



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE LA VID (*Vitis  
vinifera* L.) EN LA ZONA VITÍCOLA DE QUERÉTARO**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**PRESENTA:**

**ANDREA SANTIAGO MENDOZA**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE SERVICIOS PROFESIONALES

**CHAPINGO, MÉXICO, ENERO 2016**



HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE LA VID (*Vitis  
vinifera* L.) EN LA ZONA VITÍCOLA DE QUERÉTARO

Tesis realizada por Andrea Santiago Mendoza, bajo la dirección del Comité  
Asesor indicado, aprobada y aceptada como requisito parcial para obtener el  
grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**COMITÉ ASESOR:**

DIRECTOR:

  
DR. S. GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:

  
DR. ANDRÉS BOLAÑOS ESPINOZA

ASESOR:

  
DR. JUAN MANUEL TOVAR PEDRAZA

CHAPINGO, MÉXICO, ENERO 2016.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento brindado para la realización de mis Estudios de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Parasitología Agrícola, por haber contribuido en mi Formación Profesional.

Al Dr. Gerardo Leyva Mir por su acertada dirección, asesoramiento y tiempo dedicado a la realización de este trabajo de investigación.

A los Doctores Andrés Bolaños Espinoza y Juan Manuel Tovar Pedraza por su valioso apoyo, aportaciones y sugerencias en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, por su colaboración en la fase de Identificación Molecular del hongo.

A la Ing. Cristina y al Sr. Ciro, responsables técnicos de los viñedos “La Redonda” y “Los Rosales”, respectivamente, por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación.

## *Dedicatoria*

*A mí ángel que está en el cielo, mi madre, porque hasta el día de hoy me sigue acompañando.*

*A mi esposo, Ignacio, gracias por tu compañía, amor y comprensión.*

*A mi hija, Camila Juliet, la razón que le da fuerza y sentido a mi vida.*

## DATOS BIOGRÁFICOS

**Andrea Santiago Mendoza**, nació el 22 de agosto de 1987, en Iztapalapa, D.F., donde culminó sus estudios de nivel básico. Sus estudios de nivel medio superior los realizó en el Colegio de Bachilleres Plantel No. 6, Toluca, Qro. En 2006 ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo y en el 2011 concluyó sus estudios satisfactoriamente de la carrera de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia.

Su trabajo profesional lo inició en el 2011 en una Agencia de Desarrollo Rural, prestando servicios de capacitación y asesoría técnica en el municipio de Acambay, Estado de México. En 2012-2013 inició sus actividades laborales en la Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI) de la región de la Sierra Gorda del Estado de Querétaro.

En agosto de 2013 ingresa al programa de la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, de la cual egresó en Julio de 2015 y que como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias elaboró el presente trabajo de investigación “Hongos endófitos asociados al cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) en la zona vitícola de Querétaro”

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                                     | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÍNDICE DE CUADROS.....                                                              | I    |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                              | II   |
| RESUMEN.....                                                                        | III  |
| ABSTRAT .....                                                                       | IV   |
| I.- INTRODUCCIÓN.....                                                               | 1    |
| II.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....                                                     | 3    |
| III.- REVISIÓN DE LITERATURA .....                                                  | 4    |
| 3.1.- Cultivo de la vid.....                                                        | 4    |
| 3.2.- Fenología del cultivo . .....                                                 | 5    |
| 3.3.- Hongos que causan enfermedades en la vid .....                                | 6    |
| 3.3.1.- Cenicilla ( <i>Erysiphe (Uncinula) necator</i> Burr.) .....                 | 6    |
| 3.3.2.- Mildiu ( <i>Plasmopara vitícola</i> Berl y Toni) .....                      | 8    |
| 3.3.3.- Podredumbre gris ( <i>Botrytis cinerea</i> ) .....                          | 10   |
| 3.3.4.- Excoriosis ( <i>Phomosis viticola</i> Sacc.).....                           | 12   |
| 3.3.5.- Podredumbres secundarias .....                                              | 13   |
| 3.3.6.- Podredumbre blanca o del granizo ( <i>Coniella diplodiella</i> sp. Sacc) .. | 14   |
| 3.4.- Aspectos históricos de la investigación sobre hongos endófitos.....           | 15   |
| 3.5.- Hongos endófitos .....                                                        | 17   |
| 3.6.- Importancia del estudio de los hongos endófitos .....                         | 18   |
| 3.7.- Abundancia y diversidad taxonómica.....                                       | 20   |
| 3.8.- Especificidad de tejidos.....                                                 | 21   |
| 3.9.- Transmisión.....                                                              | 21   |
| 3.10.- Tipos de interacción planta-hongo endofítico .....                           | 22   |
| 3.11.- Hongos endófitos asociados a la vid .....                                    | 24   |
| 3.11.1.- <i>Cladosporium herbarum</i> . .....                                       | 24   |
| 3.11.2.- <i>Alternaria</i> sp.....                                                  | 25   |
| 3.11.3.- <i>Aspergillus</i> sp.....                                                 | 27   |
| 3.11.4.- <i>Phoma</i> sp.....                                                       | 28   |
| IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                      | 30   |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.- Descripción de las áreas de estudios.....                            | 30 |
| 4.2.- Colecta de material vegetal.....                                     | 31 |
| 4.3.- Aislamientos del hongo .....                                         | 32 |
| 4.4.- Identificación molecular.....                                        | 34 |
| 4.4.1.- Extracción de ADN para hongos método CTAB 2% y acetato de Na. .... | 35 |
| 4.4.2.- Cuantificación del ADN .....                                       | 37 |
| 4.4.3.- Identificación molecular por (PCR).....                            | 37 |
| 4.4.4.- Electroforesis .....                                               | 39 |
| 4.4.5.- Limpieza del ADN para secuenciación.....                           | 40 |
| 4.4.6.- Secuenciación del ADN y comparación en el GenBank® .....           | 40 |
| 4.5.-Velocidad de crecimiento .....                                        | 40 |
| 4.6.- Prueba de patogenicidad .....                                        | 41 |
| 4.7.- Evaluacion de datos.....                                             | 43 |
| V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                           | 44 |
| 5.1.- Identificación molecular.....                                        | 44 |
| 5.2.- Identificación morfológica.....                                      | 46 |
| 5.3.- Velocidad de crecimiento .....                                       | 47 |
| 5.4.- Prueba de patogenicidad .....                                        | 49 |
| VI.- CONCLUSIONES .....                                                    | 52 |
| VII.- LITERATURA CITADA.....                                               | 53 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|          |                                                                                                                                  | <b>Pág.</b> |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Cuadro 1 | Aislamientos de hongos endófitos, cultivar y zona geográfica donde fueron colectados.                                            | 33          |
| Cuadro 2 | Aislamientos de hongos endófitos seleccionados para la identificación molecular                                                  | 34          |
| Cuadro 3 | Reactivos utilizados para la preparación de la reacción mix utilizada en PCR convencional                                        | 38          |
| Cuadro 4 | Aislamientos evaluados en la prueba de patogenicidad                                                                             | 41          |
| Cuadro 5 | Secuencias obtenidas y comparadas en el GenBank                                                                                  | 44          |
| Cuadro 6 | Prueba de medias para la velocidad de crecimiento de los aislamientos correspondientes a <i>Phoma</i> sp., y <i>P. glomerata</i> | 48          |
| Cuadro 7 | Pruebas de patogenicidad                                                                                                         | 49          |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>Pág.</b> |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Figura 1  | Principales estados productores de Uva                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 5           |
| Figura 2  | Fenología de la vid                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 6           |
| Figura 3  | Ubicación geográfica de las zonas de estudios Ezequiel Montes y Tequisquiapan, Qro.                                                                                                                                                                                                                                                        | 30          |
| Figura 4  | Patrón de colecta del material vegetal                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 31          |
| Figura 5  | Parcela de vid en Ezequiel Montes, Qro.                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 31          |
| Figura 6  | Desinfección de material vegetal                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 32          |
| Figura 7  | Velocidad de crecimiento de los aislamientos durante ocho días de medición: <b>a)</b> Día uno; <b>b)</b> Día dos; <b>c)</b> Día tres; <b>d)</b> Día cuatro; <b>e)</b> Día cinco; <b>f)</b> Día seis; <b>g)</b> Día siete y <b>h)</b> Día ocho.                                                                                             | 36          |
| Figura 8  | Procedimiento de ADN de hongos mediante el método de CTAB 2%; <b>a)</b> Adición de CTAB 2% en cada tubo; <b>b)</b> Colocación de tubos eppendorf a una temperatura de 96 ° C; <b>c)</b> Centrifugación de muestras; <b>d)</b> Desecho de sobrenadante; <b>e)</b> Secado de la pastilla de DNA y <b>f)</b> Material genético diluido en TE. | 37          |
| Figura 9  | Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 39          |
| Figura 10 | a) Cámara de electroforesis y b) Buffer colorante verde                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 41          |
| Figura 11 | Material utilizado para la prueba de patogenicidad                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 42          |
| Figura 12 | a) Inoculación de racimos de uva y b) Cámara humedad después de inocular                                                                                                                                                                                                                                                                   | 43          |
| Figura 13 | <i>Phoma</i> sp. (a y b) y <i>P. glomerata</i> (c y d)                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 46          |
| Figura 14 | Micelio y conidios de <i>P. glomerata</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 47          |
| Figura 15 | Picnidios de <i>Phoma glomerata</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 47          |

|           |                                                                                                      |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 16 | Velocidad de crecimiento de <i>Phoma</i> sp., y <i>P. glomerata</i>                                  | 48 |
| Figura 17 | Síntomas y lesiones después de ocho días de evaluación; a) <i>Phoma</i> sp. y b) <i>P. glomerata</i> | 50 |
| Figura 18 | a) Invasión de <i>Phoma</i> sp. y b) Invasión de <i>P. glomerata</i> ambos en raquis.                | 50 |
| Figura 19 | a) <i>Rhizopus stolonifer</i> y b) <i>Botrytis</i> sp. en frutos de uva                              | 51 |

## Hongos endófitos asociados al cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) en la zona vitícola de Querétaro

### Endophytic fungi associated with the cultivation of common grape vine (*Vitis vinifera* L.) in the wine-growing area of Queretaro

Santiago-Mendoza A., Leyva-Mir S.G., Bolaños-Espinoza A. y Tovar-Pedraza J.M.

**RESUMEN.** El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad de hongos endófitos asociados a diversas variedades de vid producidas en Querétaro. Se obtuvieron 50 aislamientos de hongos provenientes de muestras de hojas de vid, de dos municipios del estado de Querétaro. Posteriormente los aislamientos se identificaron mediante el análisis de secuencias ITS del ADNr. Adicionalmente, se realizaron pruebas de patogenicidad y se evaluó la velocidad de crecimiento de los aislamientos. El 50 % de los aislamientos pertenecieron a *Alternaria alternata* y estas se encontraron en las var. Malbec, Cabernet Sauvignon, Chenin blanc y Moscatel; el 33 % se identificaron como *Phoma* sp., y estas se detectaron en las var. Malbec, Merlot y Chardonnay; y el 16 % pertenecen a la especie *P. glometara* y se obtuvieron a partir de las var. Chardonnay y Moscatel. Las pruebas de patogenicidad se realizaron con las especies de *Phoma* sp. y *P. glomerata* ya que estos hongos están reportados como endófitos, los resultados indicaron que estos hongos no producen daño en frutos inoculados, solo hay invasión de micelio en las partes leñosas, es decir, en los raquis. Por otra parte también se detectó la presencia de patógenos de la vid, tales como *Botrytis* sp. y *Rhizopus stolonifer*. La velocidad de crecimiento de *Phoma* sp. y *P. glomerata* fue similar en las pruebas de patogenicidad, encontrándose que no hubo diferencias significativas.

