



ESCUELA DE INGENIERÍA AGRARIA Y FORESTAL

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN INGENIERÍA AGRARIA MENCIÓN AGROAMBIENTAL

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. EN PLANTAS DE VID.

EVALUATION OF THE GROWTH OF *Trichoderma* spp. STRAINS IN GRAPEVINES.

Javier Saiz Gadea

Dr. Pedro Casquero Luelmo

D. Guzmán Carro Huerga



León, Julio de 2018

ANEXO 9. HOJA DE CONFORMIDAD TRABAJOS DE CARÁCTER CIENTÍFICO O TÉCNICO

Título: EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CEPAS DE *Trichoderma* Spp. EN PLANTAS DE VID
Autor: JAVIER SAIZ GADEA

ELEMENTOS DE OBLIGADA APARICIÓN

- Resumen.** De 400 palabras como máximo.
- Introducción.** Debe incluir los motivos por los que se realiza el trabajo y los antecedentes o estudios previos sobre el mismo.
- Objetivos.** Se detallarán de forma clara y concisa los objetivos que se pretenden alcanzar.
- Material y Métodos / Metodología.** Descripción de las técnicas, los materiales empleados, y los métodos de análisis de datos, de forma que se garantice la repetibilidad de los mismos.
- Resultados / Análisis / Diagnóstico.** La información obtenida con el estudio se presentará de forma sistemática, preferentemente mediante tablas y figuras que deberán ser en todo caso autoexplicativas, y deberán aparecer debidamente numeradas y referenciadas en un índice propio.
- Discusión.** Los resultados propios del trabajo deberán ser discutidos relacionándolos, en su caso, con otros de estudios precedentes.
- Conclusiones.** Deberán ser claras, concisas, y coherentes con los objetivos propuestos. En el caso planes de ordenación de recursos forestales, propuestas concretas con objetivos, líneas y medidas.
- Planos / Mapas.** Serán obligatorios en trabajos topográficos, estudios de implantación de cultivos o transformaciones de explotaciones, y en general, cualquier trabajo técnico o científico asociado a áreas, parcelas, o territorios determinados.
- Bibliografía.** Listado de las fuentes de información utilizadas debidamente referenciadas y ordenadas.

OBTENIDA LA CONFORMIDAD <input checked="" type="checkbox"/>	El tutor/es:
DENEGADA LA CONFORMIDAD (No se autoriza la presentación) <input type="checkbox"/>	
	Fdo.:  Fdo.: <u>Pedro Antonio Casquero Lueltro</u>
	<u>Cotutor: JAVIER SAIZ GADEA</u>

Resumen

El cultivo de la vid y los productos que se obtienen de ella tienen un gran valor económico a nivel mundial. La vid no es un cultivo exento de enfermedades y actualmente los viñedos sufren grandes pérdidas debido a las mismas. *Trichoderma* es un hongo beneficioso que puede ser usado para el control de enfermedades de la madera de la vid. Este estudio se centra en evaluar la capacidad de penetración y lo que es capaz de moverse este hongo en el interior de la planta de vid. Se utilizaron 54 vides repartidas en cinco tratamientos. Un tratamiento fue el control y los cuatro tratamientos restantes fueron T1 (aislado obtenido de suelo) con una concentración de $2 \cdot 10^6$ esporas/ml; T2 (aislado de planta) a $2 \cdot 10^6$ esporas/ml; T3 (aislado de planta) a $2 \cdot 10^7$ esporas/ml y T4 (aislado de planta) a $2 \cdot 10^7$ esporas/ml. Se inoculó una dosis de 50 microlitros de solución de esporas a 6°C a cada vid de su aislado correspondiente. Tras un periodo de 12 semanas en condiciones ambientales de frío invernal se evaluó donde se consiguió reaislar el hongo. Se determinó que *Trichoderma* llegó hasta los 3 cm en la madera de la vid en todos los tratamientos. Se realizó un análisis de los datos con ayuda del programa SPSS y se compararon las medias de cada tratamiento haciendo ANOVA de un factor y aplicando Duncan. Se obtuvo que el T1 mostró diferencias significativas con respecto al T2, T3 y T4. A pesar de ello, todos los aislados persistieron por 12 semanas y se desarrollaron dentro de la planta de vid.

Palabras clave: vid, enfermedades, *Trichoderma* y movimiento.

Abstract

The cultivation of the vine and the products obtained from it have a great economic value worldwide. The vine is not a disease-free crop and currently the vineyards suffer great damages due to them. *Trichoderma* is a beneficial fungus that can be used to control diseases of the vine wood. This study focuses on evaluating the penetration capacity of this fungus and its ability to move inside de vine. Fifty-four vines divided into five treatments were used. One treatment was based on the control of the fungus and the remaining four were carried out as follows: T1 (isolated from soil) with a concentration of $2 \cdot 10^6$ spores / ml; T2 (plant isolate) at $2 \cdot 10^6$ spores / ml; T3 (plant isolate) at $2 \cdot 10^7$ spores / ml and T4 (plant isolate) at $2 \cdot 10^7$ spores / ml. A dose of 50 micro liters of spore solution at 6°C was inoculated into each vine of its corresponding isolate. After a period of 12 weeks in cold winter environmental conditions, it was evaluated where the fungus was reabsorbed. It was determined that *Trichoderma* reached up to 3 cm in the vine wood in all treatments. An analysis of the data was carried out with the help of the SPSS program. The average results of each treatment were compared by the application of one-factor ANOVA and Duncan. The result was that T1 showed significant differences with respect to T2, T3 and T4. Despite this, all the isolates persisted for 12 weeks and developed inside the vine plant.

Keywords: vine, diseases, *Trichoderma* and movement.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estudios previos	1
1.2. El cultivo de la vid	1
1.2.1. La vid.....	1
1.2.2. Ciclo de la vid.....	2
1.2.3. La vid en España-Castilla y León.....	4
1.2.4. Variedad tempranillo	7
1.2.5. Características de la formación de la madera y la poda	10
1.3. <i>Trichoderma</i> spp.....	14
1.3.1. Biología	16
1.3.2. <i>Trichoderma</i> spp. como agente de control biológico	18
2.- OBJETIVOS	25
3.- MATERIAL Y METODOS.....	26
3.1. Materiales	26
3.1.1. Organismos utilizados.....	26
3.1.2. Medios de cultivo.....	27
3.1.3. Instrumental	29
3.2. Metodología.....	30
3.2.1. Plantación y mantenimiento.....	30
3.2.2. Siembra, preparación e inoculación de <i>Trichoderma</i> sp.	32
3.2.3. Recolección de plantas y siembra de material vegetal.....	37
4.- RESULTADOS	43
4.1. Análisis de los resultados	43
4.1.1. Control	43
4.1.2. T1	44
4.1.3. T2	45
4.1.4. T3	46
4.1.5. T4	47
4.2. Análisis estadístico	48
5.- DISCUSIÓN	57
6.- CONCLUSIONES	61
7.- BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vides agostándose para entrar en parada vegetativa.	3
Figura 2. Vid podada	4
Figura 3. Distribución de las marcas de calidad en Castilla y León.	6
Figura 4. Transformación de un tallo primario en un tallo secundario gracias a la generación de cambium vascular a partir de cambium fascicular y el interfascicular....	11
Figura 5. Ilustración de tallo con crecimiento secundario en vid. Técnica empleada: corte de vibratomo teñido con azul alción	12
Figura 6. Esquema de la formación de la técnica Guyot-Poussard.	13
Figura 7. Poda respetuosa con las rutas de savia hecha en la zona norte de Italia (técnica Guyot-Pousard).....	14
Figura 8. <i>Trichoderma</i> spp.....	15
Figura 9. Evolución de <i>Trichoderma</i> spp. desde “blanco” hasta “verde oscuro”	17
Figura 10. Conidios y conidióforos de <i>Trichoderma</i> ssp (400x)	17
Figura 11. Ensayo dual.	19
Figura 12. Tilosis y gomas en vaso de xilema.....	22
Figura 13. <i>Trichoderma</i> spp. y efectos beneficiosos para la planta.	24
Figura 14. plantas de vid a raíz desnuda.	26
Figura 15. medio RBA (izquierda) y medio PDA (derecha).	28
Figura 16. Información del saco de 70 L de sustrato para siembra Tipo 3 Special.	28
Figura 17. Plantación de vides en macetas y aplicación del primer riego.	31
Figura 18. Vides en parte derecha del fitotrón.....	31
Figura 19. Vides con buen desarrollo vegetativo y entutoradas.	32
Figura 20. Hongo esporulado.....	33
Figura 21. Hongo esporulado.....	33
Figura 22. Colocación de la muestra en la cámara de Neubauer.	34
Figura 23. Esporas en cuadrícula de la cámara de Neubauer.	34
Figura 24. Vid podada.	35
Figura 25. Colocación del soporte de plastilina.....	36
Figura 26. Plantas de vid ya inoculadas con <i>Trichoderma</i> sp. y con el soporte de plastilina (azul).....	37
Figura 27. Preparación de placas Petri de RBA + chloramphenicol.	37
Figura 28. Corte de la planta a ras del sustrato.....	38
Figura 29. Vid marcada cada 3 cm.	39
Figura 30. Corte de la vid.	39
Figura 31. Siembra de las muestras de madera.....	40
Figura 32. Corte transversal.....	40
Figura 33. Repeticiones del Control.	41
Figura 34. Repeticiones de T1	41
Figura 35. Repeticiones de T2	42
Figura 36. Repeticiones de T3	42
Figura 37. Repeticiones de T4	42
Figura 38. Evaluación del crecimiento a 0 cm en T1.	44
Figura 39. Evaluación del crecimiento a 3 cm en T1.	44
Figura 40. Evaluación del crecimiento a 0 cm en T2.	45
Figura 41. Evaluación del crecimiento a 3 cm en T2.	45
Figura 42. Evaluación del crecimiento a 0 cm en T3.	46
Figura 43. Evaluación del crecimiento a 3 cm en T3.	46
Figura 44. Evaluación del crecimiento a 0 cm en T4	47
Figura 45. Evaluación del crecimiento a 3 cm en T4	47

Figura 46. Esquema para calcular ANOVA de un factor.	49
Figura 47. Prueba de normalidad.	51
Figura 48. Resumen de la prueba de hipótesis.....	52
Figura 49. Combinación de valores.	53
Figura 50. Resultados análisis Duncan.	54
Figura 51. Datos descriptivos y Anova entre dos concentraciones.	55
Figura 52. Datos descriptivos y Anova a dos concentraciones.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Serie histórica de superficie, rendimiento, producción y destino de la producción.	5
Tabla 2. Variedades de uva según D.O.	6
Tabla 3. Patrones de vid y características.	9
Tabla 4. Listado del instrumental empleado.	29
Tabla 5. Periodicidad del riego por meses.	32
Tabla 6. Resultados Control.	43
Tabla 7. Resultados T1	44
Tabla 8. Resultados T2	45
Tabla 9. Resultados T3	46
Tabla 10. Resultados T4	47
Tabla 11. Datos estadísticos para T1 a 0 cm.	50
Tabla 12. Datos estadísticos para T2 a 0cm.	50
Tabla 13. Datos estadísticos para T3 a 0 cm.	50
Tabla 14. Datos estadísticos para T4 a 0 cm.	51
Tabla 15. Comparativa de productos a base de <i>Trichoderma</i> spp en Europa.	59

1.- INTRODUCCIÓN

El presente estudio tiene por **finalidad** evaluar cómo se mueve *Trichoderma* spp. dentro de las plantas de vid para así poder entender mejor a este aliado del hombre en materia de control biológico.

Trichoderma spp. es de gran **importancia** no sólo por su potencial en control biológico aplicado a las actividades del mundo agrario sino también por las múltiples aplicaciones en biotecnología etc. Además, se trata de un hongo cosmopolita que podemos encontrar en sitios muy dispares y en consecuencia puede ser aplicado en casi todos ellos.

Además, el presente estudio tiene **originalidad** ya que no hay hasta el momento ningún estudio que analice como se mueve *Trichoderma* spp. en plantas de vid sobre la variedad tempranillo.

La investigación es **factible** debido al equipo técnico y de laboratorio con el que cuenta la E.S.T.I.A y todo tipo de instalaciones necesarias para el correcto desarrollo del estudio.

Los **beneficiarios** de este estudio primeramente son todas aquellas personas que han participado en él seguidamente de las personas del mundo agrario que basan su actividad económica en la **viticultura ya que *Trichoderma* spp. es un aliado para combatir las enfermedades de madera entre otras muchas aplicaciones.**

1.1. *Estudios previos*

El presente trabajo tiene como antecedente el Trabajo Fin de Grado “Evaluación *in vitro* de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol frente a *Phaeoacremonium aleophilum*” del estudiante Diego Blanco Barreales. En dicho trabajo se realizaba una evaluación de los aislados del hongo *Trichoderma* spp. de planta de vid y de suelo procedentes de viñedo. Se realizaron ensayos en laboratorio frente a un hongo patógeno causante de las enfermedades de madera de vid. Aquellos que obtuvieron mejores resultados han sido seleccionados para utilizar en este trabajo. Con el fin de evaluar en campo la capacidad de estos hongos de estar en simbiosis con la planta.

1.2. *El cultivo de la vid*

1.2.1. *La vid*

La vid es un arbusto leñoso y trepador que se fija a tutores, si los encuentra, por medio de los zarcillos. Si esto no ocurre, se expande por el terreno ocupando una gran superficie (Hidalgo y Hidalgo Togoires, 2011)

La uva para vinificación que todos conocemos procede de la *Vitis vinifera* que se presenta en miles de variedades gracias a la intervención del hombre. Prácticamente el total de las vides cultivadas para la producción de uva y posterior vinificación en todo el mundo pertenecen a esta especie, por sus excelentes cualidades. Sin embargo, es muy sensible a otras enfermedades como son la enfermedad de Petri, pie negro, decaimiento por *Botryosphaera*, yesca o eutipiosis (Hidalgo y Hidalgo Togores, 2011).

El fruto de la vid, la uva, es una baya que forma racimos gracias a la estructura del raspón que sujeta las uvas y les proporciona las sustancias alimenticias. En las uvas de vinificación el raspón es corto y en consecuencia el racimo es apretado y compacto (Hidalgo y Hidalgo Togores, 2011).

La morfología de un grano de uva se divide en epicarpio u hollejo, mesocarpio o pulpa, pepitas o granilla y pincel. Llamamos hollejo a la película exterior que a su vez está recubierta por una sustancia cerosa que es la pruina. En ella están las levaduras que se encargarán de iniciar la fermentación alcohólica. En la piel de la uva se encuentran también las sustancias colorantes del futuro vino a las que llamados antocianos y el aroma de cada variedad. La pulpa ocupa casi todo el grano y en ella se encuentra el mosto. En las variedades tintoreras el mosto también posee color. A las semillas las denominamos pepitas o granilla y tienen un gran valor como subproducto, por ejemplo, en la elaboración de abonos. El pincel se encuentra en la parte superior de los fascículos centrales o manojos y a través de él se alimenta de savia la uva. Conecta la uva con el raspón (Hidalgo y Hidalgo Togores, 2011).

1.2.2. *Ciclo de la vid*

Según Hidalgo y Hidalgo Togores (2011) se explica muy detalladamente como la vid pasa por un ciclo anual y unos periodos vegetativos muy reconocibles, que son:

Lloro. A comienzos de marzo, es la primera muestra de movilización de reservas. Depende de la temperatura y variedad de uva. Por los cortes de poda, la vid “llora” savia. Es un fenómeno muy curioso de observar, algunas vides pueden llorar grandes cantidades de savia.

Brote. Las yemas empiezan a hincharse y aparece una borra blanca. Después pequeñas partes verdes sustituyen a la borra. El brote también depende de la temperatura, variedad y el clima. Esto ocurre entre marzo y abril.

Crecimiento. El brote da lugar a unas inflorescencias de pequeño tamaño donde se puede apreciar el futuro racimo que seguirá desarrollándose a no ser que las condiciones climatológicas sean adversas.

Crecimiento del racimo. Se divide, a su vez, en cuatro periodos:

Periodo herbáceo o del agraz

Dura unos 50 días y empieza a partir de la fecundación de la flor que puede producirse de dos formas. Si los óvulos de la flor son fecundados por un grano de polen se consigue la uva pirena (con semillas) y si se fecunda solo con el estímulo parcial del grano de polen se obtiene uva apirena (sin semillas) que es muy apreciada para la elaboración de pasas. Cuando este periodo acaba, el racimo es muy pobre en azúcares, pero no en acidez.

Periodo del envero

Tiene una duración de un solo día para cada grano de uva y como característica principal observamos un cambio de color en la baya. En este momento, las pepitas alcanzan su madurez fisiológica, es decir, serían capaces de germinar.

Un viñedo medio tardaría en enverar totalmente unos 15 días.

Periodo de maduración

La uva madura en unos 40 o 50 días aproximadamente. El grano sigue aumentando de tamaño, así como en la concentración de azúcares, pero la acidez disminuye. Este periodo acaba en el momento estimado para la vendimia.

Periodo de sobremaduración

La cepa deja de aportar a la uva los componentes esenciales y comienza a perder agua por evaporación y, consecuentemente, peso. Los azúcares sin embargo aumentan. Normalmente, la finalidad de la sobremaduración es la obtención de uvas pasas.

Caída de la hoja. Cuando la temperatura disminuye, se produce la caída de la hoja, pero antes la planta se prepara para el invierno acumulando reservas. Por debajo de 0 °C, la vid entra en parada vegetativa como se aprecia en la Figura 1 y permanece en reposo hasta el lloro del nuevo año.



Figura 1. Vides agostándose para entrar en parada vegetativa.

(Fuente: <http://www.enociencia.com/2016/01/epocas-de-poda-en-seco-de-la-vid.html?m=1>, 2016)

Ha sido en este momento de parada vegetativa cuando a las vides utilizadas en este estudio se les ha podado e inoculado el *Trichoderma* en las heridas realizadas tras la poda.



Figura 2. Vid podada

(Fuente: (<http://www.enociencia.com/2016/01/epocas-de-poda-en-seco-de-la-vid.html?m=1>, 2016)

1.2.3. La vid en España-Castilla y León

Dentro de la especie *Vitis vinífera* se reconocen varios miles de variedades o cultivares, diferenciados bien sea por características morfológicas o morfométricas como por marcadores moleculares. Esta amplia variedad se debe principalmente a la intervención humana. (Chomé, 2002).

