninia minima* perithecia in esca-affected vineyards in California. *Plant Dis.* 89, 867-871. doi:10.1094/PD-89-0867.
- Rousseau, A., Benhamou, N., Chet, I., y Piché, Y. (1996). Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intradices* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 86, 434-443.
- Ruano-Rosa, D., Prieto, P., Rincón, A. M., Gómez-Rodríguez, M. V., Valderrama, R., Barroso, J. B., et al. (2016). Fate of *Trichoderma harzianum* in the olive rhizosphere: time course of the root colonization process and interaction with the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. *BioControl* 61, 269-282. doi:10.1007/s10526-015-9706-z.
- Rubio, J., y Garzón, E. (2011). Las enfermedades de la madera de vid como amenaza del sector vitícola. *Rev. Winetech* Noviembre, 18-21.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S. L., et al. (2009). Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 291-301. doi:10.1094/MPMI-22-3-0291.
- Russo, F., Ceci, A., Pinzari, F., Siciliano, A., Guida, M., Malusà, E., et al. (2019). Bioremediation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-contaminated agricultural soils: potential of two autochthonous saprotrophic fungal strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, 1-18. doi:10.1128/AEM.01720-19.
- Samolski, I., Rincón, A. M., Pinzón, L. M., Viterbo, A., y Monte, E. (2012). The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* 158, 129-138. doi:10.1099/mic.0.053140-0.
- Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100, 923-935. doi:10.1016/S0953-7562(96)80043-8.
- Sandoval-Denis, M., Sutton, D. A., Cano-Lira, J. F., Gené, J., Fothergill, A. W., Wiederhold, N. P., et al. (2014). Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2112-2125. doi:10.1128/JCM.00429-14.
- Santillán, D., Sotés, V., Iglesias, A., y Garrote, L. (2019). Adapting viticulture to climate change in the Mediterranean region: Evaluations accounting for spatial differences in the producers-climate interactions. *BIO Web Conf.* 12, 1-4. doi:10.1051/bioconf/20191201001.
- Santoyo, G., Hernández-Pacheco, C., Hernández-Salmerón, J., y Hernández-León, R. (2017). The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: Toward sustainable agriculture. A review. *Spanish J. Agric. Res.* 15, 1-15. doi:10.5424/sjar/2017151-9990.

- Savazzini, F., Longa, C. M. O., Pertot, I., y Gessler, C. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. *J. Microbiol. Methods* 73, 185-194. doi:10.1016/j.mimet.2008.02.004.
- Sawant, I. S., Wadkar, P. N., Ghule, S. B., Rajguru, Y. R., Salunkhe, V. P., y Sawant, S. D. (2017). Enhanced biological control of powdery mildew in vineyards by integrating a strain of *Trichoderma afroharzianum* with sulphur. *Biol. Control* 114, 133-143. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.08.011.
- Sawant, I. S., Wadkar, P. N., Ghule, S. B., Salunkhe, V. P., Chavan, V., y Sawant, S. D. (2020). Induction of systemic resistance in grapevines against powdery mildew by *Trichoderma asperelloides* strains. *Australas. Plant Pathol.* 49, 107-117. doi:10.1007/s13313-020-00679-8.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., et al. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4364-4370. doi:10.1128/aem.60.12.4364-4370.1994.
- Schubert, M., Fink, S., y Schwarze, F. W. M. R. (2008). Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biol. Control* 45, 111-123. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.001.
- Segarra, G., Casanova, E., Avilés, M., y Trillas, I. (2010). *Trichoderma asperellum* strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microb. Ecol.* 59, 141-149. doi:10.1007/s00248-009-9545-5.
- Serra, S., Mannoni, M. A., Ligios, V., y Fiori, P. P. (2011). Occurrence of *Phaeoconiella chlamydospora* on grapevine planting material in Sardinia and its control with combined hot water and cyproconazole treatments. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 61-76. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-2753.
- Sessitsch, A., Brader, G., Pfaffenbichler, N., Gusenbauer, D., y Mitter, B. (2018). The contribution of plant microbiota to economy growth. *Microb. Biotechnol.* 11, 801-805. doi:10.1111/1751-7915.13290.
- Sidoti, A., Buonocore, E., Serges, T., y Mugnai, L. (2000). Decline of young grapevines associated with *Phaeoacremonium chlamydosporum* in Sicily (Italy). *Phytopathol. Mediterr.* 39, 87-91. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-1533.
- Sieverding, E., Da Silva, G. A., Berndt, R., y Oehl, F. (2014). *Rhizoglosum*, a new genus of the *Glomeraceae*. *Mycotaxon* 129, 373-386. doi:10.5248/129.373.
- Sivasithamparam, K., y Ghisalberti, E. L. (1998). «Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*», en *Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics*, eds. C. P. Kubicek y G. E. Harman (London, United Kingdom: Taylor and Francis Ltd.), 139-191.
- Sivasithamparam, K., Marra, R., Nigro, M., Varlese, R., Vinale, F., Lanzuise, S., et al. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 347, 123-129. doi:10.1111/1574-6968.12231.
- Smart, R., y Robinson, M. (1991). *Sunlight into wine: a handbook for winegrape canopy management*. New Zealand.
- Songy, A., Fernandez, O., Clément, C., Larignon, P., y Fontaine, F. (2019). Grapevine trunk diseases under thermal and water stresses. *Planta* 249, 1655-1679. doi:10.1007/s00425-019-03111-8.
- Sparapano, L., Bruno, G., y Graniti, A. (2000). Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 169-177.
- Sparapano, L., Bruno, G., y Graniti, A. (2001). Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathol. Mediterr.* 40, 376-386. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-1643.

- Spies, C. F. J., Moyo, P., Halleen, F., y Mostert, L. (2018). *Phaeoacremonium* species diversity on woody hosts in the Western Cape Province of South Africa. *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 40, 26-62. doi:10.3767/persoonia.2018.40.02.
- Stempien, E., Pierron, R. J. G., Adendorff, I., Van Jaarsveld, W. J., Halleen, F., y Mostert, L. (2020). Host defence activation and root colonization of grapevine rootstocks by the biological control fungus *Trichoderma atroviride*. *Phytopathol. Mediterr.* 59, 615-626. doi:10.14601/Phyto-11137.
- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., et al. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *J. Pest Sci. (2004)*. 94, 665-676. doi:10.1007/s10340-021-01354-7.
- Sun, Q., Rost, T. L., y Matthews, M. A. (2008). Wound-induced vascular occlusions in *Vitis vinifera* (Vitaceae): Tyloses in summer and gels in winter. *Am. J. Bot.* 95, 1498-1505. doi:10.3732/ajb.0800061.
- Surico, G. (2009). Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 5-10. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-2870.
- Surico, G., Mugnai, L., y Marchi, G. (2006). Older and more recent observations on esca: A critical overview. *Phytopathol. Mediterr.* 45, 68-86. doi:10.14601/PHYTOPATHOL_MEDITERR-1847.
- Taylor, J. W. (2011). One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2, 113-120. doi:10.5598/imafungus.2011.02.02.01.
- Travadon, R., Lawrence, D. P., Rooney-Latham, S., Gubler, W. D., Wilcox, W. F., Rolshausen, P. E., et al. (2015). *Cadophora* species associated with wood-decay of grapevine in North America. *Fungal Biol.* 119, 53-66. doi:10.1016/j.funbio.2014.11.002.
- Travadon, R., Lecomte, P., Diarra, B., Lawrence, D. P., Renault, D., Ojeda, H., et al. (2016). Grapevine pruning systems and cultivars influence the diversity of wood-colonizing fungi. *Fungal Ecol.* 24, 82-93. doi:10.1016/j.funeco.2016.09.003.
- Trouillas, F. P., y Gubler, W. D. (2010). Pathogenicity of *Diatrypaceae* species in grapevines in California. *Plant Dis.* 94, 867-872. doi:10.1094/PDIS-94-7-0867.
- Unión Europea (2009). DIRECTIVA 2009/128/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 21 de octubre de 2009 por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas.
- Unión Europea (2018). REGLAMENTO (UE) 2018/848 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, de 30 de mayo de 2018, sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CE) n.o 834/2007 del Consejo.
- Urbez-Torres, J. R. (2011). The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 5-45. doi:10.1037/11335-006.
- Urbez-Torres, J. R., Haag, P., Bowen, P., Lowery, T., y O’Gorman, D. T. (2015). Development of a DNA macroarray for the detection and identification of fungal pathogens causing decline of young grapevines. *Phytopathology* 105, 1373-1388. doi:10.1094/PHYTO-03-15-0069-R.
- Úrbez-Torres, J. R., Haag, P., Bowen, P., y O’Gorman, D. T. (2014). Grapevine trunk diseases in British Columbia: Incidence and characterization of the fungal pathogens associated with black foot disease of grapevine. *Plant Dis.* 98, 456-468. doi:10.1094/PDIS-05-13-0524-RE.
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Smith, R. J., y Gubler, W. D. (2013). Phomopsis dieback: A grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Dis.* 97, 1571-1579. doi:10.1094/PDIS-11-12-1072-RE.
- Valtaud, C., Larignon, P., Roblin, G., y Fleurat-Lessard, P. (2009). Developmental and ultrastructural features of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in relation to xylem degradation in esca disease of the grapevine. *J. Plant Pathol.* 91, 37-51. doi:10.4454/jpp.v91i1.622.
- Van Emon, J. M. (2016). The Omics revolution in agricultural research. *J. Agric. Food Chem.* 64, 36-44. doi:10.1021/acs.jafc.5b04515.
- van Jaarsveld, W. J., Halleen, F., Bester, M. C., Pierron, R. J. G., Stempien, E., y Mostert, L. (2021).