**Palabras clave:** Endófitos, PCR, *Phoma* sp., *P. glomerata*, Vid.

**ABSTRACT.** The objective of this research was to determine the endophytic fungi diversity associated to several varieties of common grape vines produced in Queretaro State. Fifty isolates of fungal strains were made from leaf vine samples obtained in two counties in Querétaro State. Subsequently the isolations were identified by ITS sequences analysis of DNAr. Additionally, pathogenicity tests were performed and the growth speed of the isolates was evaluated. 50 % of the isolations belonged to *Alternaria alternata*, and were found in the varieties Malbec, Cabernet Sauvignon, Chenin blanc and Muscat; 33 % were identify as species *Phoma* sp., end were detected in the varieties Malbec, Merlot and Chardonnay; and 16% belonged to the species *P. glometara* and were obtained form the cultivars Chardonnay and Muscat. Pathogenicity tests were made in *Phoma* sp. and *P. glomerata*. since this species are reported as endophytic, the results indicated that this fungi do not damage the infected fruits, just the mycelia invade the woody parts, i.e., in the rachis. Also, the presence of vine pathogens, such as *Botrytis* sp. and *Rhizopus stolonifer*, was found. The growth speed of *Phoma* sp. and *P. glomerata* was similar in the pathogenicity tests, no significant differences were found.

**Keywords:** Endophytic, PCR, *Phoma* sp., *P. glomerata*, common grape vine



### I. INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos habitan órganos vegetales que colonizan los tejidos internos sin causar síntomas visibles de la enfermedad (Petrini, 1991). Se han detectado más de 100 taxones de endófitos (Stone, 2004).

Pueden interactuar con sus hospedantes mejorando su crecimiento, resistencia al estrés ambiental y resistencia ante otros patógenos (Faeth y Fagan 2002).

Bisseger, (1994), menciona que los microorganismos endófitos juegan un papel clave en las interacciones antes de la activación de la enfermedad, pueden inducir mecanismos de resistencia sistémica y la expresión de genes de defensa contra el ataque de ciertos patógenos con sus hospedantes, todos los taxones capaces de penetrar y colonizar los tejidos vegetales, solo una pequeña proporción pueden causar enfermedad (Arnold *et al.*, 2003).

A finales del siglo XIX, varios científicos europeos describieron la presencia de micelio fúngico en los carpelos y semillas de plantas sanas de *Lolium arvense*, *L. linicolum*, *L. remotum* y *L. temulentum*. La cizaña (*L. temulentum*) ya era conocida como una mala hierba en cultivos de cereal en la antigüedad que poseía propiedades tóxicas que con el descubrimiento de los endófitos fueron atribuidas al micelio fúngico. Estudios realizados sobre el hongo endófito de *L. temulentum* demostraron que este hongo se transmitía por semilla, ya que sus hifas penetraban en el embrión antes de que las semillas maduraran, y tras la germinación el hongo coordinaba su crecimiento con el de los tejidos de la planta, llegando a colonizar los meristemos laterales y después las inflorescencias. A principios de 1930 investigaciones realizadas en los Estados Unidos y Canadá demostraron la relación entre los endófitos y la toxicidad de *L. temulentum* para el ganado (Carroll, 1986).

La diversidad, el papel ecológico, la diversidad, la distribución o la influencia de estos hongos en el desarrollo y/o la prevención de ciertas enfermedades fúngicas es aún incompleto. Mostert *et al.* (2000), investigaron el tipo de comportamiento de *Phomopsis viticola* (agente causal de excoriosis la vid), sus resultados demostraron que algunos aislados de *P. viticola* se comportaron como patógenos



primarios, mientras que otros actúan como verdaderos endófitos. Se ha estudiado la diversidad endófitica de la vid, centrándose sobre todo en los tejidos vasculares de las plantas jóvenes (Carroll, 1986).

No existe información sobre las comunidades de hongos endófitos, en el cultivo de la vid de la región vitícola del estado de Querétaro. La información que se tiene disponible se centra en la caracterización y control de patógenos asociados al cultivo, describiendo técnicas de control y prevención para el control de plagas.

En el presente trabajo se investigó la diversidad de especies de hongos endofíticos asociados a variedades de vid de uso comercial de los municipios de Ezequiel Montes y Tequisquiapan pertenecientes al estado de Querétaro, que pueden ser usados como antagonistas de algunas plagas de la vid.



### II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### HIPÓTESIS

- ❖ Hay presencia de hongos endófitos asociados al cultivo de la vid en la zona comercial vitícola del estado de Querétaro y estas especies varían de acuerdo a la región de muestreo.

#### OBJETIVOS

- ❖ Determinar la presencia de hongos endófitos asociados al cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) en viñedos comerciales proveniente de los municipios de Ezequiel Montes y Tequisquiapan en el estado de Querétaro.
- ❖ Identificar mediante técnicas moleculares a los hongos endófitos que se encuentran presentes en el material vegetal colectado en los municipios de Ezequiel Montes y Tequisquiapan en el estado de Querétaro.
- ❖ Determinar si existe patogenicidad de los hongos endófitos identificados, para ser propuestos como posibles antagonistas de fitopatógenos de la vid.



### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Cultivo de la vid

La vid es una de las primeras plantas que cultivó el hombre, motivo por el cual ha jugado un papel trascendental en la economía de las antiguas civilizaciones. Tras la mitificación del vino por parte del cristianismo, el cultivo de la vid experimentó un gran auge que ha perdurado hasta nuestros días. La mayor parte de la producción de uva se destina a la elaboración de los distintos tipos de vino (blanco, rosado y tinto) y otras bebidas (mosto, mistelas, moscatel) (Reynier, 2005).

En Europa, la uva se cultiva desde tiempos prehistóricos, tal y como lo demuestran las semillas que se han hallado en yacimientos arqueológicos de la edad del bronce de Suiza, Italia y en tumbas del antiguo Egipto. Los botánicos sitúan el origen de la uva cultivada en Europa en la región asiática del mar Caspio, desde donde las semillas se dispersaron hacia el oeste por toda la cuenca mediterránea. Hoy en día, la vid se cultiva en las regiones cálidas de todo el mundo, siendo los mayores productores: Australia, Sudáfrica, los países de Europa (Italia, Francia, España, Portugal, Turquía y Grecia) y en el continente americano, los mejores viñedos se encuentran en California, Chile y Argentina. Existen innumerables variedades de uvas con grandes diferencias entre sí; en forma, tamaño, tonalidad de los frutos, productividad, calidad, etc. Todas ellas se han clasificado tradicionalmente según su destino final sea para vinificación o para consumo de mesa. Las variedades europeas se consideran superiores a las norteamericanas para elaborar vinos de mesa, como frutos de postre y de mesa y para elaborar pasas; mientras que las últimas se prefieren para obtener jugos y jaleas (Reynier, 2005).

La zona vitivinícola mexicana está ubicada entre los 22° y 23° latitud Norte, en el centro norte del país. Los suelos son muy arcillosos, de mediana a poca profundidad en su mayoría, con gran capacidad de retención de humedad, lo que constituye un aspecto altamente favorable para el desarrollo de las viñas (INEGI, 2015).



Para el año 2014, la producción de uva a nivel nacional fue de 335,739.48 toneladas. Los principales estados productores de uva son: Sonora, Zacatecas, Baja California, Aguascalientes, Coahuila, Querétaro, Chihuahua y Nuevo León (Figura 1) (SIAP, 2015).

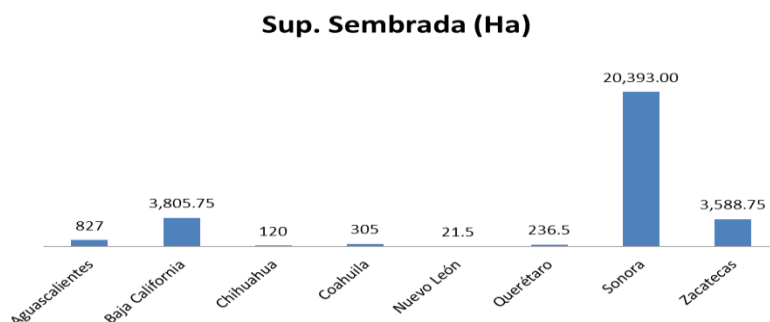


Figura 1. Principales estados productores de Uva

Fuente: Elaboracion propia a partir de datos del Servicio de Informacion Agroalimentaria y Pesquera (2015). Recuperado de <http://www.siap.gob.mx/> (Septiembre 15-2015).

### 3.2. Fenología del cultivo

**Yema de invierno A:** yema aparentemente “dormida”, no se aprecia borra entre las escamas, consistencia dura; **Yema de algodón o inchada B:** también llamada “desborre”, la yema está engrosada, las escamas abiertas, entre las escamas aparece la borra. Dicha borra es una pelusa grisácea que protege a los órganos tiernos del interior la yema; **Punta verde C:** aparecen los órganos vegetales emergiendo de entre la borra; **Salida de hojas D:** no se aprecia pámpano entre las hojas, sólo hay dos o tres hojas más abiertas que el resto. El resto de las hojas permanecen plegadas como si fuera un corazón de lechuga; **Hojas extendidas E:** se aprecian hojas jóvenes, nudos y entrenudos. Existen cuatro-seis hojas completamente extendidas; **Racimos visibles F:** se diferencian perfectamente nudos y entrenudos. Los racimos coronan al pámpano joven; **Racimos separados G:** los racimos van encontrando su sitio a lo largo del pámpano; **Botones florales separados H:** los botones florales encuentran su posición dentro del racimo; **Floración I:** cada botón floral se libera de la caliptra. Al hacerlo dejan libres las anteras y el ovario. Poco después ocurrirá la fecundación; **Cuajado J:** los estambres ya han cumplido su función. Una vez la fecundación se ha realizado, es



cuando hay una pequeña uva en potencia. Presenta un aspecto pequeño, duro y verde; Grano tamaño guisante K: La uva adquiere un tamaño de un guisante; **Envero L:** es el momento en que las uvas comienzan a cambiar de color. A partir de aquí comienza la maduración de las uvas. Se comienza a realizar muestreos para índices de madurez; **Madurez M:** el fruto está listo para la cosecha. (Reynier, 2005).

A continuación se muestra el esquema del desarrollo fenológico del cultivo de la vid (Figura 2).



Figura 2. Fenología de la vid  
Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2004).

### 3.3. Hongos que causan enfermedades en la vid

#### 3.3.1. Cenicilla (*Erysiphe (Uncinula) necator* Burr.)

Es una enfermedad producida por un hongo *Erysiphe necator*, originario de América del Norte, pero ampliamente extendido en España. Como todos los hongos, cuando las condiciones climáticas son favorables para su desarrollo, puede provocar en variedades sensibles hasta la pérdida total de la cosecha. El hongo inverna principalmente como micelio en el interior de las yemas, cuando



comienza la brotación de la vid, suelen darse también condiciones adecuadas para su desarrollo. Es un ectoparásito, su micelio se localiza en el interior de los tejidos vegetales. Cuando el micelio alcanza su madurez comienza la reproducción asexual con la formación de gran cantidad de conidios, que transportadas por el viento propagan la enfermedad al instalación sobre cualquier órgano verde de la vid, si las condiciones climáticas le son favorables, constituyendo los focos primarios de la infección. A partir de estos focos primarios, y si las condiciones climáticas continúan siendo favorables, pueden tener lugar sucesivas contaminaciones secundarias por medio de los conidios durante todo el desarrollo vegetativo de la vid. Al final de la vegetación el desarrollo del hongo se detiene, pudiendo conservarse durante el invierno bien en forma de micelio en el interior de las yemas protegidas por las escamas o bien en forma de peritecas en los sarmientos. Estas peritecas, órganos capaces de resistir las condiciones más desfavorables, son pequeños receptáculos esféricos de color pardo, visibles con lupa de poco aumento, y que contienen en su interior 4-8 ascosporas que al igual que el micelio pueden propagar la enfermedad al iniciar la brotación. La temperatura es el factor climático que más influencia tiene en el desarrollo de la enfermedad. Alrededor de los 15 °C, comienza a ser favorables para su progreso vegetativo y propagación, alcanzando el óptimo entre los 25 °C y los 28 °C, deteniendo su desarrollo a los 35 °C y siendo letales las temperaturas superiores a 40 °C. La humedad ambiental también influye en el desarrollo de la enfermedad, aunque en menor grado que la temperatura, La germinación de los conidios se ve favorecida por las humedades relativamente altas. Al contrario que en el caso de los mildius, la lluvia abundante frena el desarrollo del hongo (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2004).