En Castilla y León se han identificado diferentes clones certificados de las principales variedades que más fama tienen, a saber: Albillo Mayor, Albillo Real y Verdejo, Garnacha Tinta, Juan García, Mencía, Prieto Picudo y Tempranillo. El Banco de Germoplasma de Vid de Castilla y León (BGV-CyL) contribuye a preservar el patrimonio varietal español. (Rubio et al., 2009).

La variedad de vid que se ha utilizado en este estudio se corresponde con la variedad tempranillo y fue adquirida de viveros de la zona proveniente de Vivai Cooperativi Rauscedo,

Comúnmente los viñedos han estado ubicados en zonas de suelo poco productivo para otros cultivos y con bajas posibilidades de riego. Se trata de un cultivo muy resistente a la sequía debido a su sistema radicular y se adapta bien a diferentes tipos de suelo. Puede soportar hasta temperaturas de 40°C y de hasta -10°C, pero es muy sensible a heladas tardías. La vida útil de un viñedo se estima en 35 años, aunque la planta de vid es muy longeva (Martín, 2012).

En Castilla y León cada vez son más las plantaciones en espaldera. Con este sistema se consigue una mejor exposición de las hojas a la luz y una aplicación más eficiente de los productos fitosanitarios. Por otro lado, se mejora el rendimiento productivo de la vid debido a la densidad de plantación, implantación de posibles sistemas de riego y mecanización en labores del suelo y vendimia (Martín, 2012)

Según Martín (2012): “La extensión mundial del cultivo de la vid se sitúa en torno a los siete millones de hectáreas. En nuestro país, la vid representa el cultivo con mayor superficie por detrás de los cereales y el olivar”.

En la Tabla 1 se muestran datos relativos a la superficie, rendimiento y producción para la serie histórica del 2005/2015 para España, obtenidos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA).

Tabla 1. Serie histórica de superficie, rendimiento, producción y destino de la producción.

Años	Viñedo de uva de mesa				Viñedo de uva para transformación			
	Superficie (Miles de ha)		Rendimiento de la superficie en la producción (qm/ha)	Producción de uva (miles de t)	Superficie (Miles de ha)		Rendimiento de la superficie en la producción (qm/ha)	Producción de uva (miles de t)
	Total	En producción			Total	En producción		
2005	21,4	20,7	151,1	312,3	1138,1	1073,8	53,5	5741,7
2006	20	19,5	174,7	339,9	1114,6	1048,4	59,6	6245,6
2007	19,4	18,9	140,2	264,4	1111,2	1040,2	54,7	5694,3
2008	18,2	17,7	156,8	278,2	1090	1031	55	5673,3
2009	17,4	16,8	149,1	251,2	1028,3	974,5	54,3	5287,7
2010	16,2	15,5	152,9	267,5	985,8	940,4	62,4	5870,1
2011	15,2	14,5	168	243,4	947,4	897,9	62	5565,9
2012	14,5	13,8	174,9	241,2	931,9	882	57,7	5091
2013	13,7	12,8	198,3	254,3	932,5	876,7	82,5	7228,3
2014	14,4	13,5	179,7	241,8	932,6	874,9	68,3	5979,9
2015	14	13,1	207,1	270,7	927,1	865,7	63,9	5728,4

(Fuente: MAPAMA, 2016)

En Castilla y León la vid representa una fuente de ingresos bastante importante tanto en ámbito económico como socio-cultural. Casi el 50% de la superficie de viñedo de España se encuentra repartido entre Castilla La Mancha, Extremadura, Castilla y León y Comunidad Valenciana (MAPAMA, 2016).

Castilla y León tiene reconocidas nueve Denominaciones de Origen (D.O.): D.O. de Arlanza, D.O. Arribes, D.O. Bierzo, D.O. Cigales, DO Ribera del Duero, D.O. Rueda, D.O. Tierra de León, D.O. Tierra del vino de Zamora y D.O. Toro. También existen otras formas de calidad como son Vino de Calidad de Sierra de Salamanca, Vino de Calidad de Valtiendas, Vinos de Calidad del Valle de Benavente o la Indicación Geográfica Protegida (IGP) Vinos de Tierra de Castilla y León.

En la Figura 3 se muestra la localización geográfica a nivel de Castilla y León en la que se encuentran estas marcas de calidad. Como se puede apreciar muchas Denominaciones están ligadas al río Duero.



Figura 3. Distribución de las marcas de calidad en Castilla y León.

(Fuente: (http://www.itacyl.es/opencms_wf/export/system/modules/es.jcyl.ita.module.noticias/elements/galleries/galeria_downloads/J.A._Rubio_Proc._Recuperacixn_Var_Min.pdf, 2017))

Según la zona de CyL hay una adaptación de las distintas variedades de vid lo que da lugar a diferentes D.O. con las cuales se elaboran los diferentes vinos de calidad de esta Comunidad, en la Tabla 2 se muestran las diferentes variedades de uva empleadas tanto para la elaboración de vinos tintos como blancos según las D.O. que hay:

Tabla 2. Variedades de uva según D.O.

D.O.	Variedad de uva empleada	
	Tinta	Blanca
Arlanza	Tempranillo	-
Arribes	Tempranillo, José García, Rufete	Malvasía
Bierzo	Mencía	Godello, Doña Blanca

Cigales	Tempranillo, Garnacha	Verdejo
Ribera del Duero	Tempranillo	-
Rueda	Tempranillo	Verdejo
Tierra de León	Prieto Picudo, Mencía	Albarín blanco, Godello, Verdejo
Tierra del vino de Zamora	Tempranillo	Verdejo, Malvasía, Moscatel
Toro	Tinta de Toro	-

Para este trabajo se usó la variedad tempranillo por considerarla una de las más importantes de Castilla y León. En el siguiente apartado se redactan algunas consideraciones de esta variedad.

1.2.4. Variedad tempranillo

Desde Vivai Cooperative Rauscedo y su Catálogo general de las variedades de uva de vino y de mesa, se extrae una amplia información sobre la variedad tempranillo. Es una variedad originaria de la Rioja y cultivada en numerosos viñedos experimentales de todo el mundo. Parece que el nombre deriva del término “temprano”, es decir, precoz, debido a su tendencia a madurar precozmente. Se trata de una variedad muy difundida, cultivada también en Portugal (1.800 ha en el año 2000), en el sur de Francia, Argentina, EEUU, Australia, Marruecos, Brasil, Venezuela, Uruguay, México, Tailandia. Se conoce con varios nombres: Tinta del País, Tinto de Toro, Tinta Fina, Cencibel (en la región española de la Mancha), Tinto de Madrid, Ull de Llebre (en Cataluña), Ojo de Liebre. Además, recibe el nombre de Aragonéz y Tinta Roriz en Portugal (Rauscedo, 2013).

Algunas de sus características más representativas a tener en cuenta son:

- Caracteres ampelográficos: pámpano de ápice abierto, algodonoso, blanco, ligeramente carminado. Hoja grande, con cinco lóbulos y el lóbulo central prolongado; seno peciolar en U con bordes que tienden a cerrarse y superponerse ligeramente, senos laterales superiores con bordes sobrepuestos, senos inferiores profundos; borde tomentoso, ondulado, dientes de medios a grandes con lados rectos. Racimo mediano-grande, cilíndrico, prolongado, con un ala, compacto y de peso mediano 300 g. Baya mediana, redonda.

- Aptitudes de cultivo: cepa de buen vigor y porte erguido. Se adapta a todos los tipos de suelos y climas, prefiriendo suelos bien orientados y climas secos. Además, se adapta bien a las condiciones de cultivo tropicales, donde proporciona producciones buenas y constantes (Tailandia, Venezuela y nordeste de Brasil). A veces, puede sufrir quemaduras de las hojas y bloqueo de la maduración debido a una insolación intensa, con efectos negativos en la calidad de los mostos.
- Formación y poda: se adapta a formaciones y podas diversas, tanto en cepas bajas con pulgares cortos, como a espaldera con podas largas Guyot.
- Época de brotación: media-precoz.
- Época de maduración: media-precoz.
- Producción: media.
- Sensibilidad a las enfermedades y adversidades: sensible a la botrytis, al mildiu y al oídio. Poco sensible a las heladas primaverales, sensible al corrimiento. Sensible al viento cálido.
- Potencial enológico: proporciona vinos de color intenso y estable, adecuado para el envejecimiento en barricas de elevada graduación alcohólica, de acidez media o ligeramente baja, bien equilibrados con el típico aroma a hoja de tabaco y especias. Se utiliza a menudo en mezclas con otras variedades de baya roja, como Cabernet Sauvignon, Cariñena, Merlot o Monastrell.

Clones en multiplicación: Tempranillo VCR379; clones franceses: Inra-Entav 770, 776; clones españoles: RJ26, 43, 75, 78, 79; Tinta del País C.L.16, 32, 98, 117, 179, 261; Tinto de Toro 271, 280, 292, 306, 311, 326. Clones de próxima solicitud de homologación: Tempranillo VCR224, VCR472, VCR478.

El portainjertos también conocido como patrón o pie, es la parte sobre la que va injertada la variedad o cultivar por ser resistente a filoxera y por adaptarse mejor a las condiciones del suelo. Después del gran devastador ataque a las vides españolas que dejó prácticamente al territorio sin ellas, se empezó a estudiar más los patrones, conociendo así más y mejores características importantes para su uso. Actualmente el que más se emplea es el Richter 110 (R-110) por varias razones como se explica en la Tabla 3.

Tabla 3. Patrones de vid y características.

Resistencia a diferentes factores del suelo				
	<u>Resistencia a caliza activa</u>	<u>Resistencia a sequía</u>	<u>Resistencia a humedad</u>	<u>Resistencia a nematodos</u>
SO4	15%	Baja	Elevada	Muy resistente
R-110	17%	Elevada	Baja	Resistente
1103 P	17%	Elevada	Media	Muy resistente
161-49 C	25%	Media-Baja	Media	Sensible
140 Ru	40%	Elevada	Baja	Resistente
41-B	40	Media	Baja	Sensible
Efectos del portainjerto sobre la variedad de vid o cultivar				
	<u>Vigor</u>	<u>Ciclo vegetativo</u>	<u>Maduración</u>	<u>Sistema radicular</u>
161-49 C	Vigor Medio	Largo	Adelanta	Intermedio
SO4	Vigor Medio	Corto	Adelanta	Rastrero
R-110	Vigoroso	Largo	Retrasa	Intermedio
1103 P	Muy vigoroso	Largo	Retrasa	Intermedio
140 Ru	Muy vigoroso	Largo	Retrasa	Intermedio
41-B	Vigor Medio	Muy Corto	Adelanta	Rastrero

(Fuente: elaboración propia a partir de <http://www.vitivinicultura.net/portainjertos-que-es-un-portainjertos.html>, 2014)

El portainjerto R-110 es el más utilizado en la viticultura española y el segundo en la francesa. El 50% de las plantas de vid que se producen actualmente son con este portainjerto. Debido a su polivalencia tanto para climas como suelos, se encuentra distribuido de norte a sur por toda la geografía española. El R-110 tiene un buen grado de tolerancia a la filoxera radicícola.

Debido a las buenas características que presenta el R-110 y la amplia extensión en el marco español se eligió este patrón para las vides del estudio.

Como el resto de variedades, el tempranillo es sensible a las enfermedades del decaimiento de la madera y *Trichoderma* spp. ayuda a proteger y combatir esas enfermedades, pero se necesita

conocer cómo se mueve en el interior de la planta. En este estudio se pretende dar respuesta a ello.

1.2.5. *Características de la formación de la madera y la poda*

El tallo crece en longitud formando al mismo tiempo los órganos laterales (ramas, hojas, flores y frutos), y, además, crece en grosor. Este crecimiento en grosor puede ser de dos tipos: crecimiento primario o secundario. Los tallos con crecimiento primario son aquellos en los que el crecimiento en longitud y en grosor depende de los meristemos apicales y de los meristemos intercalares. Mientras que en los tallos con crecimiento secundario, el crecimiento en grosor se debe a los meristemos cámbium vascular y felógeno (Megias, 2015).

Antes de proceder a la poda los tallos de la planta deben desarrollarse. Este desarrollo se divide en crecimiento primario y crecimiento secundario. La mayoría de las monocotiledóneas solo presentan el crecimiento primario mientras que la mayoría de las dicotiledóneas (como la vid) y todas las gimnospermas tienen tallos que pasan por el crecimiento primario y secundario (Megias, 2015).

Durante el crecimiento primario se observan los siguientes tejidos: epidermis, corteza y tejidos vasculares (xilema y floema primarios) (Megias, 2015).

El crecimiento secundario del tallo es una consecuencia de la actividad del cambium vascular. Durante el cambio de crecimiento primario a secundario lo primero que ocurre es la formación del meristemo denominado cambium vascular a partir del procambium y de la diferenciación del parénquima interfascicular. El cambium vascular completamente desarrollado tiene generalmente forma de cilindro completo, sus células se dividen y diferencian formando floema secundario hacia fuera y xilema secundario hacia dentro. De esta manera, los tejidos vasculares primarios formados previamente, van alejándose uno de otro, y sobresalen de los cilindros de tejido vascular como pequeños grupos a modo de uñas (Megias, 2015).

La actividad del cambium vascular produce unos anillos de crecimiento anuales que quedan internos al propio meristemo, por lo que el cambium vascular progresivamente se aleja del eje del tallo. Esto es lo que produce el crecimiento en grosor de los tallos. Los elementos más antiguos producidos por el cambium vascular son los más alejados y los recién formados están en contacto con el propio cambium vascular. En los tallos leñosos aparecerá posteriormente otro meristemo más superficial que es el felógeno, del cual deriva la peridermis o corteza del tallo, y que sustituye a la epidermis existente hasta el momento (Megias, 2015).

Heridas en la corteza, así como las heridas causadas en la poda son vía de entrada para las enfermedades de la madera de la vid.

En las plantas dicotiledóneas herbáceas es normal que el cambium vascular no forme tejidos de manera homogénea en toda la circunferencia del tallo. En estos casos el cambium fascicular (localizado entre los vasos conductores) es el único que forma vasos mientras que el cambium interfascicular solo produce un tipo celular especializado llamado fibras. Así se forma un anillo de xilema que no es homogéneo, sino que tiene sectores especializados en funciones de tipo mecánico. En otros casos, como en la vid, el cambium interfascicular solo da parénquima (Megias, 2015) De manera esquemática el proceso queda reflejado en la Figura 4.

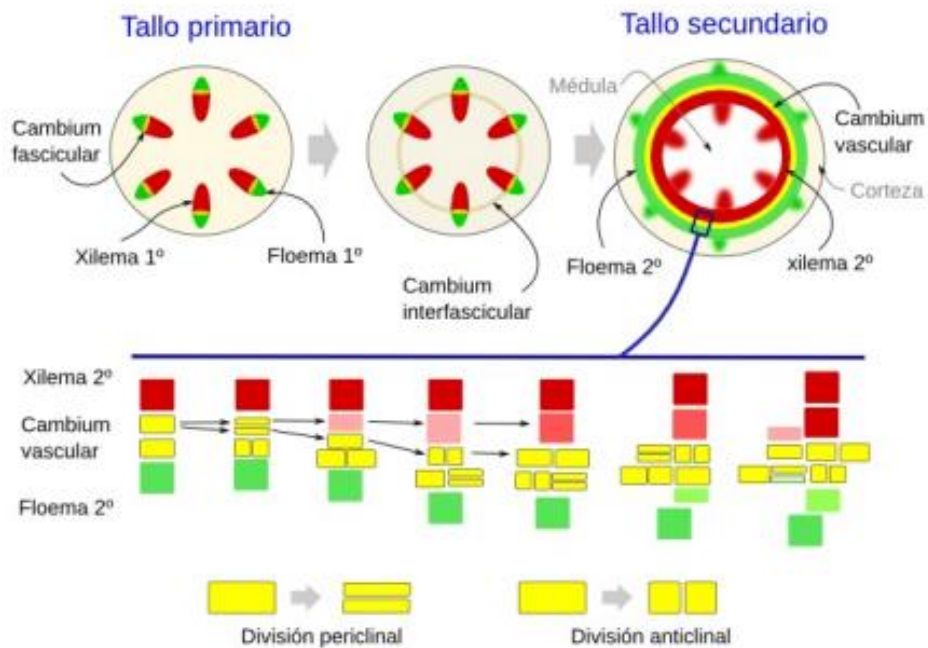


Figura 4. Transformación de un tallo primario en un tallo secundario gracias a la generación de cambium vascular a partir de cambium fascicular y el interfascicular

(Fuente: (Megias, 2015))

En un tallo que presente crecimiento secundario típico tenemos peridermis, haces vasculares y médula. La peridermis se produce por el meristemo lateral denominado felógeno. Aparece en los tallos con crecimiento secundario desarrollado. La parte más externa o súber se convierte en lo que vulgarmente denominamos corteza. Dentro de los haces vasculares tenemos el floema y xilema secundarios; el floema secundario es el producido por el cambium vascular hacia la superficie del tallo. Sus partes más viejas, más externas van degenerando progresivamente y forman parte de la corteza. Por otro lado, el xilema secundario es producido hacia el interior de la planta, es el tejido que va conformando la mayor parte de la madera de los troncos y es el que forma los anillos de crecimiento anuales. Por último, la médula es la parte más interna del tallo formado por células parenquimáticas (Megias, 2015) Se pueden apreciar estos detalles en la Figura 5.