- Investigation of *Trichoderma* species colonization of nursery grapevines for improved management of black foot disease. *Pest Manag. Sci.* 77, 397-405. doi:10.1002/ps.6030.
- van Leeuwen, C., y Darriet, P. (2016). The impact of climate change on viticulture and wine quality. *J. Wine Econ.* 11, 150-167. doi:10.1017/jwe.2015.21.
- Vasseur-Coronado, M., du Boulois, H. D., Pertot, I., y Puopolo, G. (2021). Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products. *Microbiol. Res.* 245, 1-10. doi:10.1016/j.micres.2020.126672.
- Vera Rodríguez, J. C., y Echevaría Sanchez, A. (2013). «Sistemas agrícolas del I milenio a.C. en el yacimiento de La Orden-Seminario de Huelva. Viticultura protohistórica a partir del análisis arqueológico de las huellas de cultivo», en *Patrimonio cultural de la vid y el vino. Vine and wine cultural heritage*, eds. S. Celestino Pérez y J. Blánquez Pérez (Madrid: UAM Ediciones), 95-106.
- Vicente, M. F., Cabello, A., Platas, G., Basilio, A., Díez, M. T., Dreikorn, S., et al. (2001). Antimicrobial activity of ergokonin A from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 806-813. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01447.x.
- Vinale, F., D Ambrosio, G., Abadi, K., Scala, F., Marra, R., Turra, D., et al. (2004). Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychlorid. *J. Zhejiang Univ.* 30, 2-8.
- Vinale, F., Flematti, G., Sivasithamparam, K., Lorito, M., Marra, R., Skelton, B. W., et al. (2009). Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. *J. Nat. Prod.* 72, 2032-2035. doi:10.1021/np900548p.
- Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Mazzei, P., Piccolo, A., Pascale, A., et al. (2014). A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. *Molecules* 19, 9760-9772. doi:10.3390/molecules19079760.
- Vinale, F., y Sivasithamparam, K. (2020). Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. *Phyther. Res.* 34, 2835-2842. doi:10.1002/ptr.6728.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., y Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1-10. doi:10.1016/j.soilbio.2007.07.002.
- Vinetur (2019). El vino en Castilla y León. *Vinetur. La Rev. Digit. del vino*, 1. Available at: <https://www.vinetur.com/2019022652589/el-vino-en-castilla-y-leon.html> [Accedido diciembre 8, 2021].
- Wallis, C. M. (2021). Nutritional niche overlap analysis as a method to identify potential biocontrol fungi against trunk pathogens. *BioControl* 66, 559-571. doi:10.1007/s10526-021-10091-w.
- WFO (2021). Vitaceae Juss. Available at: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-7000000639> [Accedido octubre 1, 2021].
- Whaspere, A. J., y Helm, K. F. (1987). Phylloxera and *Vitis*: an experimentally testable coevolutionary hypothesis. *Am. J. Enol. Vitic.*, 216-222.
- Whiting, E. C., Khan, A., y Gubler, W. D. (2001). Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Plant Dis.* 85, 195-201. doi:10.1094/pdis.2001.85.2.195.
- Woo, S. L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Harman, G. E., Kubicek, C. P., et al. (1999). Disruption of the *ech42* (Endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 419-429. doi:10.1094/MPMI.1999.12.5.419.
- Woo, S. L., Formisano, E., Fogliano, V., Cosenza, C., Mauro, A., Turra, D., et al. (2004). Factors that contribute to the mycoparasitism stimulus in *Trichoderma atroviride* strain P1. *J. Zhejiang Univ.* 30, 421.
- Woo, S. L., y Lorito, M. (2007). «Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol», en *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and*

- Management*, ed. Springer (Amsterdam), 107-130. doi:10.1007/978-1-4020-5799-1_6.
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., et al. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *Open Mycol. J.* 8, 71-126. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00337-2.
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., y Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96, 181-185. doi:10.1094/PHYTO-96-0181.
- Wu, Q., Ni, M., Wang, G., Liu, Q., Yu, M., y Tang, J. (2018). Omics for understanding the tolerant mechanism of *Trichoderma asperellum* TJ01 to organophosphorus pesticide dichlorvos. *BMC Genomics* 19, 1-12. doi:10.1186/s12864-018-4960-y.
- Yang, T., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., Jami, F., Abdollahzadeh, J., Lombard, L., et al. (2017). Families, genera, and species of *Botryosphaeriales*. *Fungal Biol.* 121, 322-346. doi:10.1016/j.funbio.2016.11.001.
- Ye, Q., Jia, J., Manawasinghe, I. S., Li, X., Zhang, W., Mugnai, L., et al. (2021). *Fomitiporia punicata* and *Phaeoacremonium minimum* associated with Esca complex of grapevine in China. *Phytopathol. Res.* 3, 1-17. doi:10.1186/s42483-021-00087-w.
- Ye, Q. T., Manawasinghe, I. S., Zhang, W., Mugnai, L., Hyde, K. D., Li, X. H., et al. (2020). First report of *Phaeoacremonium minimum* associated with grapevine trunk diseases in China. *Plant Dis.* 104, 3-7. doi:10.1094/PDIS-08-19-1649-PDN.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., y Chet, I. (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7343-7353. doi:10.1128/AEM.69.12.7343-7353.2003.
- Yuste Bombín, J. (2001). Sistema de conducción: técnica de cultivo en viticultura. *Vida Rural*, 26-32.
- Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., et al. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio* 6, 1-10. doi:10.1128/mBio.02527-14.
- Zeilinger, S., Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Kubicek, C. P., y Lorito, M. (2003). The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr. Genet.* 43, 289-295. doi:10.1007/s00294-003-0399-y.



Capítulo 3

Objetivos

3. Objetivos.

El gran potencial de los agentes de control biológico y la gran complejidad de los factores edafoclimáticos y de manejo que afectan a la agricultura, deja de relevancia la necesidad de profundizar en el estudio de las interacciones abióticas y bióticas respecto a los agentes de biocontrol, y así, hacer frente a las enfermedades de la madera de la vid de una manera más eficaz. Por tanto, el principal objetivo de esta tesis es la **obtención de aislados de *Trichoderma* spp. adaptados a las condiciones de manejo y edafoclimáticas de los viñedos de Castilla y León para el biocontrol de las enfermedades de la madera de la vid, en las que *Phaeoacremonium minimum*, como uno de los principales agentes etiológicos, se ha utilizado como hongo modelo** Los objetivos principales de esta tesis doctoral han sido los siguientes:

3.1. Prospección de viñedos para el aislamiento de *Trichoderma* spp. como potenciales agentes de biocontrol:

- ✓ Aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp. en viñedos de Castilla y León.
- ✓ Correlación de las condiciones de manejo de los viñedos en relación con las poblaciones silvestres de *Trichoderma* spp.

3.2. Evaluación de la capacidad antagonista de los aislados de *Trichoderma* spp.:

- ✓ Selección de cepas de *Trichoderma* spp. mediante ensayos *in vitro*.
- ✓ Identificación de los mecanismos de biocontrol frente a *Phaeoacremonium minimum*.

3.3. Inoculación de cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de las enfermedades de la madera de la vid:

- ✓ Establecimiento de la potencialidad de estas cepas para su posible escalado industrial.
- ✓ Estimación de la capacidad de colonización en heridas de poda en condiciones climáticas adversas.



Capítulo 4

Material y métodos

Índice de contenidos

4.1. PROSPECCIÓN DE VIÑEDOS PARA EL AISLAMIENTO DE <i>Trichoderma</i> spp. COMO POTENCIALES AGENTES DE BIOCONTROL	100
4.1.1. Material.....	100
4.1.2. Metodología.....	101
4.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE LOS AISLADOS DE <i>Trichoderma</i> spp.....	101
4.2.1. Material.....	101
4.2.2. Metodología.....	103
4.3. INOCULACIÓN DE CEPAS DE <i>Trichoderma</i> spp. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID	104
4.3.1. Material.....	104
4.3.2. Metodología.....	104
4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

La presente tesis doctoral se presenta en la modalidad por compendio de publicaciones por lo que los materiales y métodos se encuentran especificados en cada artículo. No obstante, a continuación, se exponen de forma general los materiales y métodos más relevantes para cada objetivo de esta tesis:

4.1. PROSPECCIÓN DE VIÑEDOS PARA EL AISLAMIENTO DE *Trichoderma* spp. COMO POTENCIALES AGENTES DE BIOCONTROL

4.1.1. Material.

- Se muestrearon 10 viñedos pertenecientes a 4 Denominaciones de Origen (D.O. León, D.O. Toro, D.O. Bierzo y D.O. Ribera del Duero) ubicadas en Castilla y León, con distinto tipo de manejo y edad de plantación.
- Tijeras de podar Kamikaze®.
- Bolsas de polietileno con cierre zip.
- Alcohol 70%.
- Refrigerador Liebherr.
- Guantes de nitrilo, Sanicen SA.
- Solución de hipoclorito de sodio.
- Incubadora JP Selecta.
- Escalpelo, asas de siembra con final en forma de aguja y pinzas quirúrgicas.
- Campana de flujo laminar Gelaire®.
- Medio de cultivo: rosa de bengala-cloranfenicol-agar (Conda Laboratory, Torrejón de Ardoz, Madrid, España).
- Medio de cultivo: patata-dextrosa-agar (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania).
- Placas de Petri de 90mm, Monolab S.n.c.
- Placas de Petri de 60 mm, Monolab S.n.c.
- Nucleospin plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemania).
- Nanodrop ND-1000 espectrofotómetro (Thermo Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos).
- Oligonucleóticos ITS4 e ITS5.

- kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CAL, Estado Unidos).
- Secuenciador de secuencias de ADN ABI3130xl (Applied Biosystems).

4.1.2. Metodología.

- Se recogieron muestras de la corteza con un tamaño 3x3 cm de las plantas de vid de los distintos viñedos. Se seleccionaron al azar distintas plantas de cada viñedo hasta un total de 15 muestras por parcela.
- Se procedió a su desinfección y sembrado (7 chips por cada muestra) en placas de RBCA (Rosa de Bengala-Cloranfenicol-Agar) en campana de flujo laminar, con el propósito de identificar los aislados de *Trichoderma* y proceder a su conteo. Se dejaron incubar en cámara de cultivo para su identificación.
- Aquellos hongos que se identificaron de forma visual como *Trichoderma*, se repicaron a placas de PDA (Patata-Dextrosa-Agar) para su identificación por microscopía y molecularmente. Así mismo, se calculó la abundancia de aislados de *Trichoderma* por cada parcela.
- Posteriormente, se realizó un análisis estadístico para evaluar la correlación existente entre la abundancia de *Trichoderma*, la edad del viñedo y la media del número de aplicaciones de fungicidas en cada parcela.
- El análisis estadístico se llevó a cabo con el software libre estadístico R.

4.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE LOS AISLADOS DE *Trichoderma* spp.

4.2.1. Material.

- Aislado de *P. minimum* Y-038-05-3a.
- Los 25 aislados de *Trichoderma* spp. recogidos de las parcelas donde se realizó la prospección del epígrafe anterior.
- Microscopio electrónico de barrido. Hitachi TM3030 device (Hitachi, Alemania).
- Microscopio confocal laser (Olympus Fluoview FV1000 con multi-line laser FV5-LAMAR-2 and HeNe(G)laser FV10-LAHEG230-2, Japón).

- Aislamiento de *Trichoderma* sp. T154.
- *P. minimum* CBS 100398.
- *P. minimum::gfp7* CBS 100398.
- Plásmido pBHt2-tdTom(Caasi et al., 2010).
- Medio de cultivo de puré de patata glucosa y agar (Puré de patata (Maggy®), Oxoid Ltd.)
- Placas de Petri de 90mm. Monolab S.n.c.
- Filtros estériles Nytal®(Maissa, Barcelona, España).
- Enzimas líticas (Enzimas líticas L-1412, Driselasa D-8037, Quitinasa C-6137, Sigma, Estados Unidos) .
- NaCl.
- Buffer STC (Tris HCl; sorbitol, y CaCl₂).
- PEG (Tris HCl; CaCl₂, Polietilenglicol 8000).
- Medio de regeneración (sucrosa; extracto de levadura, NZ-amina, y Bacto-agar).
- Método TERRA (PCR Direct polymerase mix. Clontech, Mountain View, CA, Estados Unidos).
- Medio de cultivo de patata dextrosa y agar (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania).
- Higromicina B (InvivoGen; San Diego, CA, Estados Unidos).
- Medio CM (extracto de malta, extracto de levadura y glucosa).
- Plantas de vid *Vitis vinífera* L. de 1 año de la variedad cv. Tempranillo e injertadas sobre el portainjerto Ritcher 110 . Vivai Cooperativi Rauscedo (Rauscedo, Italia)
- Parafilm ®.
- Taladro de mano BOSCH®.
- Fitotrón.
- Agua autoclavada.
- Tijeras de podar Kamikaze ®.
- Desinfectante Incidin™ (Ecolab, Reino Unido).
- Bolsas estériles de papel.
- Guantes de nitrilo Sanicen SA.
- Campana de flujo laminar Gelaire®.

4.2.2. Metodología.

- Inicialmente, se realizó un ensayo de confrontación dual entre los aislados de *Trichoderma* obtenidos de las 10 parcelas de Castilla y León y el patógeno *P. minimum* Y-038-05-3a. Se evaluaron distintas características de los aislados de *Trichoderma*: el porcentaje de inhibición del micelio de *P. minimum*, la esporulación sobre la placa de medio PDA, la esporulación sobre el patógeno y la producción del pigmento amarillo sobre el medio PDA. Se seleccionaron aquellas cepas que mostraron un porcentaje superior al 67% en todos los valores a evaluar.
- El aislamiento *Trichoderma* sp. T154 fue seleccionado y transformado mediante la técnica de protoplastos. Se introdujo el gen que es capaz de expresar la proteína roja fluorescente a partir del plásmido pBHt2-tdTom.
- El aislado de *Trichoderma* sp. T154::tdTom3 y el patógeno *P. minimum*::gfp7 fueron enfrentados en ensayo dual para evaluar los mecanismos de biocontrol por parte de *Trichoderma* mediante microscopía confocal y electrónica de barrido. Previamente, también fueron evaluados por separado utilizando ambas técnicas de microscopía así como los microorganismos no transformados (*Trichoderma* sp. T154 y *P. minimum* CBS 100398).
- Se inocularon las cepas objeto de estudio sobre heridas en madera de plantas de vid los siguientes microorganismos: *Trichoderma* sp. T154, *Trichoderma* sp. T154 ::tdTom3, *P. minimum* CBS 100398, *P. minimum* ::gfp7 y la combinación de *Trichoderma* sp. T154 ::tdTom3 y *P. minimum* ::gfp7, además de los controles negativos, sin ninguna inoculación de hongos. Se recogieron las plantas de vid tras 6 y 12 semanas después de la inoculación con los diferentes microorganismos. Finalmente, las muestras fueron evaluadas en microscopio confocal laser y en microscopio electrónico de barrido.

4.3. INOCULACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID

4.3.1. Material.

- Aislados de *Trichoderma* T065, T071, T154 y T214.
- Medio de cultivo: patata dextrosa y agar (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania).
- Placas de Petri de 90 mm. Monolab S.n.c.
- Incubadora JP Selecta.
- Campana de flujo laminar Gelaire®.
- Filtro de tela.
- Hematocitómetro, MARIENFIELD.
- Plantas de vid *Vitis vinífera* L. de 1 año de la variedad cv. Tempranillo e injertadas sobre el portainjerto Ritcher 110. Vivai Cooperativi Rauscedo (Rauscedo, Italia).
- Higrotermómetro.(Electrosón, Valladolid, España).
- Medio de cultivo: rosa de bengala cloranfenicol agar (Conda Laboratory, Torrejón de Ardoz, Madrid, España).
- Tijeras de podar Kamikaze®.
- Alcohol 70%.
- Pinzas quirúrgicas y asas de siembra con final en forma de aguja.

4.3.2. Metodología.

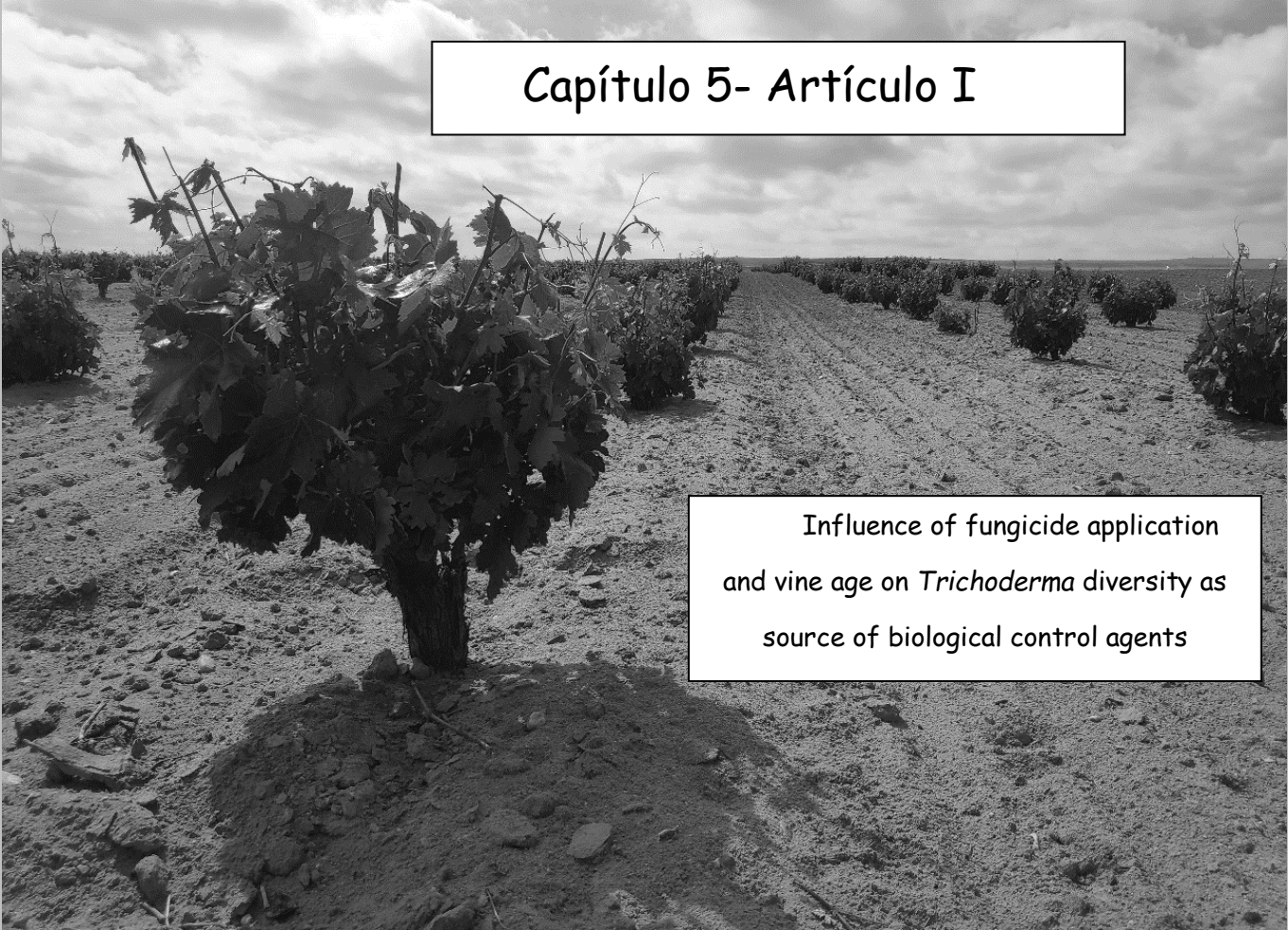
- Se utilizaron los aislados T065, T071, T154 y T214 de *Trichoderma* con 7 días de crecimiento del micelio en medio de cultivo PDA. Posteriormente, se colocaron discos del borde exterior del micelio de estas placas para crecer a 4°C, 15°C, 25°C y 35°C en medio de cultivo PDA. Se tomó como momento de referencia para ser evaluados el día en el que el primer aislado era capaz de cubrir la totalidad de la placa o en su defecto tras 6 semanas.
- Se recogieron las esporas de los aislados, crecidos como en se indica en el apartado anterior, y se inocularon a concentraciones de 2×10^6 y de 2×10^7 esporas/ml en placas de medio de cultivo PDA. Se incubaron a dos temperaturas (4°C y 15°C), y se