### a) Síntomas y daños

En hojas. Se observa un polvillo blanco ceniciento tanto en el envés como en el haz, que puede llegar a cubrir la hoja por completo. Debajo del polvillo se aprecian unos puntitos necrosados. A veces los comienzos del ataque se manifiestan como manchas pequeñas de aceite en el haz, junto a unas punteaduras pardas. Cuando los ataques son intensos, las hojas aparecen crispadas o abarquilladas y recubiertas de polvillo por el haz y el envés. En brotes y sarmientos. Los síntomas se manifiestan por manchas difusas de color verde oscuro, que va creciendo, pasando a tonos achocolatados al avanzar la vegetación y a negruzcos al lignificarse el brote. En racimos. Al principio los granos aparecen con un cierto color plumizo, recubriéndose en poco tiempo del polvillo ceniciento, formado por los órganos de multiplicación del hongo (los conidios), debajo de los cuales se encuentran, a menudo, retículos necrosados de color pardo-oscuros. En esta zona dañada, se forman rasgaduras producidas por el engrosamiento de los granos de uva y por la poca elasticidad de la piel. Los daños más importantes se localizan en los racimos, ya que los ataques fuertes provocan la detención del crecimiento de la piel, por lo que ésta se agrieta y se raja el fruto. También se produce un mal agostado de los sarmientos y se favorece la penetración de la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*). Cuando *Erysiphe necator* causa mayores daños es durante la floración del racimo, provocando el aborto floral y siendo causa del corrimiento (Agrios 2005).

### 3.3.2. Mildiu (*Plasmopara viticola* Berl y Toni)

El hongo se conserva durante el invierno en las hojas muertas de la vid bajo la forma de oosporas, que constituyen la fase sexual del hongo. Debido a las dos membranas que las recubren son muy resistentes a las condiciones climáticas adversas, pudiendo conservar su poder de infección durante al menos dos años. En primavera cuando el terreno ha estado suficientemente húmedo, la temperatura es superior a 12 °C y sobreviene en 1-2 días una lluvia de al menos



10 mm, las oosporas germinan emitiendo unos órganos (esporangios) portadores en su extremidad de una especie de saco que contienen las zoosporas, que depositados sobre los órganos verdes de la cepa pueden germinar y penetrar a través de un estoma, es imprescindible para ello la presencia de agua líquida. Se inicia así el periodo de incubación de la contaminación primaria, que es invisible y se forma en el interior del órgano atacado por el micelio, compuesto de una red de filamentos dotados de órganos chupadores (austorios) con los que extrae las sustancias nutritivas de las células. Al final de dicho periodo aparece en el haz de la hoja una zona de color verde pálido (mancha de aceite) que se corresponde en el envés con una pelusilla blanquecina si el tiempo es húmedo, ocurriendo lo mismo en cualquier otro órgano atacado. Esta pelusilla está formada por conidióforos y conidios, sacos más pequeños que los producidos por las oosporas, que también contienen en su interior zoosporas, siendo los elementos constituyentes de la fase asexual. Entre 7 y 14 días según la temperatura y la humedad relativa media, nuevas colonias de zoosporas con potencia para producir nuevos ciclos. Al final de la vegetación cuando la temperatura desciende, aparecen sobre las hojas que van a caer numerosas manchas pequeñas en forma de mosaico. En estas manchas se forman los huevos de invierno u oosporas estructuras de conservación del hongo (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2004).

### **a) Síntomas y daños**

El mildiu es una enfermedad criptogámica que ataca todos los órganos verdes de la vid: hojas, zarcillos, ramas jóvenes, racimos antes del cambio de color (envero).  
Hojas: En primavera, los filamentos del hongo micelio avanzan entre las células y producen las manchas de aceite; estas manchas amarillentas, ligeramente translúcidas, se cubren a continuación, en el envés de la hoja, de un polvo blanquecino. En otoño, sobre hojas viejas, las manchas delimitadas por las nerviaciones, forman una especie de tapiz como mosaico. Racimos: Antes de la floración o durante la floración, los ataques se traducen por un corrimiento parcial



o total de las flores acompañado por un pardeamiento progresivo del pedicelo y del pedúnculo del racimo joven. Sobre estos órganos aparecen unas inflorescencias blancuzcas. El final de la floración, en el momento en que los capuchones florales caen y dejan al descubierto el pequeño grano, es un estado particularmente vulnerable. Si el ataque alcanza el pedúnculo del racimo joven, éste se deforma y toma un color verde oliva, mientras que las flores de la parte terminal se secan. Después de la floración los granos acabados de formar pueden ser alcanzados por intermedio de sus pedicelos. Se recubren de una especie de polvo blanco que corresponde a las fructificaciones del hongo o conidióforos. Antes del envero aparecen en los granos unas manchas pálidas que se vuelven pardas y se deprimen, mientras que el interior de los granos, invadidos a partir de sus pedicelos, toman un color pardo (Agrios 2005).

### **3.3.3. Podredumbre gris (*Botrytis cinerea*)**

El hongo se conserva durante el invierno principalmente como esclerocios, bien visibles sobre los sarmientos en forma de manchas negruzcas alargadas, y también como micelio en las grietas de la madera y en menor cantidad en las yemas. Los esclerocios son más abundantes hacia la extremidad de los sarmientos que en su base. En primavera, con condiciones favorables de 90 % de humedad relativa y 15 y 20 ° C de temperatura, se produce la saturación de las estructuras que generan conidióforos portadores en su extremidad de conidios, los cuales son diseminados por el viento o la lluvia germinando e infestando los órganos verdes de la cepa si estos se encuentran mojados. Los conidios mantienen su poder germinativo durante unos 30 días. El número de conidios presentes en el aire durante el periodo vegetativo de la vid es bajo desde el desborre hasta las proximidades del envero, alcanzando su máximo durante el envero-maduración y disminuyendo paulatinamente a partir de la recolección. La penetración de los conidios en los tejidos vegetales puede realizarse directamente, aunque las heridas favorecen extraordinariamente su penetración.



No obstante, los granos si no presentan heridas durante el periodo de cuajado-envero son retractarios a la penetración de los conidios debido a que existen en su hollejo sustancias que inhiben su germinación; sin embargo, durante el periodo de maduración los racimos presentan su máxima sensibilidad debido a la concentración de azúcares en los granos, base nutritiva favorecedora del desarrollo del hongo. Los restos de los capuchones florales constituyen también un buen sustrato para la instalación del hongo. Una vez que los conidios han germinado se produce en el interior del órgano atacado un micelio que, después de haber destruido el tejido parasitado, sale al exterior produciendo conidióforos con conidios que al principio son de color blanco, pero al cabo de unos pocos días adquieren el color típico grisáceo que caracteriza a la enfermedad. Estos conidios producen nuevas contaminaciones a lo largo del periodo vegetativo de la vid y al llegar el otoño el hongo comienza a formar sus estructuras de conservación (esclerocios). Se requiere una humedad de 90 % para que se produzca la germinación de los conidios, la cual se ve activada con temperaturas próximas a los 18 °C, aunque puede realizarse con temperaturas comprendidas entre los 0 y 40 °C. Las heridas producidas en los granos por las polillas del racimo, el oidio, el granizo, favorecen el desarrollo del hongo (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2004).

### **a) Síntomas y daños**

Presenta esporulación marrón-grisácea del hongo en la superficie de las uvas infectadas. En las hojas, los síntomas de la Botrytis se manifiestan como manchas de color verde, que se tornan marrón-rojizas y necróticas (muertas). En los pedicelos y los raquis, los síntomas parecen como parches café que se tornan negros y pueden provocar que parte del racimo se marchite y se caiga. Conforme las uvas maduras son atacadas, en variedades de uvas blancas los frutos se pintan de café, en variedades de uvas púrpura los frutos se tornan rojos (Agrios 2005).



### 3.3.4. Excoriosis (*Phomosis viticola* Sacc.)

El hongo sobrevive durante el invierno por medio de los picnidios formados en la madera necrosada y blancuzca de los sarmientos, y también por el micelio presente en las yemas y madera de los sarmientos, es posible localizarlos en menor cantidad en el tronco y brazos de la cepa. Los picnidios aparecen como unos puntos negros visibles a simple vista, los cuales contienen en su interior las esporas e inician su maduración durante el invierno para estar la mayor parte maduros antes de iniciarse el desborre de la vid, siendo esta la principal vía de propagación del hongo. En la primavera, y coincidiendo con el desborre de la vid, el hongo entra en intensa actividad. Los picnidios liberan las esporas aglutinadas en una masa gelatinosa amarillenta llamada cirro; bajo la acción del agua de lluvias se disemina, y si la vid se encuentra en estado receptivo (estado D) y existen más de siete horas de humectación, se produce la contaminación de los brotes jóvenes. Después de un periodo de incubación, que dura de una a tres semanas según la temperatura existente, aparecen los primeros síntomas sobre los entrenudos de la base de los pámpanos. El micelio se desarrolla en la superficie de los jóvenes brotes, avanzando con el crecimiento de los mismos cuales quiera que sean las condiciones climáticas. Durante el verano el hongo continúa su evolución sobre los sarmientos herbáceos, se van contaminando las yemas formadas y se hacen más visibles los síntomas. En el otoño comienzan a formarse los picnidios y el micelio se hace más patente sobre los sarmientos por su típico blanqueamiento (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2004).

#### a) Síntomas y daños

La excoriosis puede afectar a todos los órganos verdes de la vid. En brotes jóvenes y sarmientos, los primeros síntomas se manifiestan por necrosis poco patentes que adquieren su aspecto característico al cabo de mes y medio a dos meses de producirse el desborre. Estas necrosis pueden ser de varios tipos: manchas oscuras, deprimidas, estiradas a lo largo del brote ocasionando en la corteza unas grietas más o menos superficiales; manchas más oscuras que las



anteriores, aisladas; lesiones de color marrón oscuro que toman el aspecto típico de una tableta de chocolate. Estos síntomas se localizan preferentemente sobre los 3 ó 4 primeros entrenudos de la base de los brotes. En hojas, los síntomas se manifiestan por la presencia de manchas oscuras negruzcas, localizadas preferentemente en el peciolo y nervios principales. Los ataques en hojas no suelen tener gran importancia económica. No obstante, si estos son fuertes se produce marchitamiento y posterior desecamiento en las hojas de la base, originando una pérdida parcial del follaje. En racimos, los síntomas se localizan sobre el pedúnculo y el raquis y su manifestación es parecida a la descrita en las hojas. Los ataques a los racimos son siempre graves, ya que ocasionan un mal cuajado e incluso su desecamiento (Agrios 2005).

### **3.3.5. Podredumbres secundarias**

Las podredumbres secundarias están originadas por hongos saprofitos presentes en el medio ambiente y tradicionalmente han sido confundidas con la podredumbre gris, o con la podredumbre ácida ocasionada por bacterias y levaduras. Suelen tener más importancia cuando afectan a uva de mesa, sobre la que pueden provocar daños en campo y en cámara (caso de variedades que se almacenan durante cierto tiempo). Los primeros agentes causantes de las podredumbres secundarias son los hongos; *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Rhizopus nigricans*, *Cladosporium herbarum* y *Penicillium* sp. Todos ellos al igual que los agentes causantes de la podredumbre ácida se caracteriza por: invernar sobre restos orgánicos, hojas, yemas, frutos momificados u otras plantas; estar continuamente presentes, y precisar una herida en la baya para iniciar el ataque; siendo el momento de mayor susceptibilidad de los racimos cuando estos comienzan a incrementar su contenido en azúcar, aunque es determinante un contenido concreto. *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Penicillium* son de evolución rápida, mientras que *Alternaria* y *Cladosporium* tienen una evolución lenta. Todos son propagados por la lluvia y el viento. Se podría repetir lo mismo que en el caso de la podredumbre ácida, relativo a las condiciones climáticas que favorecen su



desarrollo: temperatura y humedades altas, y presencia de heridas en las bayas que sirven, en este caso, de puerta de entrada a los hongos causantes de las podredumbres secundarias, así como la sobre maduración de racimos (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2004).

### a) Síntomas y daños

Todos los hongos secundarios producen descomposiciones de las bayas, cuando hay condiciones favorables empezando en puntos aislados del racimo y extendiéndose por todo él si se dan condiciones muy favorables para ello. a) *Aspergillus niger*: las bayas se cubren de una florescencia blanca, que termina por ennegrecerse, formada por las fructificaciones del hongo; pierden su consistencia y se desprenden fácilmente del pedúnculo; b) *Alternaria* sp.: presenta fructificaciones en la superficie, cuya coloración inicial suele ser verde oscuro, evolucionando a negro cuando la colonia es vieja. Las bayas pierden su consistencia lentamente, no desprendiéndose generalmente del pedúnculo; c) *Rhizopus nigricans*: se extiende por toda la baya con amplio desarrollo de un micelio blanquesino acabado en puntos blancos que evolucionan a negro. Las bayas quedan momificadas en el racimo; d) *Cladosporium herbarum*: presenta colonias aterciopeladas de color gris-verdoso a oscuro. Las bayas atacadas escurecen la piel y quedan consumidas; e) *Penicillium* sp.: las bayas presentan una unción marrón clara al principio, apareciendo después pústulas de color blanco que evolucionan a un verde azulado. La baya pierde consistencia y se rompe con facilidad (Agrios, 2005).