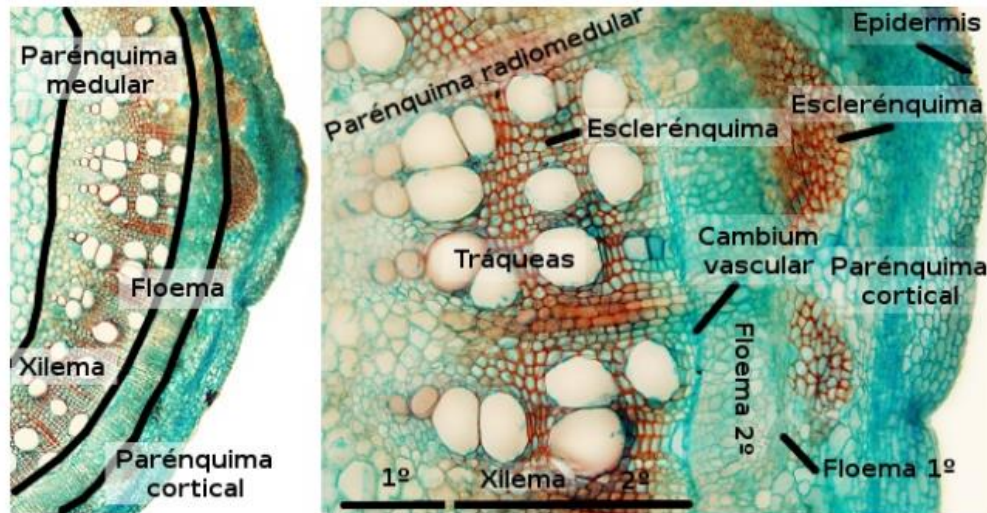


Figura 5. Ilustración de tallo con crecimiento secundario en vid. Técnica empleada: corte de vibratomo teñido con azul alcian

(Fuente: Megias, 2015)

Una vez formados los tallos, en el momento adecuado se procede a la poda. La poda es la práctica con la que se forman las plantas y trata de equilibrar el potencial vegetativo, regulando la cantidad y calidad de los frutos. Se puede efectuar con madera lignificada, denominándose poda en seco o poda de invierno o con los brotes herbáceos, denominada poda en verde.

Las vides que se utilizaron para este estudio fueron podadas en seco una vez que se produjo la caída de la hoja y la planta entró en parada vegetativa.

La poda en seco se realiza en la estación de invierno, desde la caída de las hojas hasta el comienzo del lloro, hay que hacer los cortes imprescindibles ya que son puerta de entrada de hongos de la madera. La poda en verde consiste en eliminar manualmente aquellos brotes anticipados que no son necesarios para la formación de pulgares (Megias, 2015).

La doble poda es una técnica de poda con dos cortes periódicos: la primera se hace al finalizar el otoño o comienzos del invierno. Al final del invierno un segundo corte elimina el excedente de madera, quedando solo dos botones de yemas. Es en este momento es cuando los potenciales sarmientos de invierno posiblemente infectados son eliminados dejando solo las yemas para futuros brotes sanos (Mondello *et al.*, 2015).

Otra posibilidad usada por viticultores para prevenir enfermedades causadas por hongos es la poda tardía. Este método consiste en una poda realizada a principios del invierno hasta el final o comienzo de la primavera con el propósito de tener la presencia de inóculos de hongos el menor tiempo posible (Mondello *et al.*, 2015).

Una poda que es útil para el control de enfermedades en el viñedo es la poda mínima. Se podan solo varas largas durante el periodo de parada vegetativa. Cada dos o tres años se poda el viñedo solo para el mantenimiento de la forma. Esta teoría de la poda mínima pretende reducir el número de heridas de poda y la presencia de necrosis y patógenos (Mondello *et al.*, 2015). La presencia de patógenos puede dar lugar a enfermedades de la madera de la vid. Algunas de las más importantes y perjudiciales se comentan a continuación: yesca, causada por *Phaeoacremonium aleophilum* y *Phaeomoniella chlamydospora*. es una de las enfermedades más antiguas afectando principalmente a vides de más de 25 años causando decoloraciones y necrosis internerviales; enfermedad de Petri, causado por mismos hongos de antes se considera que la enfermedad de Petri puede ser precursora de la yesca; eutipiosis, causado por *Eutypa lata* produce pámpanos débiles, entrenudos cortos, hojas pequeñas y deformadas; brazo muerto, principalmente intervienen los hongos *Diplodia seriata* y *Diplodia mutila* produciendo necrosis superficiales y brazos y tronco que pueden llegar hasta el punto de injerto y pie negro, en España principalmente actúan los hongos *Cylindrocarpon macrodidynum* y *Cylindrocarpon liriodendri* que hacen que las plantas presenten escaso vigor, con tallos de poco grosor, poco follaje y con clorosis y necrosis. (García-Jiménez, Raposo and Armengol, 2010)

Otra técnica de poda es el sistema de poda respetuosa con el flujo de savia o Guyot-Poussard. En la actualidad, una hipótesis difundida es que la poda respetuosa con el flujo de savia reduce la probabilidad de nuevas infecciones debido al pequeño tamaño y al bajo número de las heridas de poda. Algunos sistemas de conducción requieren reconducción y cortes de renovación comunes en los viñedos más antiguos que podrían ser evitados con este método de poda (WinetWork, 2015) La secuencia del proceso para Guyot-Poussard se muestra en la Figuras 6 y 7.

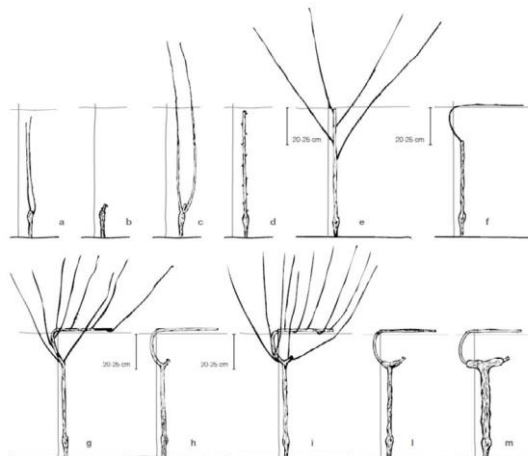


Figura 6. Esquema de la formación de la técnica Guyot-Poussard.

(Fuente: WinetWork, 2015)



Figura 7. Poda respetuosa con las rutas de savia hecha en la zona norte de Italia (técnica Guyot-Pousard)

(Fuente: WinetWork, 2015)

Para este estudio se llevó a cabo una poda en Guyot Simple, por lo que se pretende conseguir que *Trichoderma* spp. se mueva por los haces vasculares después de inocularlo en invierno a través de la herida de poda.

1.3. *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* está formado por hongos que son filamentosos y pertenecen a la División Deuteromicota y dentro de ésta, a la Clase de los Hifomicetos (producen conidios o esporas asexuales) (Gams et al., 1987).

Dado que presenta una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas, es uno de los géneros más estudiados en estos campos de investigación. En el grupo GUIIAS de la E.S.T.I.A se investiga con varias aplicaciones de control biológico que presenta el *Trichoderma* spp. Este estudio se centra en cómo se mueve en las plantas de vid con el fin de combatir enfermedades de la madera, que son causantes de muerte de las plantas y pérdidas cuantiosas de producción en los viñedos.

El género *Trichoderma*. se describió hace más de 200 años. Desde entonces y hasta la llegada de las técnicas moleculares, la taxonomía del género se basó en criterios morfológicos, que son herramientas subjetivas, imprecisas e ineficaces cuando se trata de diferenciar especies o clasificar nuevos aislamientos dentro de este género (Tejerino, 2010).

Los primeros estudios para caracterizar cepas de *Trichoderma* spp, no basados en criterios morfológicos, aplicaron características fisiológicas y/o bioquímicas (Zamir y Chet, 1985). Actualmente el uso de técnicas moleculares como RFLPs (*Restriction Fragment, Length Polymorphism*) perfiles RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA-PCR*) secuencias de distintas zonas de genoma o marcadores SCAR (*Sequence-Characterized Amplified Region*) se están imponiendo, para la identificación de cepas, la sistemática del género y la monitorización de agentes de biocontrol (Muthumeenakshi *et al.*, 1994)

Las especies del género *Trichoderma* spp. son cosmopolitas y versátiles a la hora de asentarse, esto quiere decir que pueden vivir en suelos forestales, agrícolas o pastos entre otros. Son capaces de adaptarse a diferentes condiciones climáticas, habiendo estudios por todo el mundo. Principalmente habitan en el suelo o en madera en descomposición (Kraus *et al.*, 2004). Debido a que se pueden encontrar en gran variedad de sustratos se presenta esa alta variedad de cepas del hongo. A pesar de todo, *Trichoderma* spp. prefiere suelos ácidos ricos en materia orgánica siendo esencial el hierro para su correcto desarrollo (Hubbard, Harman and Hadar, 1983)

La mayoría de las especies de *Trichoderma* spp. producen grandes cantidades de conidios que por lo general son de color verde formados a partir de células conidiógenas, se puede apreciar en la Figura 8. Los conidióforos son muy ramificados, están tabicados y contienen más de un núcleo. Los conidios son ovoides y con un solo núcleo. En condiciones de estrés pueden producir clamidiosporas (Lewis, J. A., Papavizas, 1984)

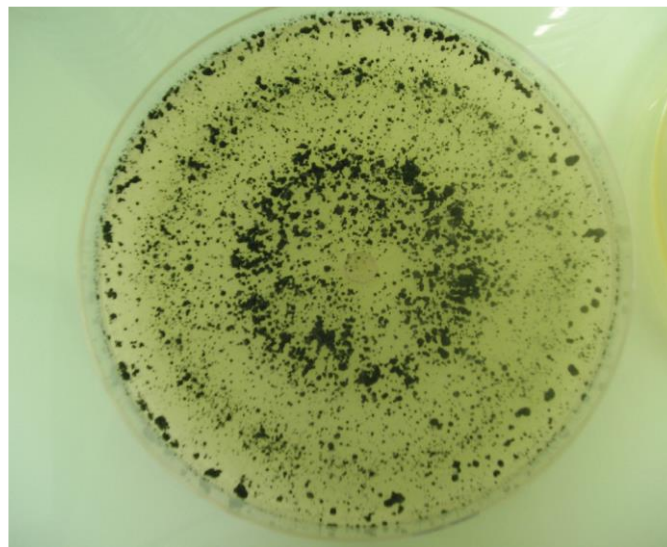


Figura 8. *Trichoderma* spp

(Fuente: Larignon, Kortekamp and Fontaine, 2015)

El momento apropiado para recoger las esporas es cuando está con el color verdoso ya que esto nos indica que está esporulado. Para este trabajo con el mismo tiempo de desarrollo, unos *Trichodermas* spp. se desarrollaron más pronto que otros, pero de todos y cada uno de ellos se pudo obtener esporas.

1.3.1. *Biología*

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* spp. se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Las especies de *Trichoderma* spp. se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos (Infante *et al.*, 2009).

Los sustratos que *Trichoderma* spp. puede utilizar en su crecimiento son muy variados, aunque muestra preferencia por los suelos ácidos y ricos en materia orgánica, siendo el hierro un elemento esencial para su correcto desarrollo (Kubicek and Harman, 1998)

El género *Trichoderma* spp. es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (Fernández, 2006)

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* spp. en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas (Rifai, 1969). Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos (Harman, 2004). Además de los conidióforos, éstas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio (Infante *et al.*, 2009).

En la Figura 9 se aprecia la evolución de *Trichoderma* spp. desde su siembra hasta la formación de conidios como se ve en la Figura 10.

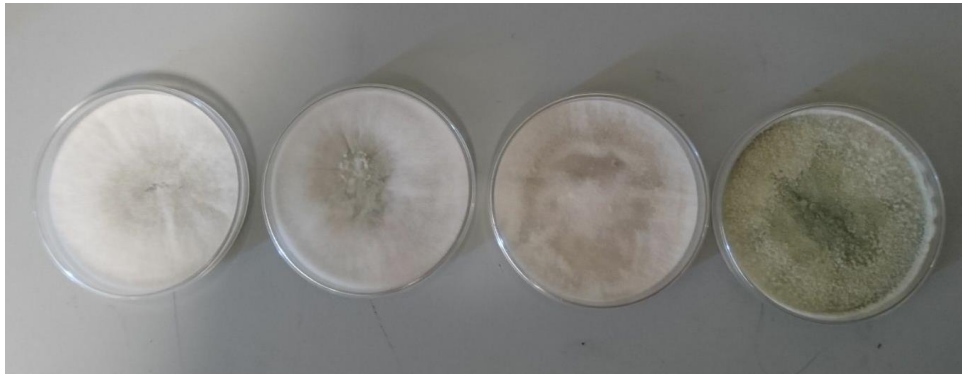


Figura 9. Evolución de *Trichoderma* spp. desde “blanco” hasta “verde oscuro”

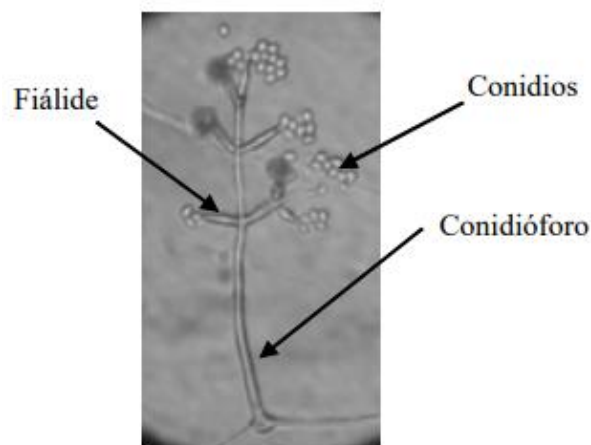


Figura 10. Conidios y conidióforos de *Trichoderma* spp (400x)
(Fuente: Infante et al., 2009)

La acción biocontroladora de *Trichoderma* spp. es muy amplia, pueden ser por competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo, la antibiosis entre otras. Para ello, *Trichoderma* spp. necesita estar en la planta y moverse dentro de ésta, en este estudio se pretende dar respuesta a cómo se mueve este hongo en las plantas de vid a diferentes concentraciones de esporas que previamente han sido inoculadas en los cortes después de podarlas.

Además, se conoce que *Trichoderma* spp. presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar los que elicitán o inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Inducción de Resistencia) (Harman, 2000) con la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección; la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Tienen la capacidad, además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés (Harman, 2000).

1.3.2. *Trichoderma* spp. como agente de control biológico

Las enfermedades vegetales causadas por bacterias, virus u hongos son las causantes de cuantiosas pérdidas en el sector agrícola. Entendemos por control biológico como la utilización de organismos naturales o modificados, genes o productos génicos, para reducir los efectos de organismos indeseables y para favorecer organismos útiles para el hombre, tales como árboles, cultivos, animales o microorganismos beneficiosos (Flint and Dreistadt, 1998).

Hace casi 20 años que Weindlin describió la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* (*T. viride*) sobre el patógeno *Rhizoctonia solani*. Este autor sugirió que se usaran inóculos de *T. viride* para controlar a ciertos patógenos y desde entonces han surgido *T. harzianun*, *T. viride* y *T. virens* (Monte, 2001).

A continuación, se detallan brevemente los mecanismos mediante los cuales *Trichoderma* ejerce su acción:

1.3.2.1. Micoparasitismo

Se define el micoparasitismo como la relación que un organismo establece con un hongo huésped, de manera que se beneficia del mismo, normalmente obteniendo nutrientes, sin aportarle nada a cambio y en ocasiones causando la muerte. Cuando ocurre esto se llama micoparasitismo necotrófico (Tejerino, 2010).

Las especies de *Trichoderma* spp. tienen un elevado potencial parasítico, con una actividad metabólica muy particular, que les permite parasitar eficientemente las estructuras fúngicas de los hongos (Infante *et al.*, 2009).

El micoparasitismo se da en varias fases:

Primero *Trichoderma* spp. localiza el patógeno y comienza a crecer por tropismo hacia él (Lu *et al.*, 2004) Ésta detección a distancia se debe a un gradiente químico generado por una secreción secuencial de enzimas que degradan la pared celular de los hongos (CWDEs).

Posteriormente los hongos entran en contacto y es cuando *Trichoderma* spp. se enrosca alrededor de su presa y forma estructuras de tipo apresorio, con las que podrá penetrar en el interior de las hifas del patógeno (Inbar and Chet, 1992). Una vez en contacto *Trichoderma* spp. produce varias CWDEs y antibióticos, como peptaiboles (Degenkolb *et al.*, 2006)

Por último, *Trichoderma* spp. entra en el interior del micelio hospedador y digiere el contenido intracelular del hongo además de otros cambios morfológicos en el hospedador (Benhamou, 1997)

1.3.2.2. Competencia por los recursos

La competencia es un aspecto importante del control biológico y ocurre cuando dos o más microorganismos requieren un mismo recurso (nutrientes, oxígeno, luz ...) en mayor medida de lo que está disponible de forma inmediata. *Trichoderma* spp. se encuentra en casi todos los suelos y también en hábitats naturales que contienen grandes cantidades de materia orgánica, donde se comporta como un excelente descomponedor de materia vegetal y fúngica. (Tejerino, 2010).

La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina, y pectinas, entre otros) y microelementos. La competencia por sustrato o espacio depende de si el mismo está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una microbiota natural (Infante *et al.*, 2009).

Algunas especies de *Trichoderma* spp. son resistentes a fungicidas y otros productos químicos, lo que le hace interesante, junto a la velocidad de crecimiento y adaptación a climas muy diversos, a la hora de colonizar suelos donde desarrollar su actividad controladora (Malmierca, 2013).

La alta adaptabilidad ecológica que muestran especies de *Trichoderma* spp. hacen de él un buen candidato para usarlo en aplicaciones de biocontrol en diferentes hábitats (Klein and Eveleigh, 1998)

Por ejemplo, la competición de *T. harzianum* por el espacio físico es un mecanismo particularmente importante para el control biológico de fitopatógenos como *B. cinerea*, causante de la “podredumbre gris” en racimos de uva (Dubos, Jailloux and Bulit, 1982)

Algunos ejemplos de cómo controla *Trichoderma* spp. al patógeno son los siguientes casos de ensayos dual que muestran en la Figura 11.



Figura 11. Ensayo dual.