evaluaron el día en el que el primer aislado era capaz de cubrir la totalidad de la placa.

- Se evaluó la producción de esporas a 25°C mediante el raspado de la placa con un asa de siembra, posterior filtrado a través de filtro estéril y conteo por medio de hematocitómetro.
- Se seleccionaron las cepas T154 y T071 para ser inoculadas sobre heridas de poda de la planta de vid durante el periodo invernal. Posteriormente se recolectaron las plantas tras 12 semanas de la inoculación y después se cortaron en discos de madera a distintas distancias del punto de inoculación (0, 3, 6, 9, 12 y 15 cm). Finalmente, estos discos de madera se sembraron sobre medio RBCA en forma de chips para realizar un conteo y estimar la capacidad de permanencia sobre las heridas poda.

4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Caasi, O. C., Walker, N. R., Marek, S. M., Enis, J. N., y Mitchell, T. K. (2010). Infection and colonization of turf-type bermudagrass by *Ophiosphaerella herpotricha* expressing green or red fluorescent proteins. *Phytopathology* 100, 415-423. doi:10.1094/PHYTO-100-5-0415.



Capítulo 5- Artículo I

Influence of fungicide application
and vine age on *Trichoderma* diversity as
source of biological control agents

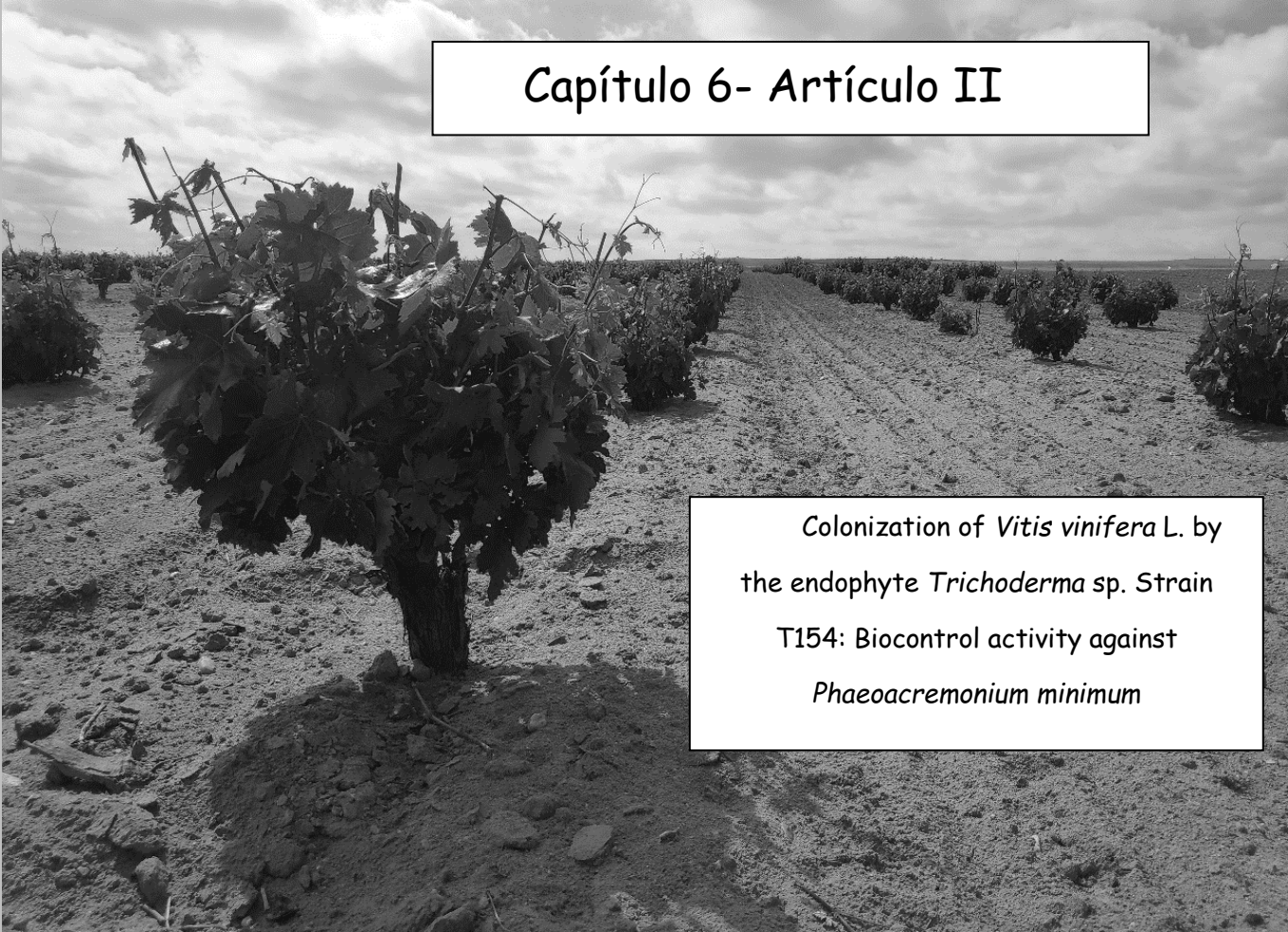
Tesis Doctoral por compendio de publicaciones

Influence of fungicide application and vine age on *Trichoderma* diversity as source of biological control agents.

Carro-Huerta, G.; Mayo-Prieto, S.; Rodríguez-González, Á.; González-López, Ó.; Gutierrez, S.; Casquero, P.A.

Agronomy **2021**, *11*, 1–16, <https://doi.org/10.3390/agronomy11030446>.





Capítulo 6- Artículo II

Colonization of *Vitis vinifera* L. by
the endophyte *Trichoderma* sp. Strain
T154: Biocontrol activity against
Phaeoacremonium minimum