### 3.3.6. Podredumbre blanca o del granizo (*Coniella diplodiella* sp. Sacc)

El patógeno se mantiene en forma de esporas en el suelo. Durante las granizadas, estas esporas son arrastradas por las salpicaduras sobre los granos magullados, en los que a través de las heridas penetran, germinan y desencadenan la enfermedad. La espora puede estar latente en los órganos momificados de la viña



hasta 15 años, enterrados en el suelo. La cantidad de esporas que puede haber en un terreno depende de la frecuencia de las granizadas. El hongo de esta enfermedad necesita temperatura alta para desarrollarse; el óptimo es 24°C (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2004).

### **a) Síntomas y daños**

Algunos días después de la granizada, los granos dañados toman un color amarillento y luego rosa marrón en la zona atacada, el resto de los granos pueden seguir verdes. Posteriormente los granos se cubren de pequeñas pústulas pardo violáceas, que son las fructificaciones del hongo (picnidios) y después pardean y se desecan. La enfermedad se propaga rápidamente, ocasionando un desecamiento total o parcial del racimo. También las heridas en los racimos producidas por picaduras de aves, de insectos o por instrumentos de trabajo, permite la penetración del hongo (Agrios, 2005).

### **3.4. Aspectos históricos de la investigación sobre hongos endófitos**

Durante los últimos 30 años, el término endófito ha aparecido cada vez con más frecuencia en la literatura científica. Aunque el origen del término provenga del siglo XIX, cuando Antón de Bary lo utilizó para describir hongos que viven en el interior de las plantas (De Bary, 1986), su significado contemporáneo es diferente del original. Actualmente se usa este término para referirse a hongos capaces de infectar plantas aparentemente sanas sin causar síntomas. Es decir, en el más amplio de los sentidos, los hongos endofíticos son aquellos que colonizan tejidos vivos de plantas sin ocasionar ningún efecto negativo, inmediato o visible (Carroll, 1986).

Los primeros estudios de endofitos se realizaron en plantas de la familia de las gramíneas. A finales del siglo XIX, varios científicos europeos describieron la presencia de micelio fúngico en los carpelos y semillas de plantas sanas de *Lolium arvense*, *L. linicolum*, *L. remotum* y *L. temulentum*. La cizaña (*L. temulentum*) ya era conocida como una mala hierba en cultivos de cereal en la antigüedad.



Además, esta planta poseía propiedades tóxicas que con el descubrimiento de los endófitos fueron atribuidas al micelio fúngico. Estudios realizados por Freeman (1904) sobre el hongo endófito de *L. temulentum* demostraron que este hongo se transmitía por semilla, ya que sus hifas penetraban en el embrión antes de que las semillas madurasen, y tras la germinación el hongo coordinaba su crecimiento con el de los tejidos de la planta, llegando a colonizar los meristemos laterales y después las inflorescencias. A principios de 1930 investigaciones realizadas en los Estados Unidos y Canadá demostraron la relación entre los endofitos y la toxicidad de *L. temulentum* para el ganado (Carroll, 1986).

Freeman (1906), sugirió que eran Ustilaginales que habían perdido la capacidad de esporular en sus hospedadores, argumento basado en las similitudes de los ciclos de vida del endófito de *L. temulentum* y el del hongo patógeno *Ustilago tritici* en trigo; más tarde clasificó los endófitos de *Lolium* en el grupo de los *Clavicipitales* tras estudiar su transmisión. Se hizo una asociación con el hongo *Endoconidium temulentum*, conocido por su toxicidad en semillas de plantas de *L. temulentum*. Carroll (1986) vio un paralelismo entre los endófitos de *L. temulentum* y *L. perenne* con algunas especies endofíticas del género *Epichloë* asociadas a plantas de *Festuca rubra* (*Epichloë festucae*) y *Dactylis glomerata* (*Epichloë typhina*). Además, observó que *Epichloë festucae* puede manifestar su ciclo sexual o asexual en diferentes tallos de la misma planta. Neill (1940), cultivó endofitos de *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne*, y propuso que eran cepas de *Epichloë typhina* basándose en las similitudes morfológicas de sus células conidiógenas y conidios. Finalmente, el endofito de *Lolium temulentum* ha sido clasificado como *Neotyphodium occultans*, una especie asexual de la familia *Clavicipitaceae*, cercana al género *Epichloë*. (Carroll, 1986).

Los estudios sobre hongos endófitos en plantas de familias distintas de las gramíneas no comenzaron hasta los años 70, sin embargo, ya los primeros trabajos revelaron la presencia de diversas especies fúngicas en el interior de plantas pertenecientes a grupos como algas, musgos (Schulz *et al.*, 1993), hepáticas, coníferas, palmeras, cactáceas y numerosas especies de árboles, y



arbusto. Incluso en líquenes se han identificado especies de hongos endofíticos (Li *et al.*, 2007).

Hasta la fecha, se han encontrado hongos endófitos en todas las especies de plantas que han sido analizadas con este fin, tanto en zonas tropicales y de clima templado, como desérticas o boreales (Porrás Alfaro *et al.* 2008).

### **3.5. Hongos endófitos**

Los endófitos son hongos que viven por todo o al menos una parte significativa de su ciclo de vida de una forma no sintomática dentro de tejidos o células de plantas. Carroll (1995), menciona que los endofíticos han evolucionado de un estado patogénico a un estado de latencia asociado a una reducción de la virulencia, estos hongos son residentes abundantes de las plantas en algunos casos más que los patógenos y micorrizas. Cuando la colonización de los tejidos le confiere una protección a la planta hospedera contra el ataque de agentes bióticos y abióticos, estos se denominan mutualistas. El hongo puede expresar su simbiosis hacia la planta de dos maneras; una de ellas es desarrollando una infección que produce una resistencia sistémica debido a una biomasa sustancial interna y por la producción de potentes toxinas que presentan un efecto detrimental hacia los patógenos que atacan a las plantas (Clay 1990). Micólogos y ecologistas que investigan la interacción endofítico-planta aceptaron estas interacciones como mutualismo (Breen 1994, Carroll 1986). De Bary (1986), afirma que es posible convenir que los endofíticos que viven internamente en la planta de una manera no sintomática han llegado a ser sinónimo de mutualistas. La mayoría de los hongos endófitos pertenecen al grupo de los ascomicetos. Éstos pueden beneficiar a las plantas de dos maneras: alterando la fisiología de la planta, llevándolas a aumentar su crecimiento y pueden incrementar la resistencia al estrés causado por factores abióticos. Esto puede ser consecuencia de la producción de biomasa radical y el efecto biocontrolador que tienen sobre los fitonemátodos, lo que permite el aumento de la eficiencia del sistema radical en la obtención de nutrientes.



La presencia de microorganismos como rizobacterias, hongos depredadores de nemátodos, endomicorrizas y hongos endófitos, hace más efectiva la capacidad amortiguadora de un suelo en la naturaleza, para suprimir la mayoría de los patógenos de suelo y problemas de nematodos.

### **3.6. Importancia del estudio de los hongos endófitos**

Desde el punto de vista de la Fitopatología, hay varios motivos que justifican el interés por los endófitos. Estos hongos se asemejan a los patógenos en varios procesos del ciclo de la enfermedad. Los endófitos pueden llevar a cabo los procesos de penetración, infección, y en algunos casos de invasión de la planta; sin embargo, ni causan enfermedad, ni son eliminados por una respuesta de defensa del hospedante. De ahí que surjan cuestiones como, ¿Por qué algunos hongos causan enfermedades y otros no?, ¿Cómo puede un hongo evadir las defensas inducibles de una planta?, este tipo preguntas son el resultado del conocimiento sobre endófitos y pueden derivar en hipótesis para estudiar los mecanismos de patogenicidad o de evolución de la virulencia (Agrios, 2005).

A juzgar por los resultados obtenidos en censos de endófitos, es posible que la mayoría de las especies que infectan a una especie vegetal no sean patógenas, sino endófitas. Sin embargo, ya hemos visto que un hongo que se comporta como endófito en una especie puede ser un patógeno en un hospedante de otra especie (Redman *et al.*, 2001). Estas observaciones hacen pensar que lo que se considera un “patógeno especializado”, porque sólo causa enfermedad en una especie, sea posiblemente un endófito en otras especies. También nos remontan a casos de parásitos animales, como algunos virus de simios (ej. Simian Herpes virus B, tal vez VIH) que son endémicos e incluso asintomáticos en sus huéspedes, pero al cambiar de especie e infectar humanos tienen un efecto letal (Nsabimana *et al.*, 2008).

Dada la ubicuidad de los endófitos en los tejidos vegetales, es muy posible que al infectar plantas los patógenos tengan que interactuar con los endófitos. En algunos casos estos endófitos pueden alterar el curso de las enfermedades, lo que



sugiere que el grupo de los hongos endófitos alberga especies potencialmente útiles como agentes de control biológico; de ahí que tengan potencial como agentes de control biológico, contra enfermedades y plagas de plantas, e incluso de animales (Backman y Sikora, 2008).

Los endófitos también constituyen una fuente importante de sustancias de interés farmacológico (Strobel, 2002). Es posible que la producción de sustancias antibióticas ayude a estos hongos a preservar su nicho ante otros competidores. Un claro ejemplo de este tipo de sustancias es el taxol, que es un diterpenoide muy eficaz como fungicida y como agente antitumoral, el cual es producido en la corteza del árbol *Taxus brevifolia*, y también por uno de sus hongos endófitos, *Taxomyces andreae* (Stierle *et al.*, 1993). Otro ejemplo son los hongos de la familia Xylariaceae, una de las más comunes en los endófitos de zonas tropicales, los cuales producen abundantes sustancias bioactivas como son las citocalasinas y griseofulvinas (Whalley y Edwards, 1987). Buena evidencia del interés de los hongos endófitos para la industria farmacéutica es que este trabajo ha sido financiado por Merck, Sharp & Dohme; extractos de todos los aislados descritos en ella han sido analizados para comprobar si poseían actividad antifúngica y antibacteriana.

Otra utilidad de los endófitos puede ser en la industria del petróleo, ya que es una de las principales contaminantes del medioambiente, y desde hace años se investiga el posible uso de los microorganismos para degradar esos contaminantes a metabolitos menos tóxicos y persistentes, en el proceso conocido como biorremediación (Atlas y Cerniglia, 1995).

Finalmente, si tal como se ha estimado, hoy en día se conocen menos del 10% de las especies de hongos que podrían existir (Hawksworth, 2001), es muy posible que el estudio de los hongos endófitos que habitan en los ecosistemas conlleve al descubrimiento de nuevas especies de hongos (Atlas y Cerniglia, 1995).



### 3.7. Abundancia y diversidad taxonómica

Las asociaciones entre endófitos no sistémicos y plantas vienen marcadas por la ubicuidad. Hasta la fecha se han descubierto endófitos en todas las especies vegetales que han sido analizadas (Saikkonen *et al.*, 1998) y en los ecosistemas más variados, desde bosques tropicales, a tundras y desiertos (Fisher *et al.*, 1995).

La diversidad taxonómica de los endófitos no sistémicos es notable. El número de especies endofíticas asociadas a cada especie vegetal es elevado; en censos de endófitos anteriores al año 2000, como media se identificaron unas 50 especies por cada especie de planta analizada (Stone *et al.*, 2004). Cuando se empezaron a utilizar métodos moleculares para la identificación de especies fúngicas este número aumentó debido a que muchas especies pudieron ser clasificadas (Arnold *et al.*, 2000). Este avance ha supuesto que en algunos censos se hayan detectado cientos de especies endófitas en una sola especie vegetal (Collado *et al.*, 1999).