1.3.2.3. Promoción del crecimiento

En los últimos años se ha comprobado la capacidad de ciertas cepas de *Trichoderma* (como *T. harzianum* y *T. virens*) para estimular el crecimiento y el desarrollo de las raíces de las plantas, lo que se traduce en un incremento de la productividad (Harman *et al.*, 2004)

Como dice Malmierca (2013) en resumen, *Trichoderma* spp. como Agente de Control Biológico (ACB) proporciona las siguientes ventajas:

- Elevada capacidad de germinación.
- Habilidad para sobrevivir en condiciones muy adversas.
- Eficiencia en la utilización de nutrientes.
- Capacidad para modificar la rizosfera.
- Agresivo con otros microorganismos.
- Eficacia para promover el crecimiento y los mecanismos de defensa de las plantas (Benhamou, 1997)

En lo relativo a las plantas, *Trichoderma* spp. promueve el crecimiento, confiere tolerancia a estreses abióticos (hídrico, salino, térmico, oxidativo) e induce la respuesta defensiva frente a patógenos. Las cepas de este hongo deben ser excelentes competidoras en la rizosfera y deben tener capacidad suficiente para colonizarla (Harman, 2006). Como simbioses, recibe nutrientes de las plantas y un lugar que colonizar a la vez que mejoran la toma de nutrientes y la capacidad defensiva de éstas (Woo and Lorito, 2007)

1.3.2.4. Inducción de mecanismos de defensa

Según Amal Al Omari (2010) y haciendo referencia a otros autores, la capacidad de distintas cepas de *Trichoderma* spp. para proteger a la planta frente a patógenos de raíz se atribuyó, durante mucho tiempo, a un efecto directo contra el patógeno (Inbar and Chet, 1992). Sin embargo, se ha demostrado que la asociación directa de *Trichoderma* con las raíces de la planta, estimula los mecanismos de defensa de la misma (Yedidia, Benhamou and Chet, 1999) lo que conlleva a una resistencia contra varios tipos de microorganismos fitopatógenos e incluso nemátodos (Harman *et al.*, 2004). Esta resistencia inducida no es específica de un determinado tipo de planta y puede ser localizada o sistémica, capacitándola para ejercer una respuesta mayor y más rápida ante el ataque de patógenos (Conrath *et al.*, 2006). Esta respuesta incluye la secreción de peroxidasas, la síntesis de fitoalexinas, la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis o “PRs” (proteínas producidas por la planta como respuesta a patógenos y heridas), la biosíntesis de compuestos terpénicos o el aumento de los niveles de ácido salicílico y ácido jasmónico. (Howell *et al.*, 2000)

1.3.2.5. Antibiosis

La antibiosis consiste en la inhibición del crecimiento de un organismo por el producto metabólico de otro. Muchas cepas de *Trichoderma* spp. liberan metabolitos secundarios, volátiles y no volátiles (Cardoza *et al.*, 2007). La actividad antibiótica de *Trichoderma* spp. fue detectada por primera vez por Weidling en 1932.

Trichoderma spp. excreta muchos metabolitos dentro de ellos enzimas (celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas) que participan en la lisis de la pared celular de las hifas del hospedante, facilitando la inserción de estructuras especializadas y de hifas de *Trichoderma* spp. que absorben nutrientes del interior del hongo fitopatógeno (Klein and Eveleigh, 1998)

Muchas cepas de *Trichoderma* spp. producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibidoras son consideradas “antibióticos” (Kubicek and Harman, 1998)

La producción de metabolitos secundarios es dependiente de la cepa y de las condiciones ambientales, que determinan que compuestos se sintetizarán y en qué cantidad (Cardoza *et al.*, 2007).

Como clasifica Amal Al Omari (2010) de manera general, en base a las estructuras identificadas hasta ahora de los diferentes metabolitos que exhiben actividad antibiótica en *Trichoderma* spp. se pueden distinguir dos grupos principales:

Metabolitos de bajo peso molecular (< 3000 Da) y volátiles: incluyen compuestos aromáticos sencillos, poliquétidos como pironas y butenolidos, terpenos volátiles y de tipo isociano, sustancias relativamente no polares que tienen una presión de vapor significativa. En el ambiente del suelo, estos compuestos orgánicos volátiles (VOCs) podrían recorrer distancias a través del sistema edáfico y la rizosfera, y mejorar la condición de un organismo al mejorar la fisiología de otros organismos competidores, como sucede con la 6-pentil- α -pirona (6PP) (Keszler y col., citado en Tejerino, 2010).

Metabolitos de alto peso molecular y polares: incluye peptaiboles que puede exhibir su actividad en interacción directa por contacto entre especies de *Trichoderma* spp. y sus antagonistas (Kubicek and Harman, 1998)

Entre los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana más representativos del género *Trichoderma* spp. están los peptaiboles, los poliquétidos y los terpenos (Cardoza *et al.*, 2007).

Trichoderma spp. en la planta de vid

Las especies de *Trichoderma* spp. sirven como agentes de biocontrol para proteger las heridas de poda de las viñas contra hongos patógenos de la madera (Mutawila *et al.*, 2011). Debido a la mayor preocupación pública por un entorno seguro, las estrategias de biocontrol contra los hongos causantes de enfermedades de la madera con el fin de reemplazar o sustituir a los productos químicos, son cada vez más interesantes.

El efecto de supresión de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno podría ser debido a las especies mismas de este hongo, podría ser el resultado de la interacción de *Trichoderma*-planta o el resultado de ambas a la vez. Ensayos *in vitro* han demostrado las propiedades antagonistas de *Trichoderma* spp. contra patógenos de la madera de la vid mediante micoparasitismo, antibiosis con compuestos volátiles y no volátiles y la competición por nutrientes y espacio (John *et al.*, 2005)

Las vides responden a la infección del tejido vascular produciendo geles y tilosis que ocupan los vasos y que proporcionan barreras mecánicas y biomecánicas que compartimentan la infección y detienen o restringen la propagación del patógeno. La tilosis son extrusiones celulares formadas a partir de células parenquimatosas en el interior del vaso xilemático. Mientras que los geles son sustancias fluidas segregadas en el interior del vaso desde las células parenquimatosas. Se pueden apreciar en más detalle en la Figura 12 (Mutawila *et al.*, 2011)

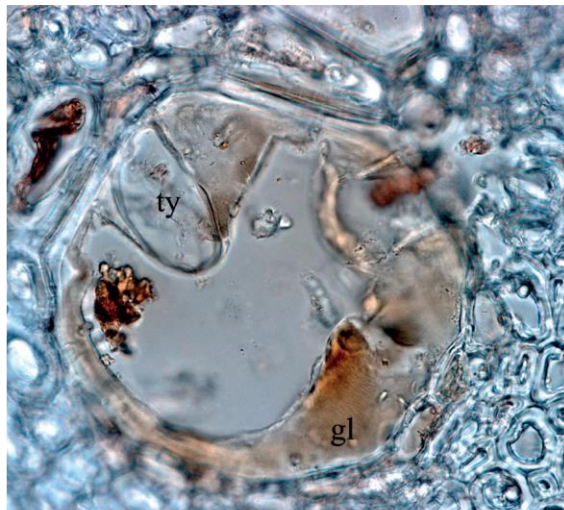


Figura 12. Tilosis y gomas en vaso de xilema.

(Fuente: Mutawila *et al.*, 2011)

Según Mutawila *et al* (2011) en su estudio de como *Trichoderma* spp. protege contra patógenos de la madera, dice que tras un estudio histológico *Trichoderma* spp. crece de manera más extensa en el xilema que en la medula, en el interior de la planta de vid.

En viticultura está demostrado que el uso de cepas de *Trichoderma* spp. reduce la incidencia de enfermedades, protege contra hongos del suelo y mejora el sistema radicular de las nuevas plantas de vid.

Las enfermedades de la madera de la vid son un grupo de hongos patógenos emergentes que llegan a causar graves problemas y dan lugar a diferentes enfermedades al colonizar la madera. Representan un grave problema en todos los viñedos del mundo y principalmente son Pie negro, Enfermedad de Petri, Yesca, Eutipiosis o Brazo muerto.

Los efectos como agente de control biológico dependen de las condiciones climáticas y de qué tipo de *Trichoderma* spp. es. Aun así, las distintas especies colonizan las heridas de poda y previenen contra la entrada de patógenos que englobamos como enfermedades de la madera de la vid. *Trichoderma* spp. debe ser aplicado todos los años para prevenir mejor (Winetwork *et al.*, 2015).

Diversos estudios según Malmierca (2013) han revelado que la interacción *Trichoderma*-planta da lugar a cambios en el transcriptoma y proteoma de la planta. Los compuestos fúngicos implicados en la inducción de respuestas en la planta incluyen:

Enzimas hidrolíticas: xilanasas, celulasas, endoquitinasas, etc. Inducen la expresión de proteínas relacionadas con defensa, la biosíntesis de fitoalexinas, el crecimiento de la raíz o la resistencia a enfermedades.

Peptaiboles: son pequeños péptidos lineales (de entre 7 y 20 residuos) producidos por un péptido sintetasa no ribosomal. Se ha demostrado su actividad antimicrobiana y su capacidad para inducir respuestas de defensa en plantas.

Oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular: inducen la expresión de proteínas relacionadas con patogenicidad (PR), la lignificación en el lugar de la infección y la generación de ROS, y también reducen la respuesta defensiva en la planta.

A la luz de todos los conocimientos existentes y los resultados obtenidos por las múltiples investigaciones relacionadas en el Grupo Universitario de Investigación en Ingeniería y Agricultura Sostenible (GUIIAS) de la Escuela de Ingeniería Agraria y Forestal en León (EIAF) en este ámbito se hace interesante conocer cómo se mueve *Trichoderma* spp. dentro de las plantas de vid. Este estudio se centra en dar respuesta a ello mediante la inoculación de *Trichoderma* spp. a diferentes concentraciones en plantas de vid de la variedad tempranillo colocadas en macetas cuyo periodo vegetativo ha sido controlado desde la plantación hasta la poda e inoculación de *Trichoderma* spp. para su posterior estudio del movimiento interno en las vides.

Se debe tener en cuenta que *Trichoderma* spp. se utiliza como tratamiento preventivo ya que curativo en su totalidad aún no hay estudios que lo demuestren fielmente. Siempre y cuando

se den las condiciones adecuadas este hongo puede prevenir eficazmente las infecciones en las heridas tras la poda colonizando en un periodo corto de tiempo los tejidos de la madera que están por debajo hasta 1-2 cm y podría inhibir la germinación de esporas indeseadas (Marco, 2014). Para un buen resultado debe de ser aplicado en las heridas de la poda lo antes posible y en condiciones climatológicas que no sean adversas tales como la lluvia ya que lavaría el producto biológico a base de *Trichoderma* spp..

En este estudio no se da el problema de la climatología adversa ya que se desarrolla en los invernaderos y fitotrones de la universidad.

Resumiendo, se exponen los efectos más significativos de este hongo en la Figura 13.

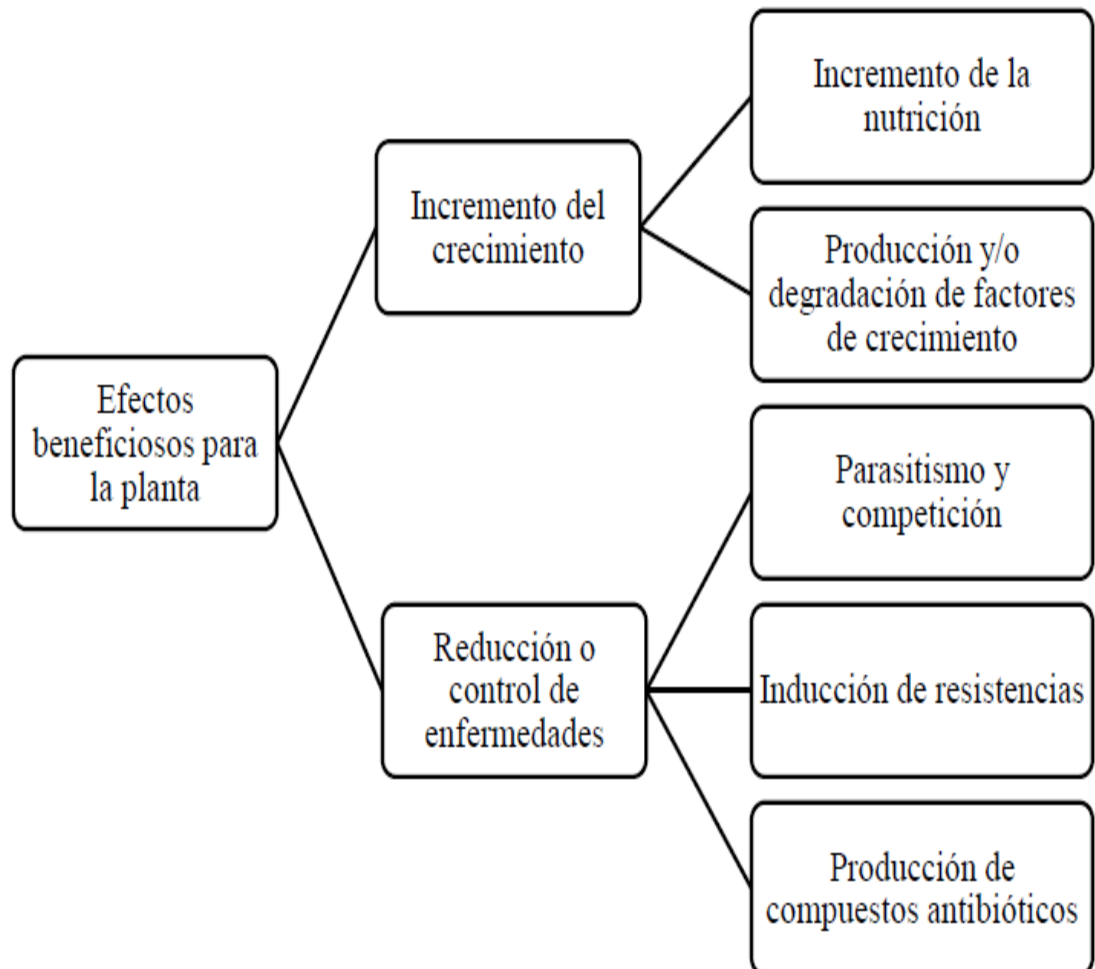


Figura 13. *Trichoderma* spp. y efectos beneficiosos para la planta.

(Fuente: Mayo, 2015)

2.- OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio es evaluar la capacidad de colonización de distintos aislados de *Trichoderma* spp. procedentes de viñedo sobre la madera de la vid, así como su capacidad de persistencia durante la fase de parada vegetativa. Se compararán los resultados entre ellos con el fin de evaluar si existen diferencias entre los distintos aislados y si ha existido un movimiento dentro de la propia planta, manifestando con ello la capacidad de persistencia sobre la misma durante un largo periodo de tiempo.

3.- MATERIAL Y METODOS

Este estudio se desarrolló en los laboratorios de investigación, que se encuentran ubicados en la EIAF.

3.1. Materiales

3.1.1. Organismos utilizados

Los organismos utilizados para este estudio principalmente son dos: hongos filamentosos y plantas de vid.

3.1.1.1. Hongos filamentosos

Se utilizarán aislados de suelo y planta de *Trichoderma* spp. En concreto se utilizarán 3 aislados de *Trichoderma* spp. que previamente han sido ensayados en laboratorio y que han sido los que mejores resultados han obtenido frente a patógenos que causan enfermedades de madera de vid. Cada aislado se aplicó a una concentración determinada, y se les denomina de la siguiente manera: T1, es un aislado procedente de suelo, T2 y T3 son el mismo aislado pero ensayado a dos concentraciones diferentes, por lo que en este ensayo se consideran de manera diferente. Y T4 es un aislado procedente de planta.

3.1.1.2. Material vegetal

El material vegetal se compone de plantas de vid de un año de edad de la variedad tempranillo injertadas sobre R-110. Estas plantas se adquieren a raíz desnuda, como se muestra en la Figura 14 en un vivero de la zona. Las vides disponen de pasaporte fitosanitario.



Figura 14. plantas de vid a raíz desnuda.

Se usan 40 plantas y se hicieron 5 tratamientos con 8 repeticiones cada uno. Se tiene un control como tratamiento 1 y los restantes tratamientos son cada uno de los cuatro aislados de *Trichoderma* mencionados en el apartado anterior.

Las plantas de vid se desarrollaron en un invernadero y en un fitotrón con unas condiciones de temperatura y humedad controladas. En el apartado de metodología se explicará más detalladamente.

3.1.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo para hongos, bacterias y levaduras son esenciales en los laboratorios donde se estudia fitopatología por lo que, casi a diario se preparan y utilizan. Un medio de cultivo es una mezcla de nutrientes que en condiciones adecuadas permite el crecimiento de los microorganismos.

3.1.2.1. Medios de cultivo para hongos

Los medios usados fueron PDA y RBA+cloranfenicol

PDA

El medio Patata, Dextrosa y Agar (PDA), se trata de un medio de cultivo microbiológico generalista compuesto por:

- Extracto de patata 4 g/l
- Dextrosa 20 g/l
- Agar 15 g/l
- pH final 5,6 +/- 0,2 (at 25°)

RBA + cloranfenicol

El medio Rosa Bengala Cloranfenicol Agar (RBA+ Cloranfenicol) está compuesto por:

- Dextrosa 10 g/l
- Peptona bacteriológica 5 g/l
- Fosfato potásico 1 g/l
- Sulfato magnésico 0,5 g/l
- Chloramfenicol 0,1 g/l
- Rosa de Bengala 0,05 g/l
- Agar bacteriológico 15 g/l
- Ph final 7,2 +/- 0,2 (at 25°C)

En la Figura 15 se hace una comparativa entre PDA y RBA de placas Petri preparadas en laboratorio para el cultivo de hongos.

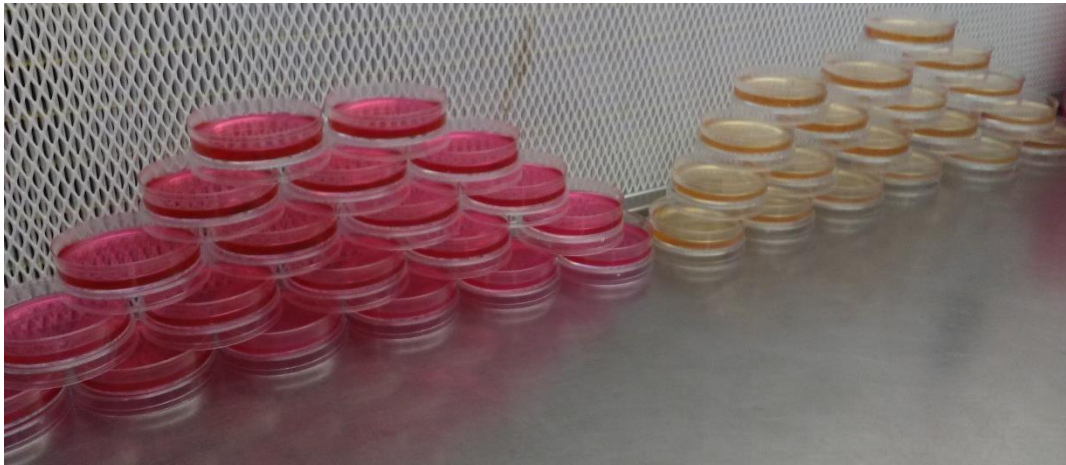


Figura 15. medio RBA (izquierda) y medio PDA (derecha).