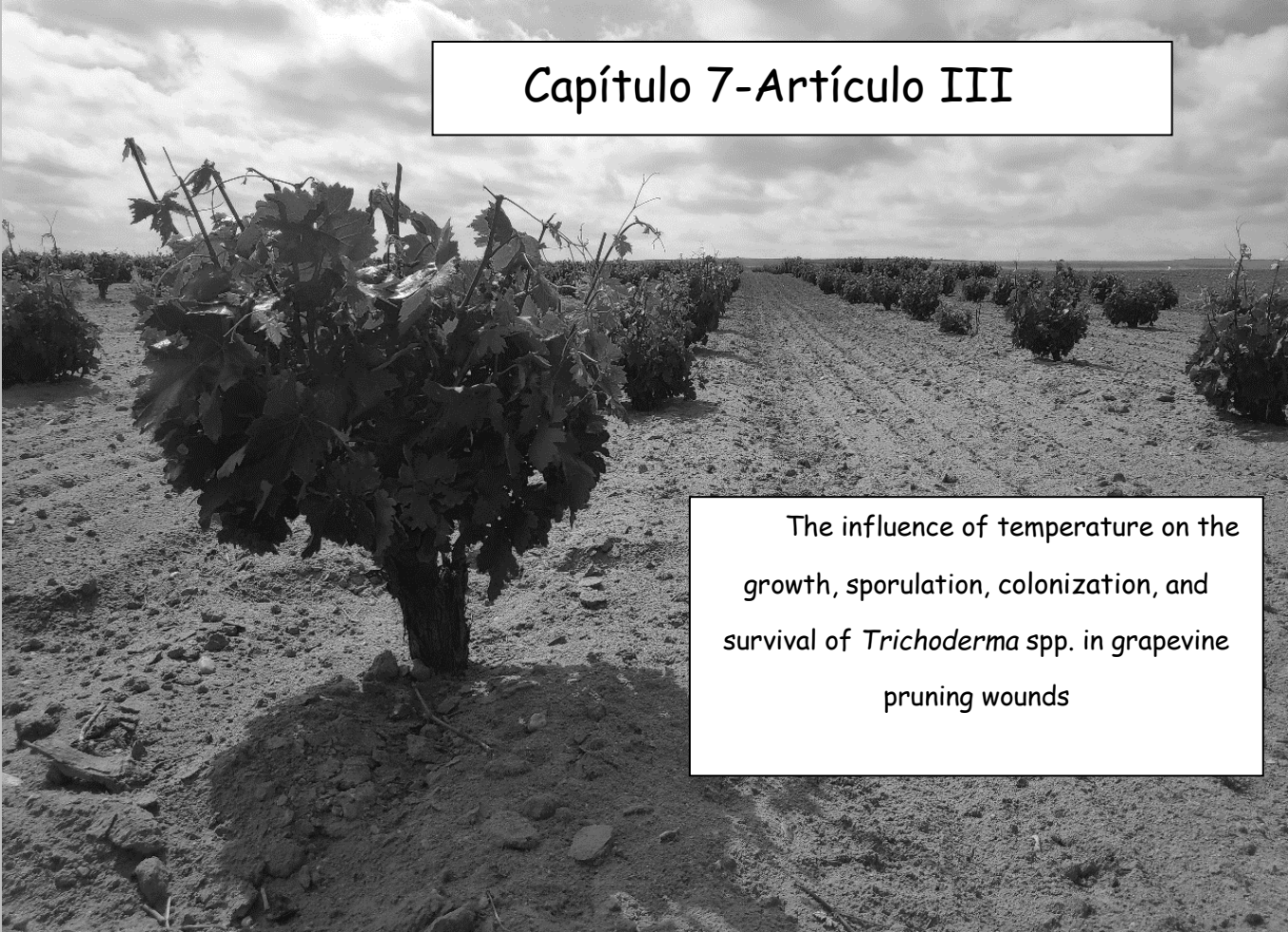
Tesis Doctoral por compendio de publicaciones

Colonization of *Vitis vinifera* L . by the endophyte *Trichoderma* sp . strain T154 :
biocontrol activity against *Phaeoacremonium minimum*.

Carro-Huerta, G.; Compant, S.; Gorfer, M.; Cardoza, R.E.; Schmoll, M.; Gutiérrez, S.; Casquero, P.A.

Front. Plant Sci. **2020**, *11*, 1–15, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01170>.





Capítulo 7-Artículo III

The influence of temperature on the growth, sporulation, colonization, and survival of *Trichoderma* spp. in grapevine pruning wounds

Tesis Doctoral por compendio de publicaciones

The influence of temperature on the growth, sporulation , colonization and survival of *Trichoderma* spp.in grapevine pruning wounds.

Carro-Huerta, G.; Mayo-Prieto, S.; Rodríguez-González, Á.;Álvarez-García S. .; Gutierrez, S.; Casquero, P.A.

Agronomy **2021**, *11*, 1–18, <https://doi.org/10.3390/agronomy11091771>.





Capítulo 8

Resultados y discusión

Índice de contenidos

8.1. PROSPECCIÓN DE VIÑEDOS PARA EL AISLAMIENTO DE <i>Trichoderma spp.</i> COMO POTENCIALES AGENTES DE BIOCONTROL	122
8.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE LOS AISLADOS DE <i>Trichoderma spp.</i>	124
8.3. INOCULACIÓN DE CEPAS DE <i>Trichoderma spp.</i> PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID	127
8.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

Esta sección cuenta con la exposición e interpretación de los resultados en cada uno de los artículos que componen la tesis. Por tanto, en este capítulo se expone un resumen de los resultados más relevantes, así como de información adicional que no aparece en las publicaciones.

8.1. PROSPECCIÓN DE VIÑEDOS PARA EL AISLAMIENTO DE *Trichoderma* spp. COMO POTENCIALES AGENTES DE BIOCONTROL

- En lo referente a las identificaciones de las poblaciones de *Trichoderma*, la identificación a nivel de género mediante la morfología y el uso de técnicas moleculares, en este caso la secuencia de la región ITS (*Internal transcribed spacers*), nos permite confirmar el género. Sin embargo, la especie no puede ser verificada con total fiabilidad conforme al nuevo criterio de identificación (Cai y Druzhinina, 2021). Este criterio propone que son necesarios al menos 3 diferentes regiones (ITS, RPB2 y *Tef1 α*) para su correcta descripción como especie. Otro estudio identificó las especies de nuevos aislados de *Trichoderma* mediante el uso de estas tres mismas regiones, consiguiendo una adecuada identificación en la mayoría de las especies (Úrbez-Torres et al., 2020).
- Relacionado con la abundancia de las poblaciones de *Trichoderma*, se han evaluado las poblaciones de *Trichoderma* existentes en diversos viñedos de Castilla y León y que se citan a continuación. Se identificaron 11 aislados de *Trichoderma* spp. en el viñedo 1; 2 aislados de *Trichoderma* spp. en el viñedo 2; 1 aislado de *Trichoderma* spp. en el viñedo 3; 4 aislados de *Trichoderma* spp. en el viñedo 4, 4 aislados de *Trichoderma* spp. en el viñedo 5, 1 aislado de *Trichoderma* spp. en el viñedo 6, ningún aislado de *Trichoderma* spp. en el viñedo 7; 3 aislados de *Trichoderma* spp. en el viñedo 8; 2 aislados de *Trichoderma* spp. en el viñedo 9 y 2 aislados de *Trichoderma* spp. en el viñedo 10.
- Establecimiento de correlaciones entre el manejo y las poblaciones de *Trichoderma*. Se han relacionado las poblaciones de *Trichoderma* spp. encontradas y el manejo del

mismo mediante un análisis de correlación de Pearson. En este caso, se evaluó la presencia de *Trichoderma* frente a la edad de establecimiento de la plantación y frente al número de tratamientos fungicidas de media por campaña. Se obtuvo una correlación positiva significativa (0,675, p valor= 0,032) entre la presencia de aislados de *Trichoderma* y la edad de los viñedos; así como una correlación negativa significativa (-0,883, p valor=0,000) entre la presencia de aislados de *Trichoderma* y la aplicación del número de fungicidas. Se puede encontrar en la literatura científica un gran número de estudios sobre el uso de *Trichoderma* tanto en condiciones *in vitro* como en campo (Mondello et al., 2018). También algunos autores describieron la influencia del manejo y el estado fenológico sobre las fluctuaciones de la presencia de microorganismos en el suelo del viñedo (López-Piñeiro et al., 2013) y otros caracterizaron la presencia de *Trichoderma* en la madera de la vid junto con otros microorganismos (Bruez et al., 2014, 2016). Pero, no se encuentra descrito en la bibliografía actual la influencia que tienen las condiciones del viñedo sobre la distribución de poblaciones naturales de *Trichoderma* en la madera de la planta de vid. Por tanto, se confirma, al igual que se ha descrito en publicaciones previas, que el manejo influye sobre la composición de los microorganismos que residen en la planta (Donnison et al., 2000; Pancher et al., 2012). Así como se evidencia la relación directa con la edad de las plantas de vid como se ha visto en otros microorganismos en el viñedo (Schreiner y Mihara, 2009).

8.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE LOS AISLADOS DE *Trichoderma spp.*

- Selección de los aislados con potencial capacidad de biocontrol. En este caso se han utilizado 25 aislados de *Trichoderma*. para evaluar su capacidad de antagonismo provenientes de los viñedos de Castilla y León, analizados en la prospección de campo del epígrafe anterior mediante ensayos *in vitro* de acuerdo a Hermosa *et al.*, 2000; Kotze *et al.*, 2011:
 - El patógeno *P. minimum* Y-038-05-3a fue utilizado para ser enfrentado a los aislados de *Trichoderma*. Esto es debido a su patogenicidad y virulencia frente a plantas de vid en Castilla y León (Martín, 2012). Este patógeno ha sido aislado en viñedos de Castilla y León, así como caracterizado y evaluado en otros ensayos por lo que nos permite utilizarlo como organismo modelo para las condiciones particulares de esta región (Martín *et al.*, 2012, 2014; Martín y Martín, 2013).
 - Se identificaron varios aislados de *Trichoderma* como potenciales agentes de control biológico. Los aislados T72, T74, T75, T77, T78, T105 de la DO León ; T79, T80, T82, T84 y T85 de la DO Toro, ninguno de la DO Bierzo y el aislado T154 de la DO Ribera del Duero obtuvieron un valor de inhibición del crecimiento del micelio del patógeno superior al 67%. Los aislados T79 y T154 obtuvieron un valor máximo de esporulación sobre la placa de PDA seguido por T075. También T84 presentó un 67% de valor en esporulación sobre placa. En el caso de esporulación sobre el patógeno, se obtuvo un valor del 67% en los aislados T75, T79, T84 y T154. Por lo que se refiere a la producción de compuesto amarillo sobre el medio destacó el aislado T106. Finalmente se seleccionaron como potenciales agentes de biocontrol T75, T79, T84 y T154. Se concluyó que este procedimiento es de vital importancia para seleccionar de manera exitosa los agentes de biocontrol frente a los patógenos de enfermedades de la madera de la vid (Úrbez-Torres *et al.*, 2020; Van Jaarsveld *et al.*, 2020; Silva-Valderrama *et al.*, 2021).