A pesar de esta notable abundancia y variabilidad taxonómica, hay dos motivos por los cuales se debe pensar que la diversidad observada en muchos censos de endófitos es una infraestimación. En primer lugar, la mayoría de los censos realizados se han basado en especies cultivables en medios sintéticos, lo cual excluye a los parásitos obligados. Algunos estudios han mostrado la existencia de endófitos de este tipo utilizando técnicas basadas en la amplificación selectiva de DNA fúngico presente en tejido de planta (Duong *et al.*, 2006). En segundo lugar, las curvas de acumulación de especies que muestran como aumenta el número de especies fúngicas según aumenta el número de plantas analizadas han resultado ser no asintóticas en algunos censos bastante intensivos (Arnold *et al.*, 2000); esto indica que existen más especies endófitas de las que se han identificado en estos trabajos. Dentro de una misma especie hospedante, la composición de su micobiota endofítica varía dependiendo de factores geográficos como la distancia entre plantas o la estación del año (Collado *et al.*, 1999). Estos factores contribuyen a la notable diversidad observada en la micobiota endofítica.



### 3.8. Especificidad de tejidos

Los endófitos no sistémicos se han encontrado en diversas partes de las plantas, como hojas, tallos, órganos reproductores e incluso semillas. Esto los distinguiría de las micorrizas, las cuales solo infectan la raíz de las plantas. Sin embargo algunos endófitos pueden también alojarse en tejidos de la raíz (Atlas y Cerniglia, 1995).

En los estudios con hojas, que son los órganos en los que más se ha estudiado la presencia de endófitos, las tasas de infección son elevadas, ya que entre el 78 y el 100 % de las hojas analizadas contienen endófitos (Arnold *et al.*, 2000). Al estudiar la distribución de los endófitos en las hojas, se han obtenido estimaciones que indican que entre el 30 y el 73 % de los fragmentos de cada hoja pueden estar colonizados por endófitos (Rodríguez, 1994).

En estudios realizados a finales del siglo pasado se vio que es habitual que haya diferencias entre la frecuencia de endófitos aislados de varios órganos de la planta (Fisher, 1995 y Rodríguez, 1994). Pocos estudios hablan de una especificidad de los endófitos por el tejido. Se han visto casos de especificidad de ciertos endófitos por las raíces de las plantas (Jumpponen y Trappe, 1998). En trabajos sobre endófitos de hojas, no se puede afirmar que las especies aisladas muestren especificidad por este tejido, ya que no se han realizado los estudios pertinentes para saber si en otras partes de la planta podrían aislarse las mismas especies como endófitos. Lo que si se ha observado es que dentro de las hojas puede existir especificidad por la zona donde se alojan dichos hongos, ya que se ha visto que una especie desconocida de *Phomopsis* se aloja únicamente en el raquis de las hojas de *Spondias mombin* (Rodríguez y Samuels, 1999), y en plantas de la especie *Neolitsea sericea* se han aislado unas especies de la hoja y otras especies diferentes del peciolo (Hata y Sone, 2008).

### 3.9. Transmisión

La transmisión de endófitos puede ser horizontal, cuando el inóculo entra en contacto con una planta y la infecta, o vertical, cuando la planta infectada produce



semillas también infectadas. Aunque hay casos como *Epichloë* y *Neotyphodium* cuya transmisión es vertical, la transmisión horizontal parece ser el mecanismo predominante en los hongos endófitos. Algunos estudios han mostrado que las semillas y las plántulas están virtualmente libres de endófitos, y la incidencia de éstos se incrementa cuando las hojas o las semillas envejecen (Arnold *et al.*, 2000).

En vista de que los endófitos no suelen inducir síntomas a sus hospedantes, queda la incertidumbre sobre donde se puede producir el inóculo eneolítico, ya que la producción de inóculo fúngico suele estar a veces asociada a la formación de lesiones y estructuras a menudo macroscópicas en plantas. Los endófitos que se comportan como saprofitos latentes, podrían producir el inóculo tras la muerte de su hospedador. En estos casos, la hojarasca y otros restos vegetales podrían ser un foco de inóculo de endófitos (Bills y Polishook, 1994). En plantas vivas se conocen situaciones en las cuales se producen conidios de manera imperceptible en la superficie foliar (Tadych *et al.*, 2007). Por último, algunos insectos podrían jugar un papel importante en la dispersión del inóculo endófito, al ser las esporas de algunas especies resistentes al paso por su aparato digestivo (Devarajan y Suryanarayanan, 2006).

### **3.10. Tipos de interacción planta-hongo endófito**

Dentro de la gran variedad de especies de hongos que se comportan como endófitos, es posible hacer algunas agrupaciones según la naturaleza de la interacción simbiótica que mantienen con sus hospedantes. Algunas especies identificadas en censos de endófitos son patógenos latentes. El estado de latencia se define como el periodo en el cual una planta está infectada por un patógeno pero no muestra síntomas (Agrios, 2005). Esta definición se refiere a una situación en la cual los síntomas van a aparecer más tarde. Por lo tanto, al recolectar tejido asintomático para determinar la presencia de endófitos es posible que este tejido esté infectado por patógenos latentes. En algunos trabajos se han reinoculado artificialmente endófitos, y como resultado se han observado síntomas de



enfermedad (Photita *et al.*, 2004), o se ha comprobado que ciertas especies endófitas eran conocidas como patógenos en su hospedante (Mostert *et al.*, 2000). En otros casos, un hongo puede actuar como patógeno en unas plantas y como endófito en otras plantas de la misma especie. *Fusarium moniliforme* causa pudrición de granos, raíces, tallos y plántulas de maíz, además de producir cinco tipos de toxinas implicadas en la producción de cáncer de esófago en Suráfrica (Rheeder *et al.*, 1992). Existe evidencia de que *F. moniliforme* puede ser más común como endófito que como patógeno en zonas templadas y tropicales. Como ejemplo, en un estudio realizado en zonas templadas, se aisló *Fusarium* de todos los órganos del total de plantas muestreadas. En las infecciones asintomáticas en maíz, las hifas crecen intercelularmente, mientras que en las patogénicas el crecimiento es además intracelular (Bacon y Hill, 1996). Dado que hay crecimiento activo del hongo, puede existir además producción de micotoxinas; esto sugiere que puede producirse contaminación por estas toxinas en el maíz y sus derivados sin que haya evidencia de infección fúngica. Estas situaciones pueden ser interpretadas, al menos, de dos maneras: el genotipo de la planta influye en la conducta del hongo, o también podría ser el genotipo del hongo el que dicte su tipo de interacción con la planta (Freeman y Rodríguez, 1993).

Otras especies endófitas se comportan como saprofitos latentes, es decir, hongos que infectan asintomáticamente a la planta y que cuando ésta senesce o muere colonizan sus tejidos, pudiendo llegar a formar estructuras reproductivas y completar su ciclo de vida (Promputtha *et al.*, 2007).

Por último, existen interacciones en las cuales el endófito se comporta como un simbionte mutualista. Este tipo de interacciones son bien conocidas en el caso de los endofitos *Epichloë* y *Neotyphodium*. En el caso de otras especies endofíticas, aunque no han sido estudiadas tan a fondo, también abundan los ejemplos. No obstante se han descubierto bastantes situaciones en las cuales, bajo la influencia de factores de estrés biótico o abiótico, las interacciones con endófitos son beneficiosas para las plantas (Rodríguez y Redman, 2008).



### 3.11. Hongos endófitos asociados a la vid

#### 3.11.1.- *Cladosporium herbarum*.

##### a) Clasificación taxonómica

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetidae

Orden: Dothideales

Familia: Mycosphaerellaceae

Género: *Cladosporium*

El orden Dothideales se caracteriza por un lóculo sin filamentos interascales de cualquier tipo. Ascas bitunicadas generalmente dispuestas en fascículos que durante su crecimiento se abren camino en el tejido estromático y forma cavidades a su alrededor (Sabariego, 2004).

##### b) Descripción morfológica

Los conidióforos de *Cladosporium cladosporioides* y *C. herbarum* son de color marrón claro y producen conidios desde la parte central hasta la parte superior del conidióforo. Los conidióforos de *C. cladosporioides* son de 2-6  $\mu\text{m}$  de ancho y hasta 350  $\mu\text{m}$  de largo, y producen conidios unicelulares elipsoidales color marrón de 3-7  $\times$  2-4  $\mu\text{m}$ . Los conidióforos de *C. herbarum* son de 3-6  $\mu\text{m}$  de ancho y hasta 250  $\mu\text{m}$  de largo, y producen conidios color marrón amarillentos de 5.5-13  $\times$  3.8-6.0  $\mu\text{m}$ , que normalmente son unicelulares (Sabariego, 2004).

##### c) Ciclo de vida

Se desarrolla en condiciones de alta humedad relativa con temperaturas altas en el día y noches frescas. Generalmente las hojas son las afectadas, cuyos síntomas inician como manchas de color verde pálido y finalizan de un color grisáceo, se observan en primer lugar en la superficie del haz de la hoja, las manchas coalescen y necrosan el tejido. Ocasionalmente el hongo ataca hojas, pedúnculos, tallos y botones florales. El hongo se dispersa con las corrientes de



aire. Cuando la humedad relativa es superior al 90 % y la temperatura se encuentra entre 20 y 27 °C, la enfermedad puede manifestarse en forma epifítica, después de la floración son muy susceptibles (Sabariego, 2004).

### **3.11.2.- *Alternaria* sp.**

#### **a) Clasificación taxonómica**

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetidae

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

El orden pleosporales tiene un talo o estroma ausente o pobremente desarrollado. Ascostroma peritecial o en raras ocasiones la presencia de un cleistotecio, algunas veces con clípeo, variables en forma, usualmente globosos, de pared gruesa, inmersos, negros normalmente abren por ostiolo, en ocasiones con pelos p setas; la pared es delgada, compuesta de células pseudoparenquimatosas (Seudotecio) ascas usualmente cilíndricas, bitunicadas. Ascosporas hialinas o cafés, septadas, de pared delgada o gruesa, algunas veces muriformes o anamorfos (Tlapal *et al.*, 2013).

La familia pleosporaceae, se caracteriza porque el ascostroma es un seudotecio en donde las ascas permanecen separadas por el tejido estromatico (Tlapal *et al.*, 2013).

#### **b) Descripción morfológica**

Hongo filamentoso con conidióforos simples, tabicados, en cuyo extremo se forman unos conidios muriformes, de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular. Por gemación de la célula apical se genera un nuevo conidio, formándose largas cadenas de 10 o más conidios. Colonias de crecimiento rápido (tres o cuatro días), vellosas, al principio de color gris, después el centro se oscurece (tonos negros más o menos intensos) pero los bordes siguen siendo grisáceos. Tolerante al benomilo (Sabariego, 2004).



### c) Ciclo de vida

Los conidios se desprenden con facilidad y son diseminados por las corrientes de aire. *Alternaria* infecta a varias especies vegetales en todo el mundo. Sus esporas están presentes en el aire y polvo en todas partes. Dichas esporas también llegan al laboratorio y crecen como contaminantes en los cultivos de otros microorganismos y sobre los tejidos vegetales muertos destruidos por otros patógenos u otras causas. De hecho, muchas de las especies de *Alternaria* son principalmente saprofitas, es decir, no pueden infectar a los tejidos vivos de plantas y sólo se desarrollan sobre tejidos vegetales muertos o en proceso de descomposición y, a lo más, sobre tejidos viejos o senescentes, como hojas y pétalos viejos y frutos maduros. Por lo tanto, con frecuencia surge la dificultad para decidir si un hongo del género *Alternaria* que se encuentre sobre un tejido enfermo es la causa de la enfermedad o un contaminante secundario. Muchas especies de *Alternaria* producen toxinas, algunas de las cuales, como la tentoxina, que la produce *A. tenuis*, son no específicas de su hospedante, mientras que otras, como las toxinas AK y AM, que son producidas, respectivamente por *A. kikuchiana* y *A. mali*, son específicas de sus hospedantes correspondientes. Las especies fitopatógenas de *Alternaria* invernan como micelio en los restos de plantas infectadas y en forma de esporas o micelios en las semillas. En caso de que el hongo esté en semillas; ataca a las plántulas (por lo común, después de que han emergido) y produce el ahogamiento de ellas o bien lesiones en el tallo y la pudrición del cuello. Las esporas que forma el hongo en gran abundancia (especialmente cuando las lluvias son frecuentes y hay un rocío abundante) sean desprendidas del micelio para desarrollarse sobre restos de vegetales, malezas o plantas cultivadas infectadas. Las esporas que han germinado penetran a los tejidos susceptibles directamente o a través de heridas, y en poco tiempo producen nuevos conidios que son diseminados por el viento, la lluvia, las herramientas, etc. Con pocas excepciones, las enfermedades causadas por *Alternaria* aparecen con mayor frecuencia sobre tejidos senescentes y



particularmente en plantas de poco vigor, nutrición deficiente o en plantas que crecen bajo algún otro tipo de adversidad debido a condiciones ambientales desfavorables, insectos, otras enfermedades, etc. (Sabariego, 2004).