3.1.2.2. Sustratos para plantas

Las plantas de vid fueron plantadas en macetas de 16 cm de diámetro por 21,5 cm de alto con sustrato (70%) y perlita (30%). El sustrato utilizado es para siembra Tipo 3 Special. Es una turba negra tipo sphagnum y en la Figura 16 se detallan sus características.

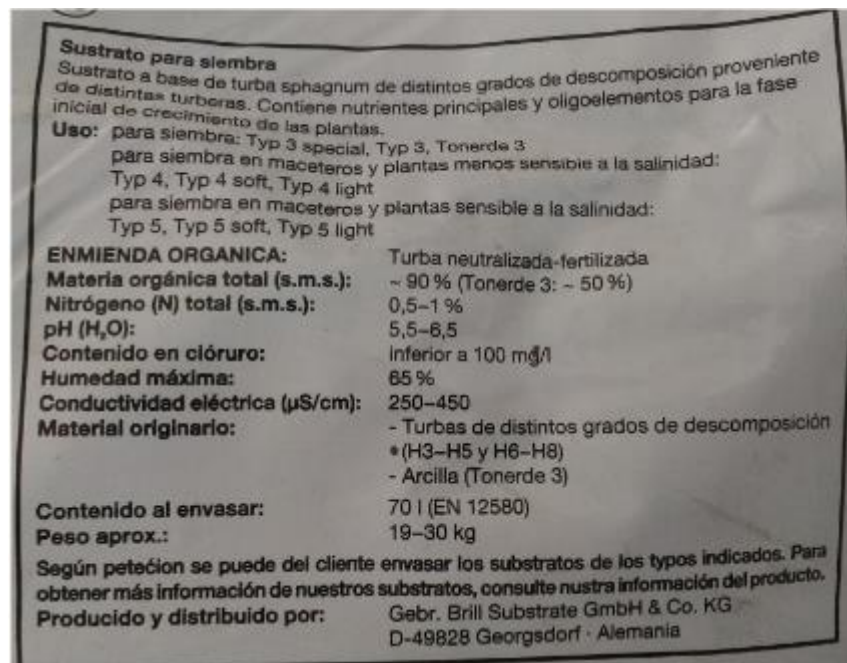


Figura 16. Información del saco de 70 L de sustrato para siembra Tipo 3 Special.

La perlita utilizada es un material inorgánico transformado, compuesto por silicato de aluminio (Al), presenta una porosidad elevada (86-97%), es inerte y tiene baja capacidad de intercambio catiónico. Presenta algún inconveniente como es que a pH bajo puede solubilizarse el Al y resultar tóxico para las plantas. Fue utilizada con el fin de retener agua en el sustrato.

La mezcla de turba y perlita se hizo con ayuda de una hormigonera procedente del Laboratorio de Construcciones.

3.1.3. Instrumental

El instrumental utilizado se compone de los materiales comúnmente usados en los laboratorios así otros materiales o instalaciones presentes en la EIAF, el material utilizado queda recogido en la siguiente tabla, Tabla 4.

Tabla 4. Listado del instrumental empleado.

Instrumental genérico
Macetas
Hormigonera
Báscula
Báscula de precisión
Lámparas fluorescentes
Guantes desechables
Tijeras
Pinzas
Mechero
Escalpelos
Asa de siembra
Pipetas
Puntas para pipetas
Eppendorfs
Placas Petri
Rotuladores
Agua destilada
Lejía
Etanol
Recipientes de cristal
Vasos de precipitados
Probetas

Tijeras de podar
Manguera para agua
Regaderas

Instrumental específico

Fitotrón
Autoclave
Bolsas de autoclave
Cámara de flujo laminar
Microscopio
Cubreobjetos
Cámara de Neubauer

3.2. Metodología

Las metodologías y manera de proceder en cada momento se detallan a continuación de manera cronológica según momentos del estudio:

3.2.1. Plantación y mantenimiento.

3.2.1.1. Plantación de las vides.

La primera semana de junio se plantan 40 plantas de vid de variedad tempranillo sobre R110 de un año de edad en macetas dentro del invernadero. Primeramente, se lavaron y desinfectaron; posteriormente con ayuda de una hormigonera se mezcla el sustrato y perlita a razón de 70-30, respectivamente y finalmente se coloca una planta por maceta aplicándose un primer riego como se ve en la Figura 17 y se disponen durante una semana en una cámara del invernadero con el fin de conseguir temperaturas elevadas que rondan los 30° para inducir la activación de las yemas. Después de dicho periodo se introducen en un fitotrón quedando distribuidas a ambos lados del fitotrón como se puede apreciar en la Figura 18.



Figura 17. Plantación de vides en macetas y aplicación del primer riego.



Figura 18. Vides en parte derecha del fitotrón.

3.1.1.2. Control de las plantas de vid en fitotrón.

El fitotrón es un espacio destinado al crecimiento y cultivo de plantas en el que se consigue un control preciso de las condiciones ambientales deseadas para cada cultivo como pueden ser la humedad o el fotoperiodo. Manteniendo a las plantas protegidas de posibles contaminaciones externas.

Las vides estuvieron en el fitotrón durante todo el periodo vegetativo consiguiendo buenos desarrollos con un tutor, como se aprecia en la Figura 19, hasta que entraron en parada vegetativa,

momento en el cual se agostan y sus pámpanos se lignifican, correspondiéndose este momento con noviembre del año 2017.



Figura 19. Vides con buen desarrollo vegetativo y entutoradas.

Se mantuvo a una temperatura constante de 24°C durante el experimento y para inducir un agostamiento de las plantas, se redujo gradualmente durante el último mes la temperatura hasta alcanzar una temperatura de 18°C y un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad en el fitotrón, consiguiendo de forma artificial un agostamiento de las mismas.

Se aplicó un riego semanal a excepción del mes de agosto que se aplicó riego más a menudo según necesidades hídricas de las plantas. La cronología del riego queda reflejada en la Tabla 5.

Tabla 5. Periodicidad del riego por meses.

Mes	Día						
Junio	2	9	16	23	30		
Julio	5	14	20	27			
Agosto	4	14	16	18	23	28	31
Septiembre	7	15	22	29			
Octubre	3	10	17	23	30		

3.2.2. Siembra, preparación e inoculación de *Trichoderma* sp.

3.2.2.1. Preparación de esporas de las cepas de *Trichoderma* sp.

Para ello se buscaron las cepas de *Trichoderma* sp. de interés que estaban almacenadas en eppendorfs en congelador a -20°C. Se siembra un volumen de 100 µl en 3 placas de Petri en medio

PDA de cada cepa de interés. Se utilizaron tres cepas de *Trichoderma* sp. Posteriormente, se dejó incubar en laboratorio a temperatura ambiente durante una semana. Pasado el tiempo de incubación se extraen esporas de las placas Petri con el hongo esporulado como se visualiza en la Figura 20 y se preparan las diferentes concentraciones de esporas del hongo para inocular.



Figura 20. Hongo esporulado.

Para la preparación de las esporas para la inoculación se procede de la siguiente manera:

- Paso 1. Se añade 10 ml de agua destilada a la placa Petri y se raspa la superficie con el fin de coger el mayor número de esporas.
- Paso 2. Se recoge con una pipeta y se coloca en tubo falcon al que se ha puesto un papel de filtro y sobre el que queda el micelio del hongo, pero se filtran las esporas que es el material que nos interesa, queda recogido en la Figura 21.

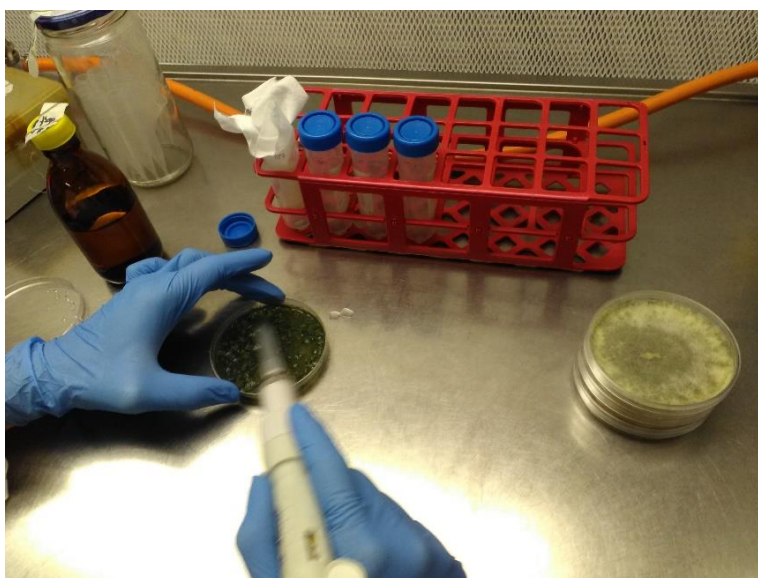


Figura 21. Hongo esporulado.

- Paso 3. Se pone una muestra de esporas de cada aislado en una cámara Neubauer para ver la concentración de las mismas. La muestra se coloca con ayuda de una micropipeta de tal manera que la solución quede bien distribuida en la cámara, tal y como se muestra en la Figura 22, seguidamente se coloca al microscopio con los aumentos adecuados y se hace el recuento de las esporas en los cuadrados de los extremos para calcular la concentración, las esporas se ven claramente en la cámara como muestra la Figura 23 y por último sabiendo la concentración final a la que queremos nuestros aislados calculamos la concentración inicial mediante la sencilla fórmula de $V_i \cdot C_i = V_f \cdot C_f$.



Figura 22. Colocación de la muestra en la cámara de Neubauer.

(Fuente: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>)

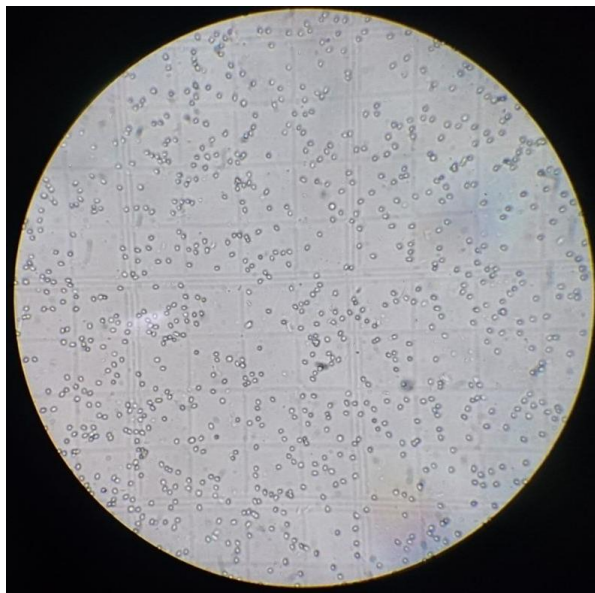


Figura 23. Esporas en cuadrícula de la cámara de Neubauer.

Así conocemos las diferentes concentraciones que se usaron para la inoculación de las plantas de vid. Mediante la revisión de otros estudios similares como los de John *et al* (2005) y John *et al* (2008) se llega a la conclusión de que el valor de 2×10^7 esporas/ml es un valor adecuado para la concentración de *Trichoderma* sp. Éstas fueron:

T1: 2×10^6 esporas/ml.

T2: 2×10^6 esporas/ml.

T3: 2×10^7 esporas/ml.

T4: 2×10^7 esporas/ml.

3.2.2.2. Poda de las vides.

Las vides se podaron a guyot simple en noviembre de 2017 dejando un pulgar de unos 6 cm con dos yemas claramente vistas, que fue donde se inoculó *Trichoderma* sp. y donde se va a estudiar si hay movimiento o no, como se muestra en la Figura 24.

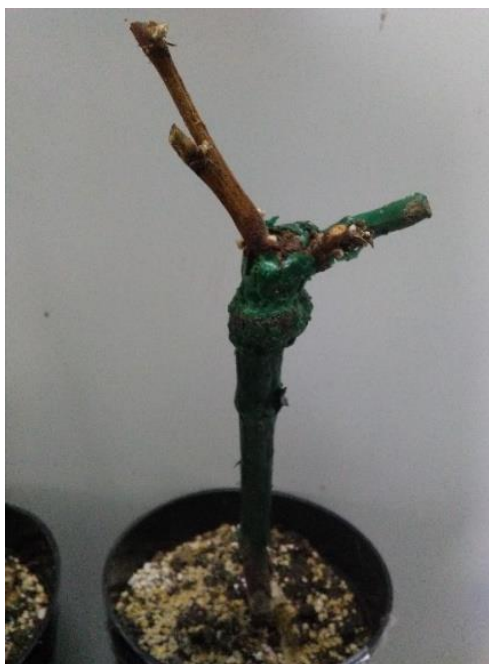


Figura 24. Vid podada.

3.2.2.3. Inoculación de las esporas.

Las esporas se inocularon en las plantas pasadas 24 horas de la poda ya que según los estudios de John *et al* (2005) y John *et al* (2008) es más efectivo para la aplicación, es decir, cuando la herida de la poda está aún reciente *Trichoderma* sp. tiene más facilidad de asentarse y desarrollarse. Se aplicó 50 microlitros de solución de esporas en la herida de poda, de tal manera que se consiguen 4 tratamientos y 1 control. En el control solo se aplicó agua destilada autoclavada. Con el fin de favorecer que la aplicación sea efectiva y se consiga que el hongo penetre a través de los haces vasculares y no por el exterior, se colocó a cada planta un soporte de plastilina a modo de embudo como se aprecia en la Figura 25. La plastilina es un material compuesto a base de sales de calcio y vaselina que no es tóxico para la planta. Esta inoculación se realizó a 6°C y con un 20% de humedad relativa en el invernadero como se muestra en la Figura 26.



Figura 25. Colocación del soporte de plastilina.



Figura 26. Plantas de vid ya inoculadas con *Trichoderma* sp. y con el soporte de plastilina (azul)

Se tiene a una humedad y temperatura ambiental desde noviembre hasta febrero con unas oscilaciones de temperatura de entre 25 y 0 °C.

3.2.3. Recolección de plantas y siembra de material vegetal.

3.2.3.1. Preparación de medio de cultivo RBA en placas Petri.

Transcurridas doce semanas tras la inoculación de *Trichoderma* sp. en planta, se preparan las placas de Petri de RBA + cloranfenicol donde posteriormente se sembrarán las partes de madera de las vides para ver y evaluar hasta donde se ha movido *Trichoderma* sp. Todo ello se realizó en la campana de flujo laminar y evitando la contaminación como se muestra en la Figura 27.



Figura 27. Preparación de placas Petri de RBA + chloramphenicol.

3.2.3.2. Corte y procesamiento de las plantas de vid.

Este mismo día se procede a la corta de las plantas de vid para realizar el estudio. Se cortan en la base de la planta como se aprecia en la Figura 28. Entre cada planta se desinfecta la tijera de podar introduciendo la hoja en un recipiente que contenía una disolución al 50% agua destilada y 50% lejía. Cada planta de cada tratamiento se introduce en una bolsa con su nomenclatura.



Figura 28. Corte de la planta a ras del sustrato.

3.2.3.3. Siembra de madera de las plantas de vid.

A lo largo de todo el día se realizó la siembra de madera de las vides. Dentro de la campana de flujo laminar se marca cada vid cada 3 cm empezando por el punto de inoculación de esporas hasta los 15 cm y se cortan con tijera de podar como se aprecia en las Figuras 29 y 30. Las tijeras de podar se desinfectan entre cada corte.

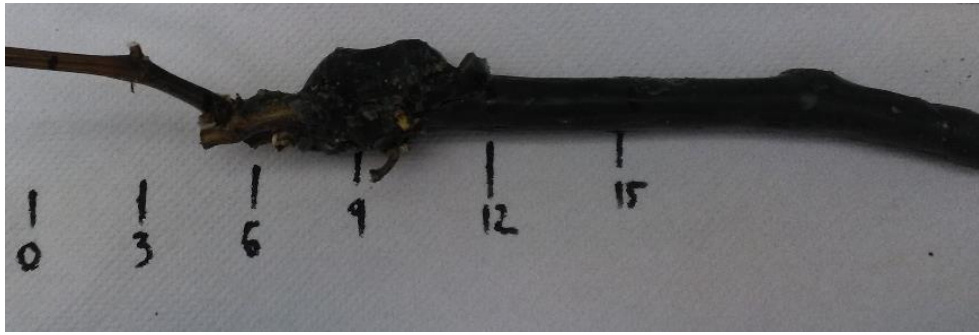


Figura 29. Vid marcada cada 3 cm.

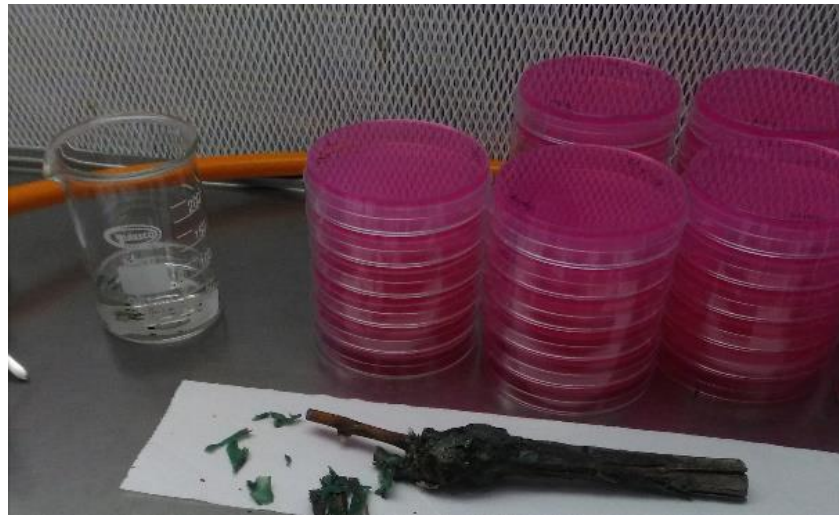


Figura 30. Corte de la vid.