- La evaluación de los mecanismos de biocontrol.
 - El aislado *Trichoderma* T154 fue seleccionado para evaluar el tipo de mecanismo de biocontrol que utiliza preferentemente. Esta cepa fue transformada mediante la técnica de protoplastos con el objetivo de expresar la proteína roja del plásmido pBHt2-tdTom (Cardoza et al., 2006). Con este objetivo, se seleccionó el transformante *Trichoderma* sp. T154::tdTom3. Posteriormente, se visualizó al microscopio confocal láser y al microscopio electrónico de barrido identificando las estructuras típicas de *Trichoderma* (Rifai, 1969). También se realizó una primera identificación a nivel molecular usando la secuencia nucleotídica de la región ITS, y a continuación se analizaron las secuencias de 6 genes constitutivos: *act1*, *cal1*, *fas1*, *lcb2*, *rpb2* y *tef1a*. Se concluyó que *Trichoderma* T154 pertenece al Clado *Harzianum/Virens* de acuerdo a la más reciente clasificación (Kubicek et al., 2019).
 - Se utilizaron los aislados *P. minimum* CBS 100398 y *P. minimum*::gfp7 para evaluar los mecanismos de biocontrol. Fueron seleccionados debido a su probada capacidad de colonización de los haces vasculares de la planta (Pierron et al., 2015). Estos microorganismos fueron visualizados mediante microscopio electrónico de barrido y microscopio confocal láser para identificar las estructuras típicas de *Phaeacremonium*. Se confirmó que poseen fiálides del tipo II, elongadas-ampuliformes y atenuadas en la base y que se estrechan hacia el ápice (Crous et al., 1996; Mostert et al., 2005).
 - Evaluación de los mecanismos de biocontrol en ensayos *in vitro* de confrontación dual. *Trichoderma* sp. T154::tdTom3 y *P. minimum*::gfp7 se enfrentaron en placas de PDA, observándose un sobrecrecimiento por parte de *Trichoderma*, distinguiéndose tres regiones. En la parte superior, *Trichoderma* ha sobrecrecido al patógeno y exhibe un gran crecimiento de micelio. En la segunda parte, descendiendo físicamente hacia la parte basal

de la placa, existe una fuerte interacción entre ambos y la parte última donde *Trichoderma* está empezando a colonizar las hifas del patógeno y existe una menor cantidad de micelio del agente de biocontrol. Principalmente, *Trichoderma* sp. T154 es capaz de esporular, así como de localizar el micelio del patógeno y colocar sus hifas de forma paralela. No se visualizaron las típicas estructuras de apresorio ni el enrollamiento característico de otras cepas de *Trichoderma* (Mukherjee et al., 2013).

- Evaluación de los mecanismos de biocontrol en planta de vid. Aunque se ha descrito sobre la planta de vid el comportamiento de *Trichoderma* frente a otros patógenos causantes de las EMV (Mutawila et al., 2011b) y se han estudiado los nichos de colonización por parte de *P. minimum* en estaquillas de vid (Pierron et al., 2015), el modo de acción sobre la planta de vid de una especie de *Trichoderma* frente a *P. minimum* no se había identificado hasta el momento. Por tanto, los principales mecanismos utilizados por *Trichoderma* y *P. minimum* sobre la planta de vid se describen a continuación. En el control negativo (sin inoculación de hongos) no se observaron diferencias ni modificaciones estructurales de la planta respecto al resto de tratamientos. En los dos controles positivos (*Trichoderma* sp. T154 inoculado sólo y *P. minimum* CBS100398 inoculado solo) tampoco se identificaron diferencias con respecto a las inoculaciones con los hongos transformantes. Para la evaluación de los distintos tratamientos se evaluó su persistencia tras 6 semanas y tras 12 semanas. Tras 6 semanas, mediante el uso de microscopio confocal láser, *Trichoderma* sp. T154::*tdTom3*, *P. minimum*::*gfp7* y la inoculación de ambos, se determinó que en el caso de *Trichoderma* sp. T154::*tdTom3* inoculado solo, se encontró un gran número de esporas sólo alrededor del punto de inoculación y una menor cantidad de hifas. El patógeno *P. minimum*::*gfp7* en el tipo de inoculación simple, fue encontrado cerca del punto de inoculación con una gran cantidad de micelio así como colonizando tejidos vivos, principalmente vasos del xilema. En el caso de la inoculación conjunta, los tejidos eran mayoritariamente colonizados por hifas y esporas de *Trichoderma*, y en algunas zonas era posible identificar el micelio del patógeno. Así mismo, se

utilizó el microscopio confocal laser y el microscopio electrónico de barrido para identificar en la misma imagen el comportamiento de ambos microorganismos. Se pudo visualizar que *Trichoderma* sp. T154::*tdTom3* colonizaba las células parenquimáticas sin afectar al flujo de savia, así como de colocarse paralelo a los haces vasculares del xilema sin obstruirlos. Mientras que el patógeno *P. minimum*::*gfp7* colonizaba fibras del xilema y otros tejidos muertos. Tras 12 semanas, se repitió el mismo procedimiento, resultando en que en el caso de la inoculación de *Trichoderma* sp. T154::*tdTom3* la colonización por parte del micelio fue escasa y se visualizó un gran número de esporas cerca de la herida. En la evaluación de *P. minimum*::*gfp7*, se observó la colonización de xilema, fibras de madera y tejido parenquimático en tejidos muertos cerca de la herida de poda. En la visualización de la inoculación dual de ambos microorganismos se observaron algunas pocas hifas de *P. minimum*::*gfp7* y principalmente esporas de *Trichoderma* sp. T154::*tdTom3* y alguna hifa en tejidos del xilema. No se realizó una visualización mediante microscopio electrónico de barrido debido a que no se observó una interacción clara entre ambos hongos dentro de la planta tras 12 semanas.

8.3. INOCULACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID

- Efecto de la temperatura en estudios *in vitro*. A la hora de seleccionar un microorganismo potencialmente comercializable, es importante realizar un adecuado diseño del procedimiento de selección (Vasseur-Coronado et al., 2021). Por ello, previo a su ensayo en condiciones de campo, se evalúan diferentes parámetros de crecimiento con el fin de encontrar la cepa que pueda colonizar más rápido la herida de poda:
 - Evaluación del crecimiento en placa a partir de un disco de micelio. A 4°C el aislado T71 mostró un crecimiento significativamente mayor al resto.

A 15°C, los aislados T65, T71 y T214 mostraron mayores crecimientos sin diferencias significativas entre ellos. A 25°C todas las cepas mostraron la mayor velocidad de crecimiento y no tuvieron diferencias significativas. El crecimiento a 35°C el aislado T154 mostró mayor capacidad de crecimiento con respecto al resto. Los resultados de los crecimientos en condiciones *in vitro* se correlacionaron fuertemente con la cepa en estudio y con tendencias marcadas con respecto al linaje (Clado o Sección) a la que pertenecen.

- Evaluación del crecimiento en placa a partir de esporas. A 4°C no se apreció crecimiento de ninguno de los aislados. A los 15°C hubo una fase de latencia de dos días para todos los aislados y a la concentración de 2×10^6 esporas/mL los aislados T065 y T071 mostraron un crecimiento significativamente mayor. En la concentración 2×10^7 esporas/mL T071 mostró un crecimiento significativamente mayor con respecto al resto. Se seleccionaron estas dos concentraciones ya que son los rangos habituales en la aplicación de aislados de *Trichoderma* si se compara con otros estudios (Di Marco et al., 2004; Kotze et al., 2011; Mutawila et al., 2011a; Pertot et al., 2016). Así mismo, no se observaron tampoco diferencias significativas al comparar el mismo aislado a distintas concentraciones. Este ensayo se realizó en condiciones de bajas temperaturas (4°C y 15°C) con el fin de imitar las condiciones reales de inoculación durante el invierno y poder observar una respuesta similar a lo que sucede en campo.
- Relativo a la identificación de los aislados. En artículos previos se había clasificado al aislado T071 como perteneciente a la Sección *Trichoderma* (Rodríguez-González et al., 2018) y al aislado T154 como perteneciente al Clado *Harzianum/Virens* (Capítulo 6). En la presente tesis doctoral se realizó una primera identificación a nivel molecular usando la región ITS, y a continuación se usaron las regiones de 6 genes constitutivos son: *act1*, *cal1*, *fas1*, *lcb2*, *rpb2* y *tef1 α* . Como resultado del análisis se concluyó que *Trichoderma* T065 pertenece a la Sección *Trichoderma* y *Trichoderma* T214

pertenece al Clado *Harzianum/Virens* de acuerdo a la más reciente clasificación (Kubicek et al., 2019).