### **3.11.3.- *Aspergillus* sp.**

#### **a) Clasificación taxonómica**

Phylum: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Este grupo de hongos se caracteriza porque sus ascas tienen pared delgada, de globosas a piriformes, evanescentes, sus ascas se encuentran esparcidas a diferentes niveles, no forman himenio las cuales las cuales se originan de hifas ascógenas en el ascocarpo, las ascoporas son unicelulares, el ascocarpo es típicamente un cleistotecio cerrado pero algunas veces con un ostiolo, peridio del ascocarpo presente o ausente. En el orden Eurotiales se agrupan a aquellos que poseen ascas globosas ovales, esparcidas en un ascocarpo sésil y sin ostiolo, sus ascas son evanescentes en la madurez. En el orden incluye a una de las familias más importantes que es Trichocomaceae, incluye mohos verdes, azules, negros; que tienen entre sus géneros anamórficos a la fase conidial de *Aspergillus* y *Penicillium*. La fase ascal de *Aspergillus* es *Eurotium*, *Neosartoria*, *Emericella* y *Sartoria* (Sabariego, 2004).

#### **b) Descripción morfológica**

*Aspergillus* es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular tiene tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces



separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas. (Revista iberoamericana micología) (Sabariego, 2004).

### **c) Ciclo de vida**

La aflatoxicosis es de importancia mundial, ya que las especies toxigénicas de hongos del género *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, así como la especie más rara *A. nomius*; se encuentran ampliamente distribuidas en climas húmedos y calurosos, en donde contaminan los alimentos y ocasionan un problema crónico y difícilmente controlable; además de que los países fríos también importan estos alimentos contaminados (Rodríguez y Redman, 2008).

*Aspergillus* se propaga a través del aire, del suelo y por medio de insectos que lo diseminan. Pueden inocular y colonizar los granos en cualquier tiempo desde la fecha de floración hasta la de cosecha, particularmente cuando se presentan simultáneamente algunas condiciones como la sequía, el daño de los granos por insectos o condiciones subóptimas de temperatura y humedad en el almacenamiento. Entonces los hongos infectan las semillas o cereales y producen las aflatoxinas (Abarca *et al.*, 1994).

### **3.11.4.- *Phoma* sp.**

#### **a) Clasificación taxonómica**

Phylum: Deuteromycota

Clase: Coelomycetes

Orden: Sphaeropsidales

#### **b) Descripción morfológica**

Forma picnidios que cuando maduran, rompen la epidermis de la hoja. Son picnidios oscuros de 154 x 128 µm, globosos, inmersos en el tejido del



hospedante, levantando en una pequeña porción la epidermis, conidióforos simples y cortos, conidios unicelulares, pequeños de  $2.85 \times 1.28 \mu\text{m}$ , hialinos ovoides o algo alargados (Abarca *et al.*, 1994).

### **c) Ciclo de vida**

Es un hongo de ciclo rápido, las esporas se dispersan por el viento y agua de lluvia, generalmente infectan tejidos debilitados. En ocasiones son primarios y pueden causar la muerte de puntas. Una vez que el hongo inicia su infección se requiere de pocas semanas para su fructificación. El inóculo de este patógeno aparece en diferentes épocas del año; la producción de esporas se presenta durante todos los meses, pero se incrementa en la época de lluvias. Las esporas son llevadas por el viento y sólo aquellas que caen en heridas recientes, que estén en el follaje o en las ramillas tiernas, germinan y se introducen con éxito en el hospedante. Las heridas representan un factor esencial para la colonización de éste patógeno y pueden ser causadas por insectos chupadores, lesiones por contaminantes o por daños mecánicos. *Phoma* sp., ocasiona manchas en las hojas, de forma irregular y se presentan en toda la superficie foliar, dándole una apariencia tostada. Son lesiones café rojizo o casi negro que se pueden originar en el margen de las hojas y ocasionan su deformación, estas lesiones pueden llegar a crecer hasta 5 mm. (Rodríguez y Redman, 2008),



### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Descripción de las áreas de estudios

La presente investigación se llevó a cabo en el año 2014, en dos viñedos ubicados en la región vitícola del estado de Querétaro (Figura 3).

##### **Viñedos “La redonda”**

Se localiza en el municipio de Ezequiel Montes, ubicado sobre la Carretera San Juan del Río - Ezequiel Montes, Kilómetro 33.5, sobre los paralelos 20° 46' y 20° 32' de latitud norte; los meridianos 99° 44' y 100° 00' de longitud oeste; altitud entre 1 600 y 2 600 m. (INEGI, 2015).

##### **Viñedos “Los rosales”**

Se localiza en el municipio de Tequisquiapan, ubicado sobre la Carretera San Juan del Río – Tequisquiapan, Kilometro 27, sobre los paralelos 20° 40' y 20° 25' de latitud norte; los meridianos 99° 49' y 100° 06' de longitud oeste; altitud entre 1 700 y 2 800 m. (INEGI, 2015).



Figura 3. Ubicación geográfica de las zonas de estudios Ezequiel Montes y Tequisquiapan, Qro.



### 4.2. Colecta de material vegetal

El material vegetal se colectó al azar en parcelas de vid cultivada (parras en producción). Se realizó un muestreo de manera aleatoria (Figura 4), con la finalidad de tener mayor variabilidad entre los aislamientos, tomando aproximadamente 5 hojas de la parte media de la parra. Por cada muestra colectada se elaboró una cédula de información básica, conteniendo la variedad de la planta. Estas muestras se colocaron en bolsas de papel y plástico con cierre hermético y se mantuvieron en refrigeración a 4° C hasta su posterior manejo. Se colectaron 30 muestras en el rancho “Los Rosales” y 20 muestras en el Rancho “La Redonda”. Tomando 10 muestras por hectárea (Figura 5) (Información personal).

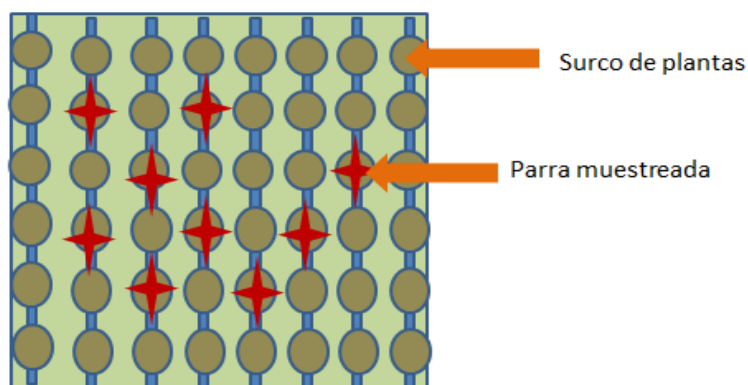


Figura 4. Patrón de colecta del material vegetal



Figura 5. Parcela de vid en Ezequiel Montes, Qro.



### 4.3. Aislamientos del hongo

Se cortaron pequeños trozos de hojas tejido sano - tejido enfermo, se lavaron por 3 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 3 %, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente (sanitas) por 5 minutos junto al mechero (Figura 6) y (Cuadro 1) (Protocolo utilizado en el Laboratorio de Investigación de Fitopatología del Depto. de Parasitología Agrícola, UACH).



Figura 6. Desinfección de material vegetal

Para sembrar el material vegetal esterilizado, se preparó medio de cultivo PDA (100 g de papa, 20 g de dextrosa y 18 g de agar) en un 1 L de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121° C (15 lb) por 15 min. Una vez preparado el medio se dejó enfriar y se vació en cajas Petri desechables de 10 cm de diámetro bajo condiciones asépticas. Se sembraron 4 trozos de hojas por muestra en cajas Petri con medio de cultivo, se sellaron con parafilm y se mantuvieron en condiciones de laboratorio a 27 °C, por 3 días. Transcurrido este tiempo, se observaron distintas colonias creciendo sobre el medio de cultivo. Se extrajo una parte de este medio de cultivo y se transfirieron a cajas nuevas con el objetivo de purificar las



colonias. Los aislamientos obtenidos se conservaron a temperatura ambiente de 27 °C en laboratorio, hasta que estos presentaron esporulación (aprox. 3 días).

Cuadro 1. Aislamientos de hongos endofíticos, cultivar y zona geográfica donde fueron colectados.

| No. | Aislamiento | Variedad           | Municipio       | No. | Aislamiento | Variedad           | Municipio    |
|-----|-------------|--------------------|-----------------|-----|-------------|--------------------|--------------|
| 1   | H1          | Malbec             | Ezequiel Montes | 26  | H26         | Cabernet Sauvignon | Tequisquipan |
| 2   | H2          | Malbec             | Ezequiel Montes | 27  | H27         | Malbec             | Tequisquipan |
| 3   | H3          | Malbec             | Ezequiel Montes | 28  | H28         | Malbec             | Tequisquipan |
| 4   | H4          | Malbec             | Ezequiel Montes | 29  | H29         | Malbec             | Tequisquipan |
| 5   | H5          | Malbec             | Ezequiel Montes | 30  | H30         | Malbec             | Tequisquipan |
| 6   | H6          | Cabernet Sauvignon | Ezequiel Montes | 31  | H31         | Malbec             | Tequisquipan |
| 7   | H7          | Cabernet Sauvignon | Ezequiel Montes | 32  | H32         | Malbec             | Tequisquipan |
| 8   | H8          | Cabernet Sauvignon | Ezequiel Montes | 33  | H33         | Merlot             | Tequisquipan |
| 9   | H9          | Cabernet Sauvignon | Ezequiel Montes | 34  | H34         | Merlot             | Tequisquipan |
| 10  | H10         | Cabernet Sauvignon | Ezequiel Montes | 35  | H35         | Merlot             | Tequisquipan |
| 11  | H11         | Merlot             | Ezequiel Montes | 36  | H36         | Merlot             | Tequisquipan |
| 12  | H12         | Merlot             | Ezequiel Montes | 37  | H37         | Merlot             | Tequisquipan |
| 13  | H13         | Merlot             | Ezequiel Montes | 38  | H38         | Merlot             | Tequisquipan |
| 14  | H14         | Merlot             | Ezequiel Montes | 39  | H39         | Chardonnay         | Tequisquipan |
| 15  | H15         | Merlot             | Ezequiel Montes | 40  | H40         | Chardonnay         | Tequisquipan |
| 16  | H16         | Chenin blanc       | Ezequiel Montes | 41  | H41         | Chardonnay         | Tequisquipan |
| 17  | H17         | Chenin blanc       | Ezequiel Montes | 42  | H42         | Chardonnay         | Tequisquipan |
| 18  | H18         | Chenin blanc       | Ezequiel Montes | 43  | H43         | Chardonnay         | Tequisquipan |
| 19  | H19         | Chenin blanc       | Ezequiel Montes | 44  | H44         | Chardonnay         | Tequisquipan |



|    |     |                    |                 |    |     |          |               |
|----|-----|--------------------|-----------------|----|-----|----------|---------------|
| 20 | H20 | Chenin blanc       | Ezequiel Montes | 45 | H45 | Moscatel | Tequisquiapan |
| 21 | H21 | Cabernet Sauvignon | Tequisquiapan   | 46 | H46 | Moscatel | Tequisquiapan |
| 22 | H2  | Cabernet Sauvignon | Tequisquiapan   | 47 | H47 | Moscatel | Tequisquiapan |
| 23 | H23 | Cabernet Sauvignon | Tequisquiapan   | 48 | H48 | Moscatel | Tequisquiapan |
| 24 | H24 | Cabernet Sauvignon | Tequisquiapan   | 49 | H49 | Moscatel | Tequisquiapan |
| 25 | H25 | Cabernet Sauvignon | Tequisquiapan   | 50 | H50 | Moscatel | Tequisquiapan |

#### 4.4. Identificación molecular

Se eligieron 12 crecimientos, tomando al azar 6 cultivos del municipio de Ezequiel Montes y 6 cultivos del municipio de Tequisquiapan para realizar la identificación molecular (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aislamientos de hongos endófitos seleccionados para la identificación molecular

| No. | Aislamiento | Variedad           | Municipio       |
|-----|-------------|--------------------|-----------------|
| 1   | H1          | Malbec             | Ezequiel Montes |
| 2   | H4          | Malbec             | Ezequiel Montes |
| 3   | H7          | Cabernet Sauvignon | Ezequiel Montes |
| 4   | H9          | Cabernet Sauvignon | Ezequiel Montes |
| 5   | H13         | Merlot             | Ezequiel Montes |
| 6   | H20         | Chenin blanc       | Ezequiel Montes |
| 7   | H2          | Cabernet Sauvignon | Tequisquiapan   |
| 8   | H27         | Malbec             | Tequisquiapan   |
| 9   | H39         | Chardonnay         | Tequisquiapan   |
| 10  | H44         | Chardonnay         | Tequisquiapan   |
| 11  | H49         | Moscatel           | Tequisquiapan   |
| 12  | H50         | Moscatel           | Tequisquiapan   |



La identificación molecular se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología de semillas del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. Se identificaron por medio de la amplificación y secuenciación de la región (ITS) de la unidad 16s del ADN ribosomal mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los primers ITS5- ITS4 (Silva, 2014<sup>1</sup>).