Una vez obtenidos los cortes, se extraen un total de 8 astillas de cada uno cogiendo del interior de la planta y quitando la corteza, que es donde se debe manifestar la presencia de *Trichoderma* sp. Las muestras se cortan con escalpelo y ayudándose de pinzas, para ello se va desinfectando el material entre cada parte de la planta para evitar la contaminación y se colocan en círculo sobre la placa Petri de RBA + Chloramphenicol. este proceso se ve en la Figura 31. Y un corte transversal se aprecia en la Figura 32.



Figura 31. Siembra de las muestras de madera.



Figura 32. Corte transversal

3.2.3.4. Incubación y evaluación.

Una vez sembradas las placas, se colocan en orden y por cada planta, se dejan incubar durante 15 días, que será el tiempo necesario hasta poder ver si se desarrolla *Trichoderma* sp. Se realiza una inspección visual cada 3 días de las placas y se anota en aquellas en las que se empieza

a desarrollar *Trichoderma* sp. Y se confirma tras este periodo de tiempo observándose lo que se puede ver en las Figuras 33, 34, 35, 36 y 37 siendo el Control, T1, T2 T3 y T4, respectivamente.

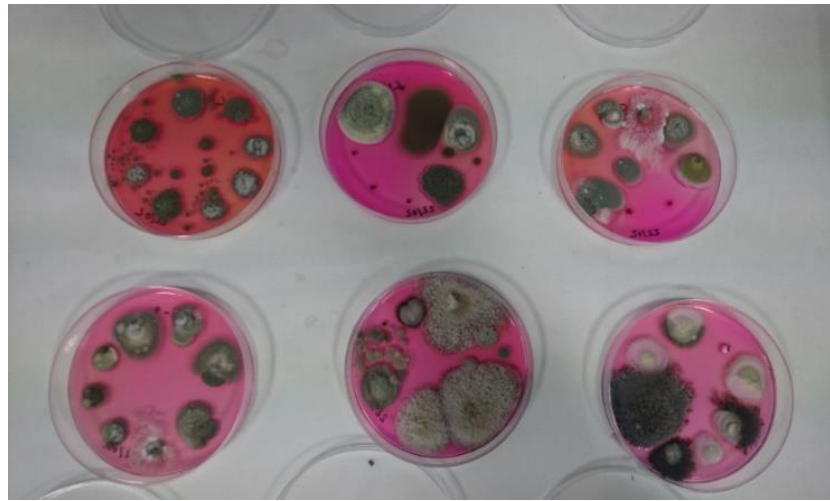


Figura 33. Repeticiones del Control.

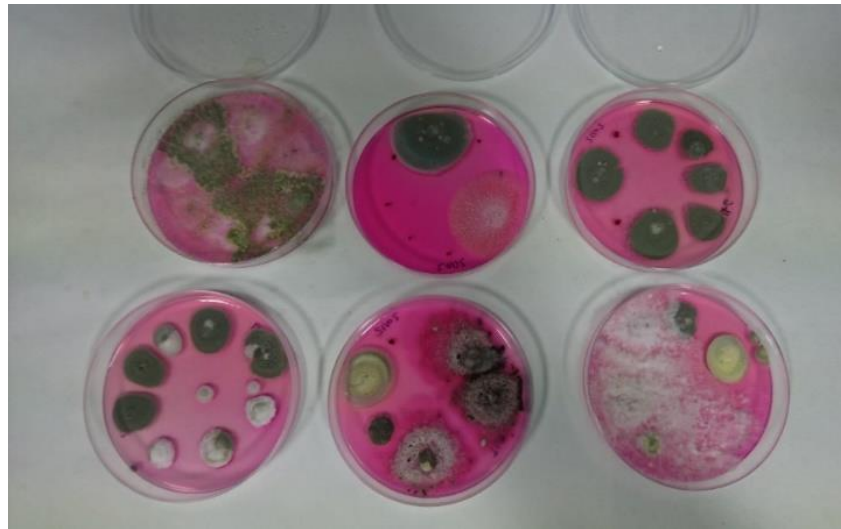


Figura 34. Repeticiones de T1

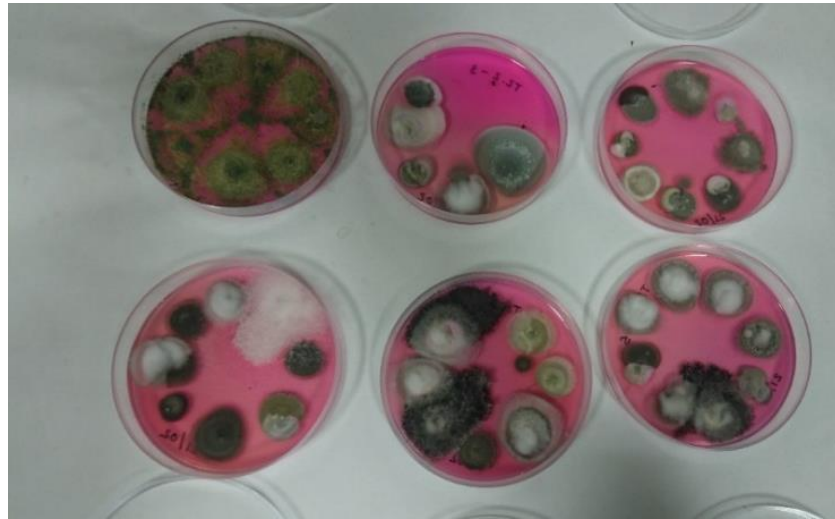


Figura 35. Repeticiones de T2

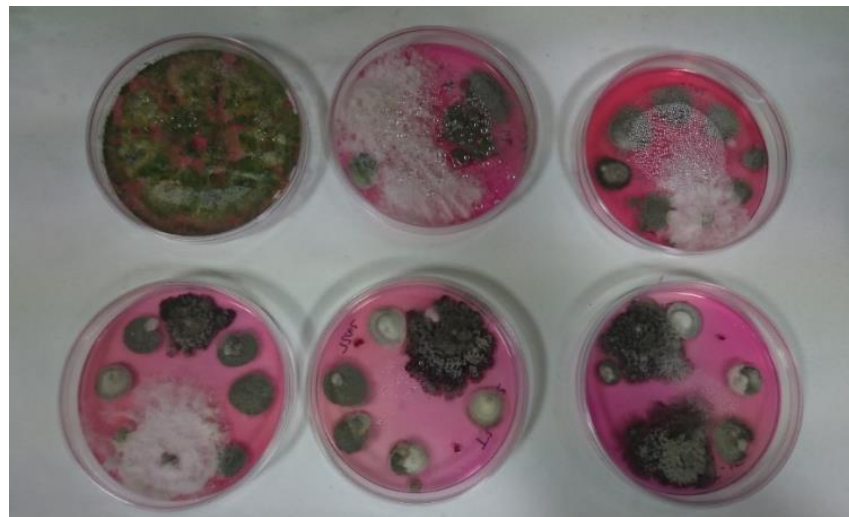


Figura 36. Repeticiones de T3

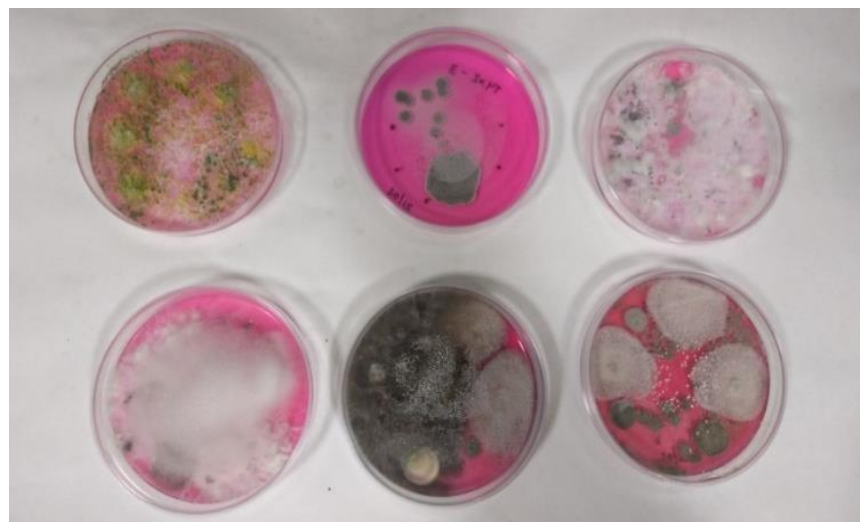


Figura 37. Repeticiones de T4

4.- RESULTADOS

4.1. Análisis de los resultados

Tras el periodo de incubación se observa en las placas Petri de RBA donde ha crecido *Trichoderma* sp, en que planta y en qué tipo de muestra (de 0-15 cm).

Para hacer una rápida visualización de los datos, éstos se muestran en las siguientes Tablas y sus correspondientes Figuras de Excel, tratándose de Control, T1, T2, T3 y T4.

4.1.1. Control

Tabla 6. Resultados Control

CONTROL	0 cm	3 cm	6 cm	9 cm	12 cm	15 cm
	% Hongo	% Hongo	% Hongo	% Hongo	% Hongo	% Hongo
C-R1	0	0	0	0	0	0
C-R2	0	0	0	0	0	0
C-R3	0	0	0	0	0	0
C-R4	0	0	0	0	0	0
C-R5	0	0	0	0	0	0
C-R6	0	0	0	0	0	0
C-R7	0	0	0	0	0	0
C-R8	0	0	0	0	0	0

Como era de esperar en el Control no debería haberse desarrollado ningún *Trichoderma* ya que no fue inoculado, por lo que no se muestran gráficos del control debido a que todos los valores de % de presencia de *Trichoderma* son 0 y quedarían gráficos que no aportan información. Por el contrario, en el resto de tratamientos si se muestran gráficos donde ha habido movimiento del hongo que han sido a 0 cm y a 3 cm. En el resto de distancias no se encontró por lo que no se realizó gráfico alguno.

4.1.2. T1

Tabla 7. Resultados T1

T1	Repetición							
	T1-R1	T1-R2	T1-R3	T1-R4	T1-R5	T1-R6	T1-R7	T1-R8
0 cm	87,5	50	75	87,5	62,5	75	62,5	62,5
3 cm	0	0	0	0	0	0	0	12,5
6 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
9 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
12 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
15 cm	0	0	0	0	0	0	0	0

Se observa cómo se desarrolló el hongo en todas las repeticiones a 0 cm y en una repetición (T1-R8) a 3 cm.

Como se muestra en la Figura 38, en las 8 repeticiones del T1 a 0 cm se desarrolló el hongo siendo en las que más la R1 y R4 con 87,5% y en la que menos R2 con 50%.

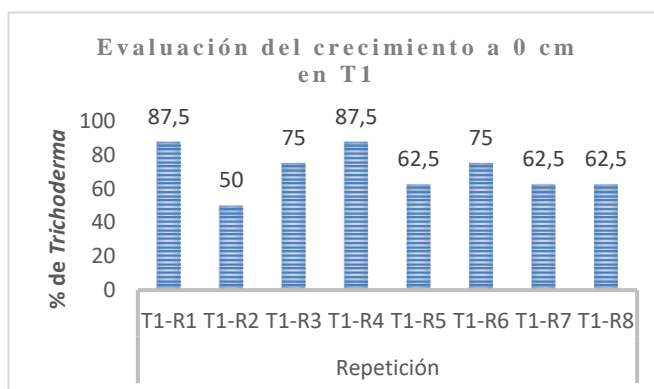


Figura 38. Evaluación del crecimiento a 0 cm en T1.

Como se muestra en la Figura 39 solo en 1 repetición del T1 a 3 cm se desarrolló el hongo, siendo esta la R8 con un 12,5%.

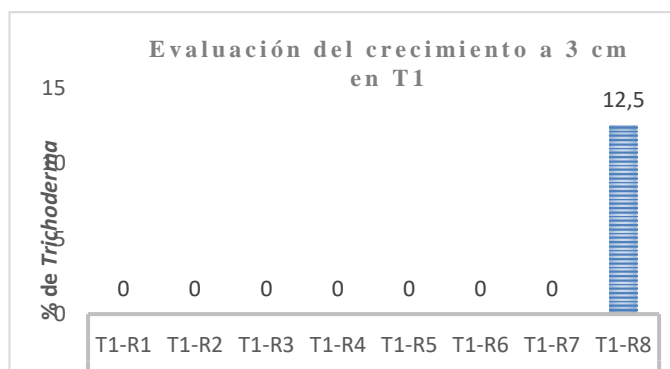


Figura 39. Evaluación del crecimiento a 3 cm en T1.

4.1.3. T2

Tabla 8. Resultados T2

T2	Repetición							
	T1-R1	T1-R2	T1-R3	T1-R4	T1-R5	T1-R6	T1-R7	T1-R8
0 cm	75	100	87,5	87,5	25	100	25	87,5
3 cm	0	0	12,5	0	0	0	0	0
6 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
9 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
12 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
15 cm	0	0	0	0	0	0	0	0

(Fuente: elaboración propia)

Se observa desarrollo del hongo en todas las repeticiones a 0 cm y en una repetición (T2-R3) a 3 cm.

En la Figura 40 se aprecia como a 0 cm en T2 todas las repeticiones tienen hongo, en R2 y R3 es donde mayor es su presencia con el 100% y en R5 y R7 donde menor con un 25%

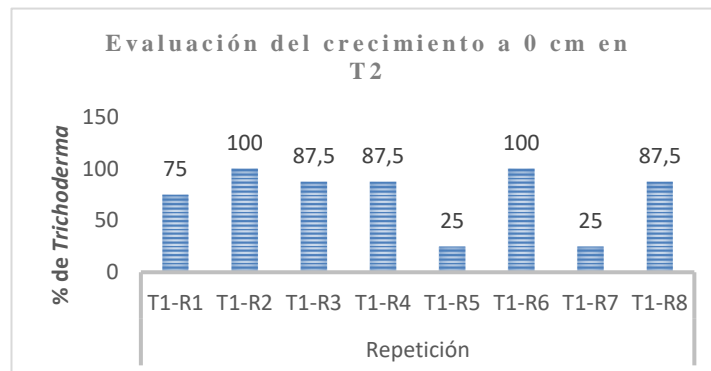


Figura 40. Evaluación del crecimiento a 0 cm en T2.

En la Figura 41 se aprecia como a 3 cm en T2 solo una repetición desarrolló el hongo que fue la R3 con un 12,5%

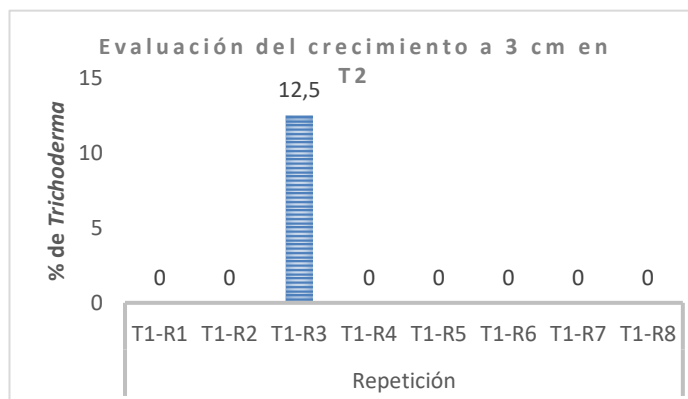


Figura 41. Evaluación del crecimiento a 3 cm en T2.

4.1.4. T3

Tabla 9. Resultados T3

T3	Repetición							
	T1-R1	T1-R2	T1-R3	T1-R4	T1-R5	T1-R6	T1-R7	T1-R8
0 cm	100	100	62,5	50	100	100	75	87,5
3 cm	0	0	0	12,5	0	0	0	0
6 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
9 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
12 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
15 cm	0	0	0	0	0	0	0	0

Se observa desarrollo del hongo en todas las repeticiones a 0 cm y en una repetición (T3-R4) a 3 cm.

En la Figura 42 se aprecia como a 0 cm en T3 se desarrolló el hongo en todas las repeticiones siendo donde más en R1, R2, R5 y R6 y donde menos en R4 con un 50%

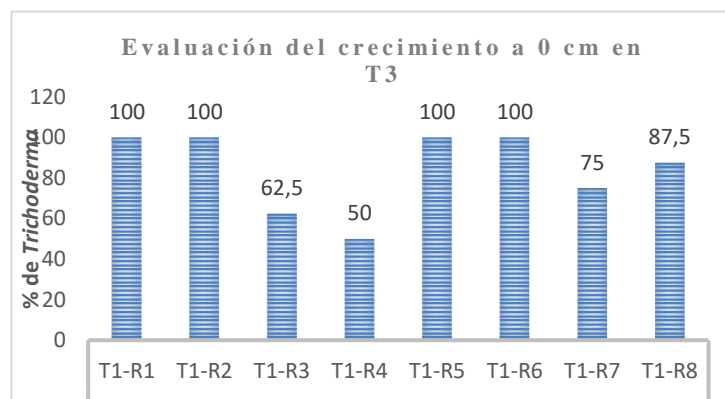


Figura 42. Evaluación del crecimiento a 0 cm en T3.

En la Figura 43 se aprecia como a 3 cm en T3 se desarrolló el hongo en una sola repetición que fue la R4 con un 12,5%

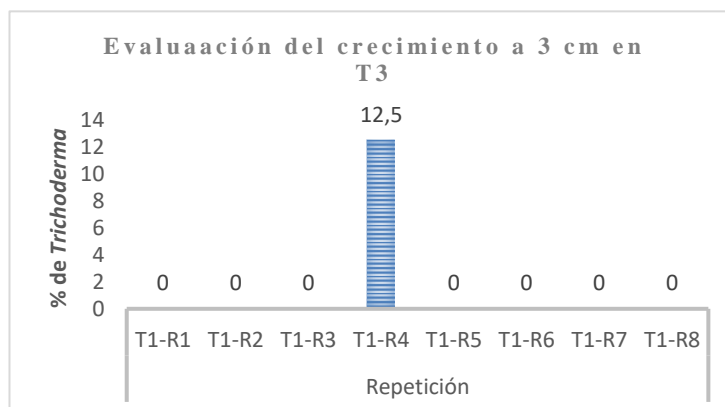


Figura 43. Evaluación del crecimiento a 3 cm en T3.