- Grado de esporulación de los aislados ensayados. Un parámetro importante es la capacidad en la esporulación, ya que todos los microorganismos comercializables se presentan como formulados en esporas (Woo et al., 2014). Se determinó que el aislado T154 fue el que mayor número de esporas era capaz de producir a 25°C.
- Ensayo en condiciones de semicampo. Si se tiene en consideración el gran efecto que va a tener la variación de las temperaturas (Masson-Delmonte et al., 2021) debido al cambio climático, así como el concepto *One health* a la hora de aplicar cualquier microorganismo en el medio ambiente (American Veterinary Medical Association, 2008). Se debe definir el rango de temperaturas que es capaz de soportar la cepa y la concentración óptima de inoculación que no ponga en riesgo la salud de los ecosistemas. Por lo que se decidió inocular a una concentración de 2×10^6 esporas/mL las cepas T71 y T154. Así mismo, se utilizar la concentración 2×10^7 esporas/mL del aislado T154 con el fin de comprobar si los resultados eran consistentes tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones de semicampo. Adicionalmente, se realizó el ensayo en condiciones de cambio climático simulado.
 - Efecto de las condiciones ambientales en el ensayo de semicampo. La caracterización de las condiciones climáticas es un efecto de gran importancia para el desarrollo de *Trichoderma* (Kredics et al., 2003). Con el fin de simular las condiciones de cambio climático, las condiciones de temperatura en el lugar del ensayo tuvieron un valor medio superior a 4,06°C y las condiciones de humedad relativa fueron del 27,03 % inferior respecto a la registrada en la estación meteorológica. Por lo que este ensayo se adecuó a futuras posibles condiciones de cambio climático adverso en la que las temperaturas tienen previsión de aumentar (Malheiro et al., 2010), así como del efecto de la humedad relativa que pueda afectar a la capacidad de biocontrol (Fedele et al., 2020).

- Capacidad de colonización de heridas de poda en plantas de vid en el ensayo de semicampo. Tras 12 semanas, el grado de colonización de la herida de poda fue del 89,57% para la cepa T154 a una concentración de 2×10^6 esporas/mL. Este valor fue significativamente mayor con respecto a la cepa T71 para la que se obtuvo un valor de 70,31% a una concentración de 2×10^6 esporas/mL. Las cepas de *Trichoderma* no fueron aisladas más allá de la herida de poda y la aplicación de la cepa T154 a una concentración de 2×10^7 esporas/mL no mostró diferencias significativas con respecto a la inoculación de 2×10^6 esporas/mL. Este resultado confirma los valores obtenidos en el ensayo *in vitro* donde tampoco se encontraron diferencias en placa, lo que nos permitió validar este método. Estos porcentajes de re-aislamiento se encontraron entre los valores más altos de colonización de heridas de poda al compararse con otros estudios (Kotze et al., 2011; Mutawila et al., 2011a, 2015). La inoculación siguió las indicaciones descritas por Mutawila et al., 2016 con el fin de optimizar el proceso de colonización.

8.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Veterinary Medical Association (2008). One health: A new professional imperative. *One Heal. Initiat. Task Force Final Rep.*, 76. Available at: https://www.avma.org/KB/Resources/Reports/Documents/onehealth_final.pdf.
- Bruez, E., Baumgartner, K., Bastien, S., Travadon, R., Guérin-Dubrana, L., y Rey, P. (2016). Various fungal communities colonise the functional wood tissues of old grapevines externally free from grapevine trunk disease symptoms. *Aust. J. Grape Wine Res.* 22, 288-295. doi:10.1111/ajgw.12209.
- Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J. P., Guerin-Dubrana, L., et al. (2014). Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. *PLoS One* 9, 1-15. doi:10.1371/journal.pone.0095928.
- Cai, F., y Druzhinina, I. S. (2021). In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Divers.* 107, 1-69. doi:10.1007/s13225-020-00464-4.
- Cardoza, R. E., Vizcaino, J. A., Hermosa, M. R., Monte, E., y Gutiérrez, S. (2006). A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and *Agrobacterium*-mediated transformation. *J. Microbiol.* 44, 383-395.
- Crous, P. W., Gams, W., Wingfield, M. J., y Van Wyk, P. S. (1996). *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with with and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia* 88, 786-796. doi:10.2307/3760973.
- Di Marco, S., Osti, F., y Cesari, A. (2004). Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 108–115. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-1730.
- Donnison, L. M., Griffith, G. S., Hedger, J., Hobbs, P. J., y Bardgett, R. D. (2000). Management influences on soil microbial communities and their function in botanically diverse haymeadows of northern England and Wales. *Soil Biol. Biochem.* 32, 253-263. doi:10.1016/S0038-0717(99)00159-5.
- Fedele, G., Brischetto, C., y Rossi, V. (2020). Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grape berries as influenced by temperature and humidity. *Front. Plant Sci.* 11, 1-11. doi:10.3389/fpls.2020.01232.
- Hermosa, M., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Díaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E., et al. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1890-1898. doi:10.1128/AEM.66.5.1890-1898.2000.
- Kotze, C., Van Niekerk, J., Mostert, L., Halleen, F., Fourie, P., Van Niekerk, J., et al. (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk

-
- pathogen infection. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 247-263. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-8960.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., y Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 37-42.
- Kubicek, C. P., Steindorff, A. S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., et al. (2019). Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC Genomics* 20, 1-24. doi:10.1186/s12864-019-5680-7.
- López-Piñeiro, A., Muñoz, A., Zamora, E., y Ramírez, M. (2013). Influence of the management regime and phenological state of the vines on the physicochemical properties and the seasonal fluctuations of the microorganisms in a vineyard soil under semi-arid conditions. *Soil Tillage Res.* 126, 119-126. doi:10.1016/j.still.2012.09.007.
- Malheiro, A. C., Santos, J. A., Fraga, H., y Pinto, J. G. (2010). Climate change scenarios applied to viticultural zoning in Europe. *Clim. Res.* 43, 163-177. doi:10.3354/cr00918.
- Martín, L. (2012). Caracterización molecular, fenotípica, patogénica y medios de control de *Phaeoacremonium aleophilum* y otros hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León. en (Tesis doctoral. Universidad de León. León.), 319.
- Martín, L., y Martín, M. T. (2013). Characterization of fungicide resistant isolates of *Phaeoacremonium aleophilum* infecting grapevines in Spain. *Crop Prot.* 52, 141-150. doi:10.1016/j.cropro.2013.05.023.
- Martín, L., Sáenz de Miera, L. E., y Martín, M. T. (2014). AFLP and RAPD characterization of *Phaeoacremonium aleophilum* associated with vitis vinifera decline in Spain. *J. Phytopathol.* 162, 245-257. doi:10.1111/jph.12180.
- Martín, M. T., Cobos, R., Martín, L., y López-Enríquez, L. (2012). Real-time PCR detection of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3985-3991. doi:10.1128/AEM.07360-11.
- Masson-Delmonte, V., Zhai, P., Pirani, A., Connors, S., Péan, C., Berger, S., et al. (2021). IPCC, 2021: climate change 2021: The physical science basis. contribution of working group I to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. In press. Cambridge University Press.
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., et al. (2018). Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Dis.* 102, 1189-1217. doi:10.1094/PDIS-08-17-1181-FE.
- Mostert, L., Groenewald, J. Z., Summerbell, R. C., Robert, V., Sutton, D. A., Padhye, A. A., et al.

- (2005). Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1752-1767. doi:10.1128/JCM.43.4.1752-1767.2005.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. a, Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., y Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 105-129. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102353.
- Mutawila, C., Fourie, P. H., Halleen, F., y Mostert, L. (2011a). Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 264-276. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-8981.
- Mutawila, C., Fourie, P. H., Halleen, F., y Mostert, L. (2011b). Histo-pathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 46-60. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-8643.
- Mutawila, C., Halleen, F., y 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. doi:10.1007/s10526-014-9647-y.
- Mutawila, C., Halleen, F., y Mostert, L. (2016). Optimisation of time of application of *Trichoderma* biocontrol agents for protection of grapevine pruning wounds. *Aust. J. Grape Wine Res.* 22, 279-287. doi:10.1111/ajgw.12218.
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M. O., Yousaf, S., Pertot, I., et al. (2012). Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4308-4317. doi:10.1128/AEM.07655-11.
- Pertot, I., Prodorutti, D., Colombini, A., y 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. doi:10.1007/s10526-016-9723-6.
- Pierron, R., Gorfer, M., Berger, H., Jacques, A., Sessitsch, A., Strauss, J., et al. (2015). Deciphering the niches of colonisation of *Vitis vinifera* L. by the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum* using a gfp marked strain and cutting systems. *PLoS One* 10, 1-22. doi:10.1371/journal.pone.0126851.
- Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116, 1-56.
- Rodríguez-González, Á., Carro-Huerga, G., Mayo-Prieto, S., Lorenzana, A., Gutiérrez, S., Peláez, H. J., et al. (2018). Investigations of *Trichoderma* spp. and *Beauveria bassiana* as biological control agent for *Xylotrechus arvicola*, a major insect pest in Spanish vineyards. *J. Econ. Entomol.* 111, 2585-2591. doi:10.1093/jee/toy256.