### **4.4.1. Extracción de ADN para hongos método CTAB 2% y acetato de sodio**

Se utilizó el protocolo de Doyle & Doyle (1990), para la obtención de ADN genómico CTAB:

Se precalentó el CTAB 2% (Tris-HCL 10 Mm p.H. 8.0; Na<sub>2</sub> EDTA 2 H<sub>2</sub>O 20 Mm, pH 8.0; CTAB 2%; NaCl 1.4 M) a 60 ° C. Se etiquetaron previamente los tubos eppendorf a utilizar. De cada uno de los 12 aislamientos seleccionados, se colocó en cada uno de los tubos eppendorf de 2 ml de volumen, previamente etiquetado, una porción de 1 cm<sup>2</sup> de medio de cultivo con el hongo a analizar, esto debido a que hubo buena cantidad de micelio y no se necesitó de preparar el cultivo en nitrógeno líquido. Posteriormente se colocó 1000 µL de CETAB % a cada uno de los tubos (Figura 7a), mezclando por inmersión para homogenizar el tejido con la solución amortiguadora. Después se incubaron los tubos eppendorf a una temperatura de 96 ° C, por una hora, dando un vortex a intervalos de cada 10 minutos (Figura 7b). Se retiraron los tubos de la incubadora y se dejaron enfriar por 10 minutos, después se centrifugaron a 11150 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se colocó en tubos de 1.5 µL previamente etiquetados y agregando a estos 500 µL de cloroformo-isoamilico (24:1) a cada tubo se mezclan se mezclaron posteriormente por inmersión durante 10 minutos y a continuación se volvió a dar una centrifugada a 11150 rpm por 10 minutos (Figura 7c), en tubos eppendorf nuevos previamente etiquetados se colocó 700 µL de cloroformo-isoamilico (24:1) y se agregó a estos el sobrenadante después de la centrifugada. Posteriormente se mezclaron por inmersión durante 10 minutos a temperatura ambiente, después de esto se colocaron en la centrifuga nuevamente por 10

<sup>1</sup>No publicado, comunicación personal.



minutos a 10000 rpm. Por otra parte, en tubos nuevos previamente etiquetados se adicionó 950  $\mu$ L de etanol 100 % frío y se refrigeró a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de utilizarlos, y después se pasó el sobrenadante a estos tubos. Se Mezcló al menos 7 veces por inmersión y se incubó por 2 horas a  $20^{\circ}\text{C}$ . Después de este tiempo se volvió a centrifugar a 11150 rpm por 30 minutos a continuación se desechó el sobrenadante evitando perder la pastilla (Figura 7d). Posteriormente se suspendió la pastilla en 400  $\mu$ L de TE y se incubó a  $55^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, se añadió 34  $\mu$ L de NaOAc 3M y 1 ml de etanol al 95 %. Se volvió a incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Pasado este tiempo los tubos se colocaron en la centrifuga a 11150 rpm durante 5 minutos y después se desechó el sobrenadante. Finalmente se dio un último lavado a la pastilla adicionando 600  $\mu$ L de isopropanol al 70 %, a los tubos se les dio nuevamente una centrifugada a 11150 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante, después se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente (Figura 7e). Por último se resuspendió la pastilla en 100  $\mu$ L de TE y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

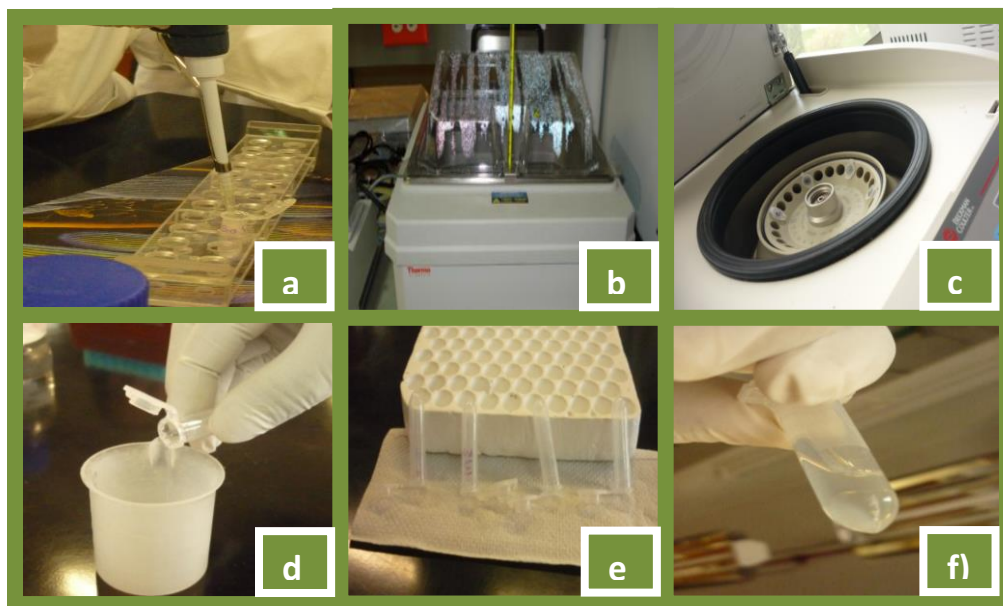


Figura 7. Procedimiento de DNA de hongos mediante el método de CETAB 2%; **a)** Adición de CETAB 2% en cada tubo; **b)** Colocación de tubos eppendorf a una temperatura de  $96^{\circ}\text{C}$ ; **c)** Centrifugación de muestras; **d)** Desecho de sobrenadante; **e)** Secado de la pastilla de DNA y **f)** Material genético diluido en TE.



### 4.4.2. Cuantificación del DNA

Durante el aislamiento del material genético pueden co-extraerse otras moléculas indeseables que tienen una absorbancia máxima de luz (UV) en diferentes longitudes de onda a la de los ácidos por lo anterior las 12 muestras fueron cuantificadas en un espectrofotómetro Nano Drop 2000c de BIORAD® y se determinó la relación 260/280 nm que nos indica la calidad del ADN (Figura 8).

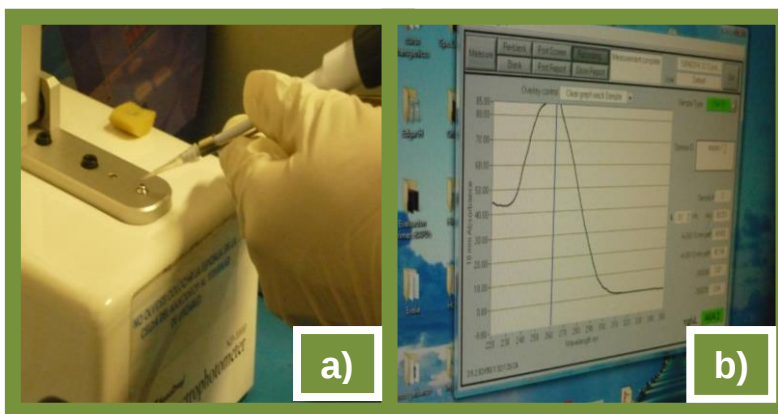


Figura 8. Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría

### 4.4.3. Identificación molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la realización de la PCR se siguió el método descrito por Sambrook (1986) y Bainbridge *et al*, 1990 para bacterias y hongos:

Se realizó la identificación de las 12 muestras seleccionadas amplificando la región ITS (espacio transcrito interno) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo a los protocolos del laboratorio de Biotecnología y Bioquímica de Semillas del Colegio de Postgraduado. Se tomaron los reactivos necesarios para la preparación de la mezcla de la reacción Mix, todos estuvieron bajo condiciones de frío (durante la preparación de la mezcla) (Cuadro 3).



Cuadro 3. Reactivos utilizados para la preparación de la reacción mix utilizada en PCR convencional.

| Reactivo                 | 1x (μL) | 13x (μL) |
|--------------------------|---------|----------|
| Buffer                   | 3.0     | 39.0     |
| DNTPs                    | 0.6     | 7.8      |
| Primer <sub>f</sub> ITS5 | 0.18    | 2.34     |
| Primer <sub>r</sub> ITS4 | 0.18    | 2.34     |
| Taq. ADN polimerasa      | 0.18    | 2.34     |
| Agua HPLC                | 7.86    | 102.18   |
| ADN                      | 3.0     | 39.0     |

Después de realizar los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de reactivos a utilizar en la técnica de PCR, en un tubo previamente etiquetado de 1.5 ml, se adicionaron los reactivos primero se colocó el agua HPLC (102.18 μL), después el Buffer mezcla en la cual ya viene el ClMg (39.0 μL), posteriormente los DNTPs (7.8 μL), luego los PRIMERS ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') y ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), 2.34 μL de cada uno respectivamente y finalmente se adiciono la Taq. ADN polimerasa (2.34 μL), este último reactivo siempre debe permanecer en condiciones de -20 ° C. Una vez colocados todos los reactivos se le dio un vortex para tener una mezcla homogénea, después en una gradilla completamente esterilizada se colocaron tubos nuevos especiales para PCR previamente etiquetados, posteriormente se añadió 12 μL de la reacción mix a cada uno de los tubos para PCR, después se adicionó a cada tubo 3 μL de DNA para esto fue necesario cambiar las puntas y evitar que se contaminaran las muestras. Cada tubo conto con un volumen de 15 μL. Después se colocaron en un termociclador (BIORAD®-ADN Engine), con el siguiente programa: un ciclo a 95 °C por 4 min, un ciclo a 95° por 2 min, un ciclo a 55 °C por 1 min, 35 ciclos a 72 °C por 2 min y finalmente un ciclo a 72 °C por 2 min.



### 4.4.4. Electroforesis

Una vez obtenido el producto de PCR, se prosiguió a evaluar las muestras mediante una electroforesis para determinar el tamaño del material genético según el marcador molecular utilizado, que en su caso fue de 1 Kb. Para realizar este procedimiento se hizo la preparación del Buffer TAE 1X (compuesta por Tris, Acetato y EDTA), el cual viene a una concentración de 10X. Después se prosiguió a preparar el gel al 1.5 % de concentración, para esto, en un matraz se adicionó 100 ml de TAE 1X, y se agrega 1.5 gr de agarosa, para obtener una mezcla homogénea e hialina se somete al horno por 2 minutos. Posteriormente se añadió 2 ml el reactivo GelRed, el cual sirvió para revelar las bandas en el transiluminador, y ya no se utilizó el bromuro de etidio. Una vez que la mezcla alcanza una temperatura ambiente se prosiguió a preparar la cámara de electroforesis, anivelándola y colocando los peines para la formación de los pocillos. Después se vació la mezcla en la cámara (Figura 9a) y se dejó reposar durante 30 minutos para que se formara el gel, posteriormente se vació a la cámara el buffer TAE 1X, y se cargaron las muestras en cada uno de los pocillos, para esto se utilizó un buffer de carga verde (Figura 9b) para la visualización de las muestras. Se colocó 1.5  $\mu$ L de buffer carga verde y 3  $\mu$ L de material genético. Una vez cargadas todas las muestras se conectaron a la energía eléctrica durante 1:40 minutos a 70 V. Después de este tiempo se visualizó el gel en el transiluminador EDAS- Kodak (Eastman Kodak Co. New Haven, CT, USA).