4.1.5. T4

Tabla 10. Resultados T4

T4	Repetición							
	T1-R1	T1-R2	T1-R3	T1-R4	T1-R5	T1-R6	T1-R7	T1-R8
0 cm	100	12,5	87,5	87,5	87,5	87,5	12,5	100
3 cm	0	0	0	12,5	37,5	0	12,5	12,5
6 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
9 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
12 cm	0	0	0	0	0	0	0	0
15 cm	0	0	0	0	0	0	0	0

Se observa el desarrollo del hongo en todas las repeticiones a 0 cm y en cuatro repeticiones (T4-R4; T4-R5; T4-R7 y T4-R8) a 3 cm.

La Figura 44 se corresponde con 0 cm del T4 y el hongo se desarrolló en todas las repeticiones, siendo mayor en R1 y R8 con 100% y menor en R2 y R7 con 12,5%.

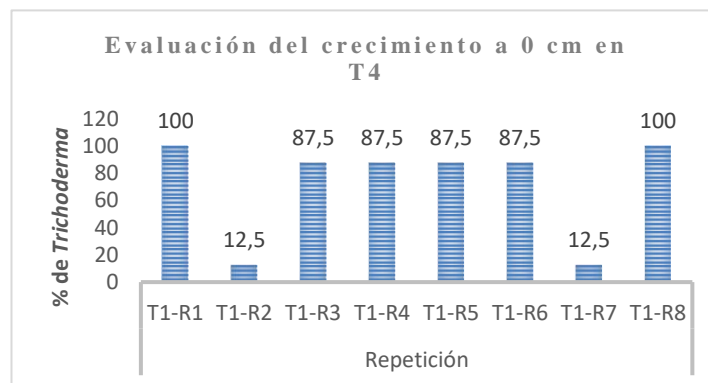


Figura 44. Evaluación del crecimiento a 0 cm en T4

La Figura 45 se corresponde con 3 cm del T4 y el hongo se desarrolló en varias repeticiones.

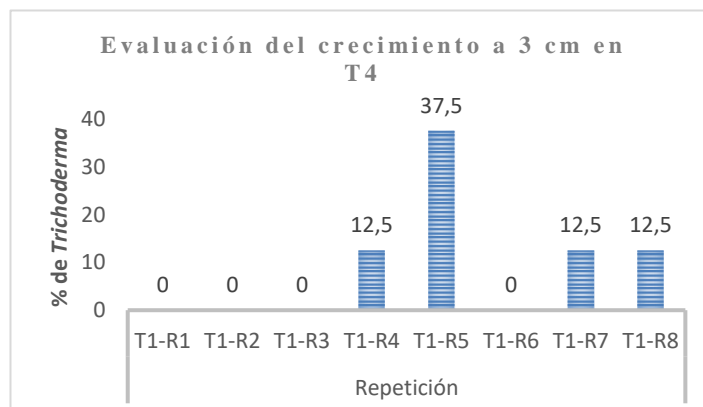


Figura 45. Evaluación del crecimiento a 3 cm en T4

4.2. Análisis estadístico

Este procesamiento de datos y análisis estadístico se hace con ayuda del programa Producto de Estadística y Solución de Servicio (SPSS) Se realiza analizando y comparando las medias de cada aislado. Para ello se usa el análisis de varianza (ANOVA) de un factor-comparaciones múltiples Post-hoc-Duncan con un nivel de significancia de 0,05.

El ANOVA de un factor nos sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. Esta prueba es una generalización del contraste de igualdad de medias para dos muestras independientes. Se aplica para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal (Tobergte and Curtis, 2013)

Los pasos a seguir para calcular si existen diferencias significativas serían los siguientes que quedan reflejados en la Figura 46:

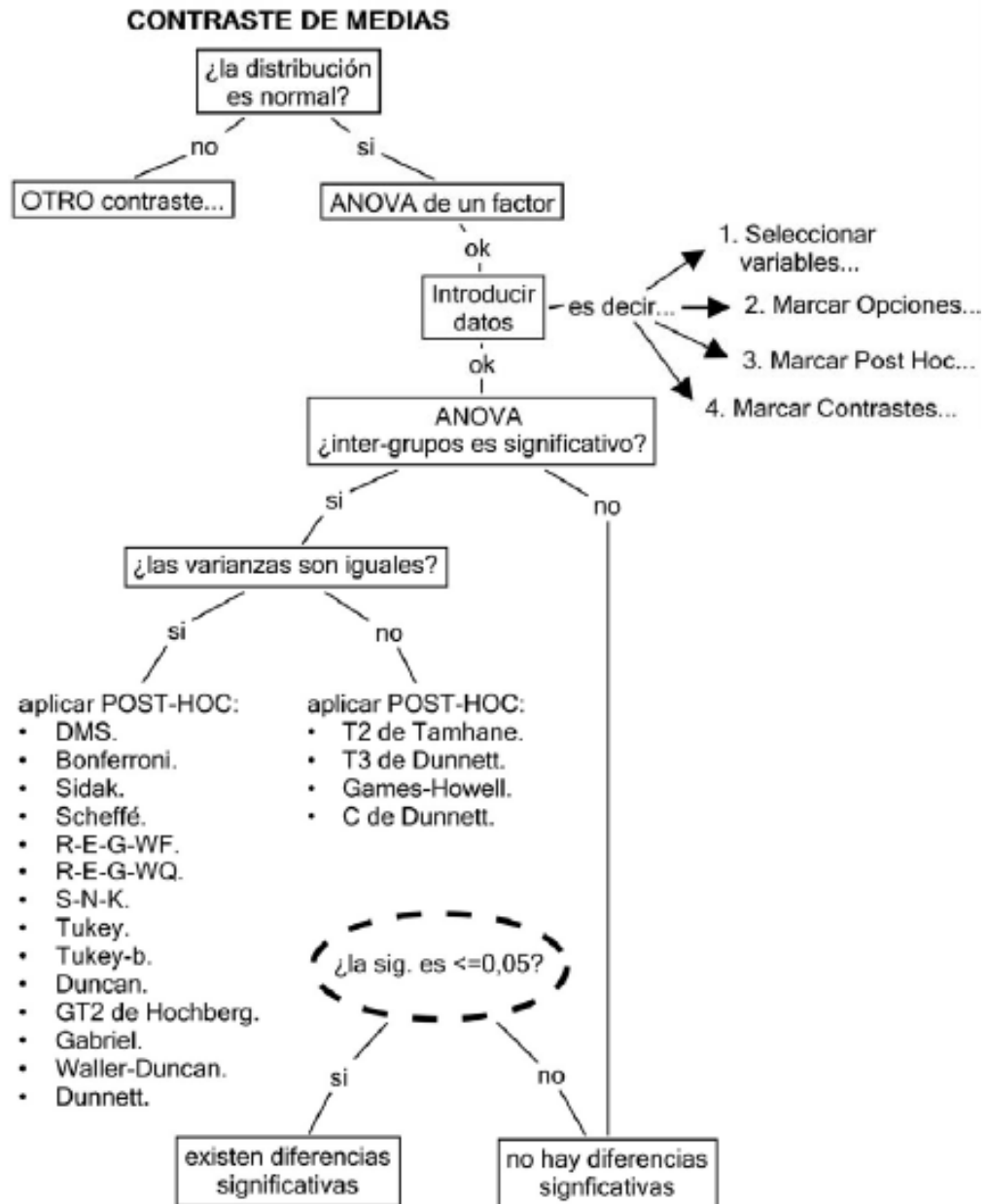


Figura 46. Esquema para calcular ANOVA de un factor.

(Fuente: Bakieva, Such and Jornet, 2010)

A continuación, se presentan en las Tablas 11, 12, 13 y 14 de los datos obtenidos a 0 cm de distancia del punto de inoculación de los únicos de los que realizaremos análisis estadístico. Para 3 cm no se estableció análisis por insuficiencia de datos para llevar a cabo una comparativa estadísticamente fiable. Pero se ha encontrado la presencia de *Trichoderma* sp en al menos un trozo de astilla. Por lo que podemos afirmar que ha llegado hasta los tres centímetros en todas las muestras. Y en el resto no se encontró presencia de *Trichoderma* sp:

Tabla 11. Datos estadísticos para T1 a 0 cm.

T1	MEDIA	DESVEST	ERROR
87,5			
50			
75			
87,5	70,31	13,25	4,69
62,5			
75			
62,5			
62,5			

Como se observa en la tabla, la media de T1 fue de 70,31 su desviación típica de 13,25 y el error de 4,69.

Tabla 12. Datos estadísticos para T2 a 0cm.

T2	MEDIA	DESVEST	ERROR
75			
100			
87,5			
87,5	89,58	9,40	3,84
100			
87,5			

Para T2 hubo datos que no eran homogéneos con el resto, por lo que se pudo prescindir de ellos y que no eran relevantes. La media de T2 fue de 89,58 su desviación típica de 9,40 y el error de 3,84.

Tabla 13. Datos estadísticos para T3 a 0 cm.

T3	MEDIA	DESVEST	ERROR
100			
100			
	93,75	10,45	4,26
100			
100			
75			
87,5			

Para T3 también se prescindió de algún dato quedando una media de 93,75 una desviación típica de 10,45 y un error de 4,26.

Tabla 14. Datos estadísticos para T4 a 0 cm.

T4	MEDIA	DESVEST	ERROR
100			
87,5			
87,5	91,67	6,45	2,64
87,5			
87,5			
100			

En T4 la media fue de 91,67 la desviación típica de 6,45 y el error 2,64.

Una vez obtenidos y procesados los datos se compara la información de los cuatro grupos correspondientes a los diferentes aislados de *Trichoderma* sp. Se debe tener en cuenta que en este estudio el T2 y T3 son el mismo *Trichoderma* sp, pero a diferentes concentraciones, por lo que se consideran como aislados diferentes en este caso.

Primeramente, se realiza la comprobación de la normalidad de los datos, para ello se analiza mediante la prueba K-S (Kolmogorov-Smirnov) si estos datos son normales. Debemos saber si las muestras se distribuyen como una normal, esta demostración queda reflejada en la Figura 47.

TRICHODERMA	VALOR	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
	1,00	,222	8	,200*	,912	8	,366
	2,00	,254	6	,200*	,866	6	,212
	3,00	,392	6	,004	,701	6	,006
	4,00	,407	6	,002	,640	6	,001

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Figura 47. Prueba de normalidad.

Tanto el tratamiento *Trichoderma* 1 (T1) y *Trichoderma* 2 (T2), se distribuyen como una normal, pero en el caso de *Trichoderma* 3 (T3) y *Trichoderma* 4 (T4) no se distribuyen como una normal, por tanto, realizaremos una comprobación mediante pruebas no paramétricas para comprobar si se distribuyen como una normal.

Realizamos el análisis de la normalidad mediante la evaluación de pruebas no paramétricas mediante la prueba K-S para una muestra y se detalla un resumen de la prueba de hipótesis en la Figura 48.

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de VALOR es normal con la media 85,096 y la desviación típica 14,15.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	,060	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Figura 48. Resumen de la prueba de hipótesis.

Por tanto, mediante el análisis K-S no rechazamos la hipótesis nula y aceptamos que se distribuyen como una normal. Y podemos continuar con el siguiente paso, ANOVA de un factor.

Los análisis los dividiremos en cuatro apartados:

- 1) Análisis entre los *Trichoderma* sp. y concentraciones.
- 2) Análisis entre los cuatro tratamientos de *Trichoderma* sp.
- 3) Análisis entre las dos concentraciones.
- 4) Análisis del *Trichoderma* sp. analizado a dos concentraciones.

Procederemos a su análisis particular:

- 1) Análisis entre los *Trichoderma* y concentraciones

En este apartado se combinarán las distintas cepas de *Trichoderma* sp. junto con las distintas concentraciones y se verán si existen diferencias significativas entre ellos. La combinación de valores se describe a continuación y queda reflejada en la Figura 49.

- Valor 11: *Trichoderma* 1 (T1) con concentración de 2×10^6 esporas/ml.
- Valor 21: *Trichoderma* 2 (T2) con concentración de 2×10^6 esporas/ml.
- Valor 32: *Trichoderma* 2 (T3) con concentración de 2×10^7 esporas/ml.
- Valor 42: *Trichoderma* 3 (T4) con concentración de 2×10^7 esporas/ml.

Descriptivos								
VALOR								
					Intervalo de confianza para la media al 95%			
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
11,00	8	70,3125	13,25825	4,68750	59,2283	81,3967	50,00	87,50
21,00	6	89,5833	9,40966	3,84148	79,7085	99,4582	75,00	100,00
32,00	6	93,7500	10,45825	4,26956	82,7747	104,7253	75,00	100,00
42,00	6	91,6667	6,45497	2,63523	84,8926	98,4407	87,50	100,00
Total	26	85,0962	14,15063	2,77517	79,3806	90,8117	50,00	100,00

ANOVA de un factor

VALOR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2577,624	3	859,208	7,784	,001
Intra-grupos	2428,385	22	110,381		
Total	5006,010	25			

Figura 49. Combinación de valores.

Tenemos un valor de significancia de 0,001 por tanto, diferencias significativas entre combinación de tratamientos y por ello procederemos a desgranar las distintas diferencias con las distintas casuísticas. Con el fin de ver si hay diferencias entre todos ellos o sólo distintos casos.

2) Análisis entre los cuatro tratamientos de *Trichoderma* sp.

Evaluaremos los cuatro tratamientos atendiendo sólo a las tres especies de *Trichoderma* sp. Los datos presentan un error inferior al 10% por tanto, realizamos el análisis estadístico que nos permite comparar medias entre más de dos muestras (ANOVA) y al tener sólo un dato con el que trabajar (porcentaje de *Trichoderma* sp presente en la planta) se tiene un solo factor, por tanto, se realiza el tratamiento estadístico ANOVA de un factor como se muestra en la Figura 50.

Duncan^{a,b}

TRICHODERMA	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
1,00	8	70,3125	
2,00	6		89,5833
4,00	6		91,6667
3,00	6		93,7500
Sig.		1,000	,511

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,400.
- b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Figura 50. Resultados análisis Duncan.

Una vez realizado nuestro análisis para 0 cm que es donde más datos se obtuvieron en todos los aislados y repeticiones, se obtiene que el aislado 1 de *Trichoderma* sp. o T1 muestra diferencias significativas para con el resto de aislados T2, T3 y T4, ya que queda una significación de 0,01 y este dato es $<0,05$. Por otro lado, entre T1, T2 y T3 no existen diferencias significativas ya que su significancia es de 0,511. Por otro lado, cuando en el análisis realizado con Duncan se muestran los resultados en dos columnas, es porque sí hay diferencias significativas y lo separa en dos subconjuntos, como es en nuestro caso.

3) Análisis entre las dos concentraciones.

Se evaluarán si existen diferencias significativas entre los tratamientos atendiendo sólo a las dos concentraciones evaluadas, 2×10^6 esporas/ml y 2×10^7 esporas/ml independientemente de las especies de *Trichoderma* sp. Se le denomina valor 1,00 a la concentración 2×10^6 y valor 2,00 a la concentración 2×10^7 .

Se procede a realizar el tratamiento estadístico mediante la ANOVA de un factor de ambos tratamientos mediante el análisis Duncan, que queda reflejado en la Figura 51.

Descriptivos

VALOR

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1,00	14	78,5714	15,05484	4,02358	69,8790	87,2638	50,00	100,00
2,00	12	92,7083	8,35697	2,41245	87,3986	98,0181	75,00	100,00
Total	26	85,0962	14,15063	2,77517	79,3806	90,8117	50,00	100,00

ANOVA de un factor

VALOR

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1291,352	1	1291,352	8,343	,008
Intra-grupos	3714,658	24	154,777		
Total	5006,010	25			

Figura 51. Datos descriptivos y Anova entre dos concentraciones.

Obtenemos un valor de 0,08 por tanto es mayor de 0,05 existen diferencias significativas y podemos concluir que existen diferencias a la hora de aplicar una concentración con respecto a otra.

4) Análisis del *Trichoderma* sp analizado a dos concentraciones.

Por último, particularizaremos en el caso del *Trichoderma* sp ensayado a dos concentraciones con el fin de ver si existen diferencias en el caso de T2 entre ambas concentraciones. Para ello denominamos el valor 2,00 a la concentración de 2×10^6 esporas/ml y el valor de 3,00 a la concentración 2×10^7 esporas/ml. Y seguidamente realizamos la ANOVA de un factor. Estos datos quedan reflejados en la Figura 52.

Descriptivos

VALOR

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
2,00	6	89,5833	9,40966	3,84148	79,7085	99,4582	75,00	100,00
3,00	6	93,7500	10,45825	4,26956	82,7747	104,7253	75,00	100,00
Total	12	91,6667	9,73124	2,80917	85,4837	97,8496	75,00	100,00

ANOVA de un factor

VALOR

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	52,083	1	52,083	,526	,485
Intra-grupos	989,583	10	98,958		
Total	1041,667	11			

Figura 52. Datos descriptivos y Anova a dos concentraciones.

Se obtiene un valor de significancia de 0,485 por lo tanto no existen diferencias significativas y para esta cepa de *Trichoderma* no hay diferencias entre aplicar una u otra concentración.

5.- DISCUSIÓN

Los métodos empleados para preparar la solución de esporas de *Trichoderma* spp a inocular en las plantas son los mismos que los que se describen por autores como (John *et al.*, 2005). Cultivaron el hongo a una temperatura de 22-23 °C por 5-7 días, en el presente estudio se cultivó a esas mismas temperatura y periodo de tiempo, pudiendo haber oscilaciones ya que era temperatura ambiental. Las concentraciones de esporas del estudio de (John *et al.*, 2008) fueron 10^{11} , 10^9 esporas/ml o formulados a base de *Trichoderma* spp en comparación a las utilizadas en este estudio que fueron 2×10^6 esporas/ml y 2×10^7 esporas/ml.

Para la incubación y sembrado de las esporas se siguieron las mismas indicaciones descritas que en (John *et al.*, 2005). En (John *et al.*, 2008) se pretende estudiar la capacidad de *Trichoderma harzianum* de colonizar tejidos inferiores a la herida de poda y como impedir que se desarrolle *Eutypa lata*. En cuanto a la colonización de los tejidos de la madera de la vid, *Trichoderma* spp fue capaz llegar hasta los 10 cm. En esta investigación el hongo llego hasta 3 cm y no con mucha presencia en las repeticiones. Sí que llego en los tratamientos al menos en alguna repetición. El T4, un *Trichoderma* spp. procedente de planta y a una concentración de 10^7 esporas/ml fue el que más presencia tuvo a 3 cm en alguna de sus repeticiones.