- Schreiner, R. P., y Mihara, K. L. (2009). The diversity of arbuscular mycorrhizal fungi amplified from grapevine roots (*Vitis vinifera* L .) in Oregon vineyards is seasonally stable and influenced by soil and vine age. *Mycologia* 101, 599-611. doi:10.3852/08-169.
- Silva-Valderrama, I., Toapanta, D., Miccono, M. de los A., Lolas, M., Díaz, G. A., Cantu, D., et al. (2021). Biocontrol potential of grapevine endophytic and rhizospheric fungi against trunk pathogens. *Front. Microbiol.* 11, 1-13. doi:10.3389/fmicb.2020.614620.
- Úrbez-Torres, J. R., Tomaselli, E., Pollard-Flamand, J., BoulÉ, J., Gerin, D., y Pollastro, S. (2020). Characterization of *Trichoderma* isolates from southern Italy, and their potential biocontrol activity against grapevine trunk disease fungi. *Phytopathol. Mediterr.* 59, 425-439. doi:10.14601/Phyto-11273.
- Van Jaarsveld, W. J., Halleen, F., y Mostert, L. (2020). *In vitro* screening of *Trichoderma* isolates for biocontrol of black foot disease pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 59, 465-471. doi:10.14601/Phyto-11173.
- Vasseur-Coronado, M., du Boulois, H. D., Pertot, I., y Puopolo, G. (2021). Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products. *Microbiol. Res.* 245, 1-10. doi:10.1016/j.micres.2020.126672.
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., et al. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *Open Mycol. J.* 8, 71-126. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00337-2.



Capítulo 9

Trabajos relacionados y
perspectivas futuras

Índice de contenidos

9.1. TRABAJOS RELACIONADOS COMO CO-AUTOR.....	138
9.2. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	139

El desarrollo de la presente tesis doctoral ha permitido la publicación y el desarrollo de diferentes vías de investigación en el seno del grupo de investigación GUIIAS (Grupo Universitario de Ingeniería y Agricultura Sostenible) de la Universidad de León.

9.1. TRABAJOS RELACIONADOS COMO CO-AUTOR.

- El aislamiento T071 utilizado en esta tesis (Capítulo 7), permitió la publicación de su acción como agente de biocontrol frente al insecto plaga *Xylotrechus arvicola* (Rodríguez-González et al., 2018a).
- El estudio de la producción de metabolitos secundarios y su acción antibiótica permitió la publicación de dos artículos. El uso de un tipo de metabolito secundario denominado trichodieno para evaluar su acción insecticida (Rodríguez-González et al., 2018b), así como el uso de nuevas metodologías para la evaluación de compuestos volátiles emitidos por *Trichoderma* (Álvarez-García et al., 2021).
- La evaluación de la influencia de los factores edafológicos en el desarrollo de *Trichoderma* dio lugar a la publicación de Mayo-Prieto et al., 2021.

9.2. PERSPECTIVAS FUTURAS.

- Actualmente se está evaluando la capacidad de colonización del aislado T071 como agente de biocontrol en el sistema radicular de las plantas de vid y su relación con la microbiota existente en distintos viñedos.
- También se está evaluando la capacidad de los aislados provenientes de suelos de parcelas analizadas en el Capítulo 5 y la capacidad de producción de metabolitos secundarios frente a *Phaeoacremonium minimum*, así como su relación con los factores edafológicos.
- Por otro lado, se han secuenciado los genomas de las cepas del Capítulo 7 y el genoma del patógeno, por lo que se están realizando estudios para la identificación de los clústeres de genes del metabolismo secundario y explorar la posibilidad de utilizar estas cepas y/o sus productos génicos como agentes de biocontrol, así como el estudio de rutas biosintéticas de interés.
- La aplicación de una cepa autóctona de *Trichoderma* derivada del trabajo de esta tesis doctoral en suelos vitícolas ha permitido el desarrollo del proyecto *TrichoBIOme*, en el que se estudia la influencia de la microbiota del suelo, los factores edáficos y el manejo del viñedo en su desarrollo. Este proyecto se encuentra enmarcado dentro de la acción internacional *Fieldsforever* de la compañía estadounidense “Biome makers”.
- La capacidad de asimilación de los nutrientes por parte del patógeno *Phaeoacremonium minimum* es otra línea de estudio que se está llevando a cabo en la actualidad con el fin de evaluar su capacidad de movilizar las macromoléculas esenciales y su relación con su crecimiento en diferentes medios de cultivo.



Capítulo 10

Conclusiones

10. Conclusiones.

10.1. PROSPECCIÓN DE VIÑEDOS PARA EL AISLAMIENTO DE *Trichoderma* spp. COMO POTENCIALES AGENTES DE BIOCONTROL.

- Se verificó la eficacia del método de aislamiento de cepas del género de *Trichoderma* basado en la colección de corteza de planta de vid, desinfección con hipoclorito de sodio, secado en campana de flujo laminar y posterior cultivo en rosa de bengala-cloranfenicol-agar, con selección basada en caracteres de cultivo, identificación morfológica y molecular.
- Se demostró que un menor número de tratamientos fungicidas por campaña y una mayor edad de las plantas de vid favorecían las poblaciones naturales de *Trichoderma* en la corteza de la planta de vid.

10.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE LOS AISLADOS DE *Trichoderma* spp.

- Las cepas autóctonas de *Trichoderma* aisladas de viñedos tenían actividad de control biológico *in vitro*, destacando los aislados T75, T79, T84 y T154 por su alto potencial de biocontrol.
- En condiciones *in vitro*, se identificó como principal mecanismo de acción el micoparasitismo, consistente en la adhesión de hifas de *Trichoderma* y del patógeno de forma paralela y la esporulación. Este tipo de interacción era llevado a cabo por la cepa *Trichoderma* sp. T154 frente a *P. minimum*, y fue observado por microscopía confocal y de barrido electrónico.
- En planta de vid, el principal mecanismo de acción es la exclusión del nicho de colonización. Este mecanismo se puso de manifiesto en la cepa *Trichoderma* sp. T154 frente a *P. minimum* mediante microscopía confocal y de barrido electrónico.

- El aislamiento *Trichoderma* sp. T154 fue capaz de permanecer sobre las heridas de poda y establecerse en el sistema vascular sin causar daños a la planta.

10.3. INOCULACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES DE LA MADERA DE LA VID

- La cepa autóctona *Trichoderma* sp. T154, que presentó una elevada capacidad de esporulación a 25°C, es un microorganismo adecuado para su escalado industrial.
- La filogenia de los aislados de *Trichoderma* aislados en Castilla y León se correlacionó con su capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas. Los aislados de *Trichoderma* spp. pertenecientes al Clado *Harzianum/Virens*, autóctonos de viñedos mostraron mayor crecimiento a altas temperaturas (35°C), mientras que los aislados que pertenecían a la Sección *Trichoderma* mostraron mayor crecimiento a temperaturas bajas (4°C y 15°C).
- La cepa autóctona *Trichoderma* sp. T154 (aislada de corteza de vid) colonizaba mejor las heridas de poda que la cepa *Trichoderma gamsii* T71 (aislada de muestra de suelo) poniendo de manifiesto la importancia de la procedencia del aislado.
- La cepa autóctona *Trichoderma* sp. T154 inoculada sobre planta de vid mostró una alta capacidad de colonización y supervivencia en heridas de poda siendo capaz de adaptarse al aumento de temperaturas, lo que le da mayores posibilidades de éxito para su inoculación en el contexto de cambio climático en base al criterio *One health*.



Capítulo 11

Conclusions

11. Conclusions.

11.1. Prospecting of vineyards for isolation of *Trichoderma* spp. as potential biological control agents.

- The method for isolation of *Trichoderma* from bark of vine plants implemented in this thesis was based on disinfecting chips of bark using sodium hypochlorite, drying out in laminar hood and sowing them in rose bengale chloranfenicol agar. Finally, new strains were identified based on cultivation characters, morphology, and molecular identification.
- It was demonstrated that the lesser is the number of fungicide application per campaign and the older are vine plants, the highest is the probability of isolate *Trichoderma* spp. strains from bark of vine plant.

11.2. Evaluation of antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. isolates.

- Autochthonous strains isolated from vineyard show *in vitro* biocontrol activity. T75, T79, T84 and T154 were selected in base to their highest biocontrol potential.
- Mycoparasitism was the main biocontrol mechanism detected in *Trichoderma* sp. T154 against *Phaeoacremonium minimum* interactions, which was determined using confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy on *in vitro* assays.
- Niche exclusion was the main mechanism identified in *Trichoderma* sp. T154 against *Phaeoacremonium minimum* interactions, as determined using confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy during *in planta* assays.

- *Trichoderma* sp. T154 was able to remain over pruning wounds up to 12 weeks without causing side effects or damages to the plant tissues after using confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy.

11.3. Inoculation of *Trichoderma* spp. strains for biological control of grapevine trunk diseases

- The autochthonous strain *Trichoderma* sp. T154 exhibited a higher capacity of sporulation at 25°C among those strains analysed, indicating that this strain would have good conditions for further applications at industrial scale.
- Autochthonous isolates from vineyard of *Trichoderma* spp. that belong to *Harzianum/Virens* Clade showed a higher growing at higher temperatures (35°C) whereas isolates classified into *Trichoderma* section were able to grow at lower temperatures (4°C y 15°C). This would indicate a correlation between the phylogenetic location of the *Trichoderma* strains isolated in Castilla y León and their capacity of growing at different temperatures.
- The autochthonous strain *Trichoderma* sp. T154 (isolated from bark of vine plant) performed a higher degree of colonization over pruning wounds than *Trichoderma gamsii* T71 (isolated from soil sample). Thus, the origin of isolate revealed an important role in these characteristics.
- *Trichoderma* sp. T154 inoculated over pruning wound vine plant showed a higher capacity of colonization and survival. Moreover, it was able to adapt to higher temperatures, which implies a greater possibility of success when it is inoculated under climate changing conditions on One health-based approach.