En el Tratamiento control de este estudio aparecieron multitud de hongos perjudiciales frente a los tratamientos con aislado de *Trichoderma* spp que a pesar de desarrollarse *Trichoderma* spp como era de esperar, no aparecieron con tanta frecuencia las enfermedades. Este dato sugiere dos características: la capacidad de colonización de *Trichoderma* spp y la capacidad que tuvo de impedir que se desarrollasen otros patógenos. Además, investigaciones de (John *et al.*, 2008) así lo constatan, cuando en uno de sus experimentos con *T. harzianum* y *Eutypa lata* se demostró como la recuperación del patógeno se redujo en presencia de *T. harzianum*.

La época de inoculación no influye para determinar el crecimiento y desarrollo del hongo ya que se debe inocular en el periodo de latencia de la planta, es decir, en el momento de la poda y cuanto antes mejor y para estos estudios fue la misma época; las temperaturas de inoculación de la solución de esporas o preparados a base de esporas del hongo fueron similares; el tiempo de espera que de dejó para que se desarrollase *Trichoderma* spp. fue de 12 semanas, por lo que alguna diferencia a tratar sobre los resultados obtenidos en este estudio puede ser relativo a que se inoculó en vides de la variedad tempranillo de un año de edad sobre R-110 y en algunos experimentos de (John *et al.*, 2008) con los que se han contrarrestado datos fueron inoculados en variedades como Chardonnay o Shiraz.

En otro experimento se inoculó *Trichoderma* spp. a 14 vides maduras cuyo cultivar fue Nyora en campo, se introdujeron Trichodowels con cepas del hongo en agujeros. Para ello las vides fueron perforadas a razón de dos perforaciones en cada una. Se toman muestras cada 4

meses hasta un total de 20 meses, se procesan y se reaisla el hongo dejándolo a 23 °C en la oscuridad por 3-4 días hasta crecer *T. harzianum*. A las 12 semanas (4 meses) el hongo se reaisló en todas las vides tratadas hasta los 6 cm por encima del punto de inserción. A los 12 meses se consiguió reaislar a 3-6 cm y a los 20 meses a los 3 cm en alguna vid. En nuestro estudio se encontró el hongo hasta los 3 cm, pero en invernadero no en campo. Puede que las condiciones del invernadero fueran similares a las del campo consiguiendo por ello resultados similares. Lo que sí que vemos es que pasados 20 meses el hongo sigue a 3 cm, esto nos da una idea de su buena persistencia en la planta. Otra hipótesis puede ser que, durante las primeras 12 semanas en el estudio de (John *et al.*, 2008) *Trichoderma* spp se inóculo en perforaciones en vides maduras y creció por encima del punto inoculación y en nuestro estudio las vides eran de un año y se inocula en la herida de poda, el hongo se desarrolla y mueve por el interior de la vid hacia abajo, esto da opción a pensar que igual a *Trichoderma* spp le cuesta menos “subir” que “bajar”.

En estudios como los de Marco (2014) se desprende que *Trichoderma* spp puede comenzar la colonización de la herida a 10 ° C, y su eficacia y capacidad de protección podrían mejorarse en el momento del tratamiento. La aplicación de productos basados en *Trichoderma* spp a las heridas de poda se puede hacer entre la latencia de la vid y el sangrado. Sin embargo, diferentes autores observaron una colonización más rápida de la madera si se aplica *Trichoderma* spp durante la etapa de latencia de descanso o en el sangrado (fines de invierno) que durante el período de latencia. Además, un estudio reciente mostró que al aplicar 6 h después de la poda, ya sea poda temprana o tardía, la colonización de *Trichoderma* spp fue más alta que otros tiempos de aplicación (0, 24, 48 y 96 h) (Mutawila *et al.*, 2011)

En el estudio que aquí se presenta se inoculó a 6°C alrededor de 24 h después de la poda, la cual se realizó en el periodo de latencia de las plantas.

A continuación se detallan y comparan características de los productos disponibles en las regiones de Winetnetwork relativos al biocontrol que están disponibles en Europa para una amplia gama de enfermedades de la vid (Marco, 2014), estos son:

- Esquive WP, aplicar durante el brote de invierno hasta el sangrado. La dosis es de 4 kg/ha en fumigación con 150 l de agua/ha (100 g/l si se pinta en heridas). La temperatura mínima para la aplicación es de 4 °C ya que por debajo la cepa no germina y con clima seco. El producto sigue siendo viable hasta por 6 meses si se mantiene en clima seco y por debajo de 20 °C.
- Vintec, se presenta como gránulos dispersables y se puede aplicar después de la poda y hasta la brotación en dosis de 200 g/ha con 100 l por ha. La suspensión debe prepararse justo antes del uso y no puede reutilizarse. La temperatura mínima para la aplicación es cercana a 10 ° C. El producto debe almacenarse entre 0 y 4 ° C.

- **Tellus WP:** puede usarse en el brote de invierno después de podar a 250 g/100 l con un volumen mínimo de tratamiento de 400 l/ha para distribuir al menos 1 kg de producto/ha. La aplicación debe realizarse a una temperatura cercana a 10 ° C y no puede ejecutarse más allá del sangrado de la vid.
- **Remedier:** se puede utilizar yema de invierno después de podar y hasta sangrar a 250g/100 l con un volumen mínimo de tratamiento de 400 l/ha. Para promover la germinación de las esporas, coloque el producto en agua 24 horas antes de la aplicación para permitir la germinación previa de las esporas.
- **Patriot Dry:** se puede usar en yema de invierno después de la poda y hasta que sangra a 250g/100 l con un volumen mínimo de tratamiento de 400 l/ha. Antes de la aplicación y una vez realizada la aplicación, el producto debe almacenarse a temperatura ambiente por debajo de 25 ° C.

A continuación, se muestra la Tabla 15 en la que se relacionan los países donde está permitida la aplicación, especie, dosis y precios.

Tabla 15. Comparativa de productos a base de *Trichoderma* spp en Europa.

Country	Product	Quantity	Composition	Price (commercial product)
France	Esquive WP *	4 kg/ha	Trichoderma atroviride I-1237	252€/ha
	Vintec*	200 g/ha	Trichoderma atroviride SC1	200€/ha
Italy	Patriot Dry*	1 kg/ha	Trichoderma asperellum ICC012+ Trichoderma gamsii ICC 080	From 45 to 50€/ha
	Remedier*	1 kg/ha	Trichoderma asperellum ICC 012 2% + Trichoderma gamsii ICC 080 2%	From 45 to 50€/ha
	Tellus WP*	1 kg/ha	Trichoderma asperellum ICC 0122% +Trichoderma gamsii ICC 080 2%	From 45 to 50€/ha
Germany	Vintec*	200 g/ha	Trichoderma Atroviride SC1	180€/ha
Croatia	No registered product			
Hungary	Ongoing process for homologation of Vintec*		Trichoderma Atroviride SC1	
Portugal	Ongoing process for homologation of Esquive WP *		Trichoderma atroviride I-1237	
Spain	Ongoing process for homologation of Esquive WP *		Trichoderma atroviride I-1237	

(Fuente: Marco, 2014)

Para España está homologado o en proceso el producto registrado con en el nombre de Esquive WP, que como anteriormente se dijo se puede aplicar a razón de 100 g/l por hectárea si se pinta en heridas.

En nuestro estudio si extrapolásemos los datos con los que se ha realizado a unas dosis por hectárea quedarían 150 g a aplicar, siguiendo el mismo método de aplicación (pintar la herida de

cada planta, es decir, inocular individualmente), respetando las temperaturas a las cuales *Trichoderma* spp se desarrolla, época de inoculación (lo más pronto posible después de la poda) y teniendo en cuenta que no se den condiciones climatológicas adversas en el momento de la inoculación. Entonces, líneas posteriores de investigación en base a los parámetros de este estudio podrían encaminarse a ensayos en campo.

Por último, decir qué concretamente en este estudio, el T1 procedente de suelo muestra diferencias significativas con el resto de aislados, quizás se debe a su origen de procedencia, el suelo. El resto de aislados fueron obtenidos de la parte aérea de plantas y entre ellos no se dan diferencias significativas. La concentración en esporas/ml fue diferente para los aislados siendo para el T1 de 10^6 , el T2 de 10^6 y el T3 y T4 de 10^7 . Se debe tener en cuenta que el T2 y T3 son el mismo *Trichoderma* spp pero a concentraciones diferentes por lo que les consideramos aislados diferentes pero a pesar de ello, los resultados que dieron no fueron muy dispares, así pues se considera que la concentración no influye tanto dentro de los aislados de planta pero puede que si con el de suelo. Otra razón puede ser que, cómo en este estudio se inoculó el hongo en heridas de poda y se pretende estudiar cómo se mueve y cuanto utilizando hongos de suelo y parte aérea de planta. Puede ser que los *Trichodermas* spp de suelo no estén tan capacitados para colonizar la parte aérea sino la radicular, por eso el T1 manifestó diferencias con el resto. Por estas razones, se podría considerar que la causa de que T1 diera esos resultados se debe a la suma de ambos factores: que es de suelo y a baja concentración. A pesar de todo, para mayor fiabilidad se requieren más experimentos con más cepas de hongos, a diferentes concentraciones y durante un periodo de tiempo mayor para poder obtener datos más fiables sobre *Trichoderma* spp y su capacidad biocontroladora.

6.- CONCLUSIONES

Trichoderma spp. resiste durante la fase de parada vegetativa durante al menos 12 semanas y sí manifiesta movimiento por el interior de la planta de vid de variedad tempranillo.

Los diferentes aislados y a diferentes concentraciones sí muestran diferencias. El aislado de suelo muestra diferencias con respecto al aislado de planta a la misma concentración y no existen diferencias entre los aislados de planta a la misma concentración. Lo que indica la elevada especificidad de los *Trichodermas*.

Los aislados de *Trichoderma* sp. ensayados son capaces de permanecer en planta de vid cuando se inoculan a un volumen de 50 microlitros y pasadas 24 horas tras realizar la poda, por lo que pueden ser aplicados durante la misma, en condiciones de frío invernal.

Las esporas se mantuvieron y desarrollaron en la planta tras 12 semanas, todas permanecieron en el punto de inoculación y llegaron a 3 cm, aunque de manera muy irregular, posiblemente por las bajas temperaturas. Por lo que sería recomendable realizar un ensayo en condiciones estivales.

Trichoderma spp. ha sido capaz de resistir las condiciones invernales y tras 12 semanas mostró resultados satisfactorios, con buena persistencia en la planta durante el tiempo que duró el ensayo, que podría alargarse en tiempo pues el desarrollo en el momento de retirarse el ensayo era óptimo. Se debería seguir investigando en este aspecto, en la variedad de uva Tempranillo y con el fin de determinar en condiciones de campo el buen establecimiento de este hongo cosmopolita para seguir enfocando posteriores estudios al control biológico de enfermedades de la madera de vid.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Bakieva, M., Such, G. and Jornet, J. Y. (2010) 'SPSS: ANOVA de un factor', *Universidad de Valencia: Grupo de Innovación Educativa*.

Benhamou, N. (1997) 'Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*', 63(5), pp. 2095–2099.

Cardoza, R. E. *et al.* (2007) 'Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase-encoding gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and lower antifungal activity', *Fungal Genetics and Biology*. Academic Press, 44(4), pp. 269–283.

Conrath, U. *et al.* (2006) 'Priming: Getting Ready for Battle', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), pp. 1062–1071.

Degenkolb, T. *et al.* (2006) 'Trichoderma brevicompactum complex: Rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), pp. 7047–7061.

Dubos, B., Jailloux, F. and Bulit, J. (1982) *L'antagonisme microbien dans la lutte contre la pourriture grise de la vigne*.

Enociencia, la ciencia del vino. (2016) *Enociencia*. Disponible en: <http://www.enociencia.com/2016/01/epocas-de-poda-en-seco-de-la-vid.html?m=1> (Accedido en: 30 de Marzo de 2018)

Fernández, F. (2006) 'Aplicación de la proteómica a la caracterización de patogenicidad en *Botrytis cinerea*. Utilización y evaluación de nuevos fungicidas', p. 113.

Flint, M. L. and Dreistadt, S. H. (1998) *Natural Enemies Handbook: The Illustrated Guide to Biological Pest Control*. Edited by J. K. Clark. University of California Press.

García-Jiménez, J., Raposo, R. and Armengol, J. (2010) 'Enfermedades fúngicas de la madera de la vid', *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos: naturaleza e control integrado*, Paper, pp. 161–173.

Gómez-Malmierca, M. (2013) 'Biosíntesis del harzianum A y su papel en la fisiología y en la actividad de biocontrol ejercida por *Trichoderma arundinaceum*'.

Harman, G. . (2000) 'Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22', *Biological Control*, (D), pp. 377–393.

Harman, G. E. *et al.* (2004) 'Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 2(1), pp. 43–56. doi: 10.1038/nrmicro797.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56.

Harman, G. E. (2006) 'Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. ', (February).

Hidalgo, L. y Hidalgo Tógores, J. (2011) Tratado de viticultura. Mundi-Prensa. Disponible en: https://books.google.es/books/about/Tratado_de_viticultura_I.html?id=YA3KBQAAQBAJ&redir_esc=y (Accedido: 4 de Noviembre de 2017).

Howell, C. R. *et al.* (2000) 'Induction of Terpenoid Synthesis in Cotton Roots and Control of *Rhizoctonia solani* by Seed Treatment with *Trichoderma virens*', *Phytopathology*, 90(3), pp. 248–252.

Hubbard, J., Harman, G. and Hadar, Y. (1983) 'Effect of Soilborne *Pseudomonas* spp. on the Biological Control Agent, *Trichoderma hamatum*, on Pea Seeds', *Seeds*. Available at: http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n05_655.PDF.

Inbar, J. and Chet, I. (1992) 'Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers', *Journal of Bacteriology*, 174(3), pp. 1055–1059.

Infante, D. *et al.* (2009) 'Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos', *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), pp. 14–21.

John, S. *et al.* (2005) 'Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*', *Australasian Plant Pathology*, 34(4), p. 569.

John, S. *et al.* (2008) 'Colonisation of grapevine wood by *Trichoderma harzianum* and *Eutypa lata*', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14(1), pp. 18–24.

Junta de Castilla y León. (2017). *Junta de Castilla y León*. Disponible en: http://www.itacyl.es/opencms_wf/export/system/modules/es.jcyl.ita.module.noticias/elements/galleries/galeria_downloads/J.A._Rubio_Proc._Recuperacixn_Var_Min.pdf . (Accedido en: 7 de Abril de 2018)

Klein, D. and Eveleigh, D. E. (1998) *Ecology of Trichoderma, Trichoderma and Gliocladium -Volume 1*.

Kraus, F. *et al.* (2004) 'Trichoderma brevicompactum', *Society*, 96(5), pp. 1059–1073.

Kubicek, C. and Harman, G. E. (1998) *Trichoderma and Gliocladium Volume 1 Basic biology, taxonomy and genetics, Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and*

Genetics.

Lewis, J. A., Papavizas, G. C. (1984) 'A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils', *Phytopathology*, pp. 1240–1244.

Lu, Z. *et al.* (2004) 'In Vivo Study of *Trichoderma*-Pathogen-Plant Interactions, Using Constitutive and Inducible Green Fluorescent Protein Reporter Systems'.

MAPAMA (2016) 'Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente', p. 8169. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es>. (Accedido en: 20 de Abril de 2018)

Marco, D. (2014) 'Application of *Trichoderma* spp. in the management of grapevine trunk diseases in Europe'.

Martín Blanco, 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', p. 354.

Megias, M. *et al.* (2015) 'Órganos Vegetales', *Biología de angiospermas*, 78, pp. 78–89.

V. Mondello¹, J. Armengol², L. Mugnai³, C. Rego⁴, K. Vaczy⁵, J. K. and P. Larignon⁷, A. K. and F. F. (2015) 'THE SCIENTIFIC BASIS FOR A MORE EFFICIENT CONTROL OF GTDs FROM NURSERY TO VINEYARD', (652601).

Monte, E. (2001) 'Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology.', *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 4(1), pp. 1–4.

Mutawila, C. *et al.* (2011a) 'Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens', *Phytopathologia Mediterranea*, 50(SUPPL.), pp. 264–276.

Mutawila, C. *et al.* (2011b) 'Histo-pathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeoconiella chlamydospora* and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds', *Phytopathologia Mediterranea*, 50(SUPPL.), pp. 46–60.

Muthumeenakshi, S. *et al.* (1994) 'Intraspecific molecular variation among {*Trichoderma*} *harzianum* isolates colonising mushroom compost in the {British} {Isles}', *Microbiology*, 140(1994), pp. 769–777.

Rauscedo (2013) 'Catalogo General de las variedades y los clones de uva de vino y de mesa', p. 2013.

Tejerino, A. (2010) 'Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Tbtri5* de *Trichoderma brevicompactum*', *Tesis doctoral Universidad de Salamanca*, pp. 1937–1952.

Tobergte, D. R. and Curtis, S. (2013) *Procesamiento de Datos y Análisis Estadístico usando SPSS, Journal of Chemical Information and Modeling*.

Vitivinicultura. (2014). *Disponible en: <http://www.vitivinicultura.net/portainjertos-que-es-un-portainjertos.html>* (Accedido en: 10 de Abril de 2018)

WinetWork (2015) ‘Poda respetuosa con el flujo de la savia - Ficha técnica - Piacenza’. Disponible en: http://www.winetwork-data.eu/es/las_enfermedades_de_la_madera/poda_respetuosa_con_el_flujo_de_la_savia_sc_16497f2xi78.htm.

Winetwork, T. *et al.* (2015) ‘The most popular practices in Europe against GTDs Result of observations from the field realized in Winetwork project’, (652601).

Woo, S. and Lorito, M. (2007) ‘Exploiting the Interactions Between Fungal Antagonists , Pathogens and the Plant’, pp. 107–130.

Yedidia, I., Benhamou, N. and Chet, A. I. (1999) ‘Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*’, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), pp. 1061–1070.