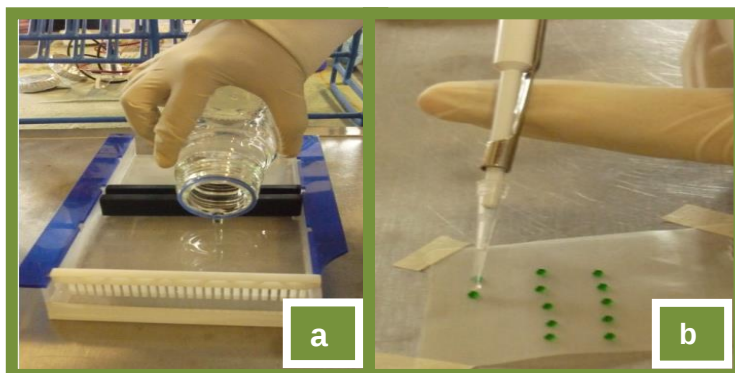


Figura 9. a) Cámara de electroforesis y b) Buffer colorante verde



### **4.4.5. Limpieza del DNA para secuenciación**

Después de la PCR se agregó EXOSAP reactivo que siempre debe de estar en frío. Para esto se colocó 5 µL del producto de PCR en un tubo nuevo previamente etiquetado y se adicionó 2 µL de EXOSAP, se dio un vortex y se colocaron las muestras nuevamente en el termociclador (Silva, 2014<sup>2</sup>).

### **4.4.6. Secuenciación del ADN y comparación en el GenBank®**

El ADN purificado fue secuenciado en el laboratorio de biotecnología de semillas del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, Montecillos, México, usando el software BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), donde se obtuvieron las secuencias consenso para llevar a cabo su comparación empleando la aplicación BLAST del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para obtener las posibles homologías con secuencias almacenadas en la base de datos (Silva, 2014<sup>3</sup>).

### **4.5. Velocidad de crecimiento**

De los doce aislamientos seleccionados se tomó medidas de la velocidad de crecimiento radial sobre la caja Petri con medio de cultivo sólido donde se sembraron los aislamientos, la medición se realizó durante ocho días consecutivos, realizando las mediciones en mm y cm (Figura 10).

<sup>2 y 3</sup> No publicado, comunicación personal.

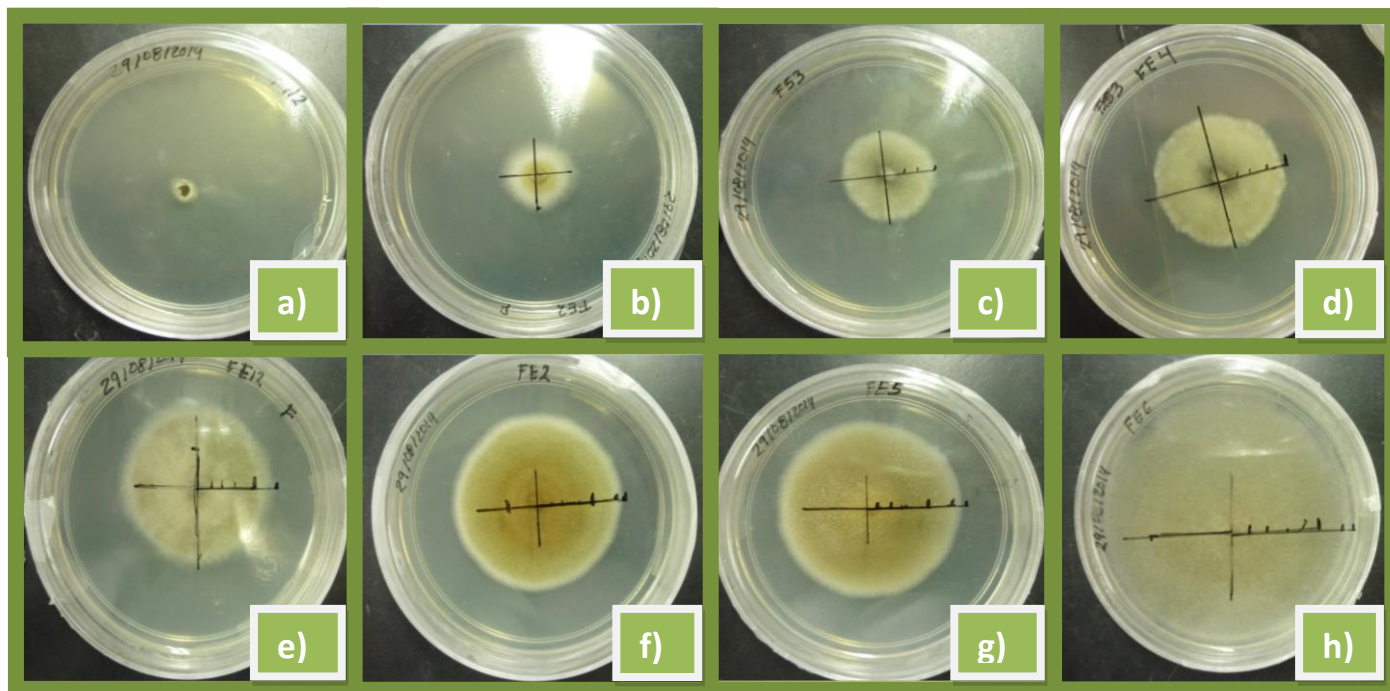


Figura 10. Velocidad de crecimiento de los aislamientos durante ocho días de medición: **a)** Día uno; **b)** Día dos; **c)** Día tres; **d)** Día cuatro; **e)** Día cinco; **f)** Día seis; **g)** Día siete y **h)** Día ocho.

#### 4.6. Prueba de patogenicidad

Una vez obtenidos los resultados del GenBank, se procedió a evaluar las cepas identificadas, utilizando los siguientes aislamientos para la prueba de patogenicidad (Cuadro 4).

Cuadro 4. Aislamientos evaluados en la prueba de patogenicidad

| No. | Aislamiento | Variedad | Municipio       |
|-----|-------------|----------|-----------------|
| 5   | H13         | Merlot   | Ezequiel Montes |
| 12  | H50         | Moscatel | Tequisquiapan   |



Para realizar esta prueba se procedió a preparar la suspensión de inóculo con los aislamientos mencionados anteriormente, los materiales utilizados fueron un matraz de 500 ml de volumen, un atomizador, una licuadora, agua destilada-esteril y el aislamiento 5 y 12, y para la cámara humedad se utilizó una charola, sanitas esterilizadas, plástico transparente para cubrir, y el material vegetal a inocular usando 5 racimos de uvas para cada aislamiento (Figura 11).



Figura 11. Material utilizado para la prueba de patogenicidad

Se licuó en 250 ml de agua destilada-esteril y glicerina cada uno de los aislamientos, desprendiendo el hongo con todo y medio de cultivo, posteriormente se vertió en un recipiente hasta aforar a 2 litros de agua, después en un atomizador se colocó la solución de inóculo ( $1 \times 10^4$ ), por otro lado se prepararon dos cámaras húmedas y se colocaron 5 racimos de uvas en cada una de ellas, a continuación se inoculó cada una de las cámaras con el hongo correspondiente (Figura 12a y 12b).



Figura 12.- a) Inoculación de racimos de uva y b) Cámara humedad después de inocular

La evaluación se realizó durante ocho días, determinando las lesiones y fructificaciones asexuales de *Phoma sp.* y *Phoma glomerata*.

#### 4.7. Evaluación de datos

Los datos obtenidos del crecimiento micelial se analizaron mediante el programa The SAS System for Windows 9.0 de acuerdo a la prueba de la LSD ( $p \leq 0.05$ ).



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Identificación molecular

De las secuencias obtenidas de los 12 aislamientos producto de la PCR de la región ITS4 y ITS5 del ADN ribosomal fueron homologas en un 99 % y 100 % a las secuencias depositadas en el GenBank (Cuadro 5).

Cuadro 5. Secuencias obtenidas de 12 aislamientos obtenidos de muestras de hojas de vid y comparadas en el GenBank

| Aislamiento | Especie identificada        | % de similaridad | Municipio       |
|-------------|-----------------------------|------------------|-----------------|
| H1          | <i>Alternaria alternata</i> | 100              | Ezequiel Montes |
| H4          | <i>Phoma</i> sp.            | 100              | Ezequiel Montes |
| H7          | <i>Alternaria alternata</i> | 99               | Ezequiel Montes |
| H9          | <i>Alternaria alternata</i> | 100              | Ezequiel Montes |
| H13         | <i>Phoma</i> sp.            | 100              | Ezequiel Montes |
| H20         | <i>Alternaria alternata</i> | 100              | Ezequiel Montes |
| H2          | <i>Alternaria alternata</i> | 100              | Tequisquiapan   |
| H27         | <i>Phoma</i> sp.            | 99               | Tequisquiapan   |
| H39         | <i>Phoma</i> sp.            | 100              | Tequisquiapan   |
| H44         | <i>Phoma glomerata</i>      | 99               | Tequisquiapan   |
| H49         | <i>Alternaria alternata</i> | 99               | Tequisquiapan   |
| H50         | <i>Phoma glomerata</i>      | 99               | Tequisquiapan   |

En estos resultados se describe la composición de las comunidades de hongos encontrados dentro de los tejidos de varios cultivares de vid de la región vitícola del estado de Querétaro, de manera general los hongos asociados se encuentran dentro de los ascomicetos y deuteromycetos (hongos imperfectos), donde del 100



% de los hongos identificados, el 50 % de los aislamientos pertenecen a *Alternaria alternata* encontrados en las variedades Malbec, Cabernet Sauvignon, Chenin blanc y Moscatel; el 33 % a la especie *Phoma* sp., hallados en las variedades Malbec, Merlot y Chardonnay; y el 17 % pertenece a la especie *Phoma glomerata* aislados de los cultivares Chardonnay y Moscatel.

Según Musetti *et al.*, (2006), *Alternaria alternata* también ha sido identificado como agente de biocontrol prometedor contra patologías específicas como el mildiu de la vid causada por *Plasmopara viticola*, sin embargo, es importante mencionar que actualmente no se tienen estudios que respalden este planteamiento, por lo tanto se sigue considerando a *Alternaria alternata* como un agente fitopatológico de muchas especies cultivables. En cuanto a *Phoma* sp., y *P. glomerata* se tienen varios experimentos donde se plantea su acción como control biológico debido a que se le han encontrado sustancias antifungicas como lo menciona Closse *et al.*, (1966), quien aisló de este hongo una sustancia llamada epoxydon y le atribuye la capacidad de ser antitumoral para algunas especies que son atacadas por hongos que causan tumores o agallas en las plantas cultivables. Nagasawa *et al.* (1978) menciona que epoxydon funciona como una sustancia fitotóxica, en primera designada como phyllosinol, desde *Phyllosticta* sp., la fitotóxina causó necrosis en las hojas de trébol rojo (*Trifolium pratense* L.), trébol blanco (*T. repens*), alfalfa (*Medicago sativa*), avena (*Avena sativa*) y el mijo japonés (*Echinochloa frumentacea*) cuando se pulveriza a 100 mg/ml (Sakai *et al.*, 1970).

En el municipio de Ezequiel Montes se encontró en un 66.67 % a *Alternaria alternata*, en un 50 % a *Phoma* sp. y en el municipio de Tequisquiapan 33.34 % a *Alternaria alternata*, 50 % a *Phoma* sp. y 100 % de *Phoma glomerata*. Lo anterior corresponde a lo señalado por Carroll y Carroll, (1978), donde menciona que la composición de la diversidad, abundancia y especies de endófitos depende de muchos factores tales como el sitio de muestreo, la edad del tejido, y la ubicación geográfica, este último reconocido como uno de los más importantes. Así mismo lo menciona Bills *et al.*, (1992), donde informa que la composición de la abundancia, diversidad y especies de endófitos puede ser fuertemente influenciado por la



localidad de muestreo. De acuerdo a lo anterior se observa que hay variación en cuanto a la diversidad y abundancia de los hongos endófitos, para el caso de *Phoma* y *P. glomerata* que se reportan como agentes de control biológico, se pueden utilizar potencialmente en el manejo biológico de hongos fitopatógenos en el cultivo de la vid en el municipio de Ezequiel Montes y Tequisquiapan, Qro. (Figura 13).

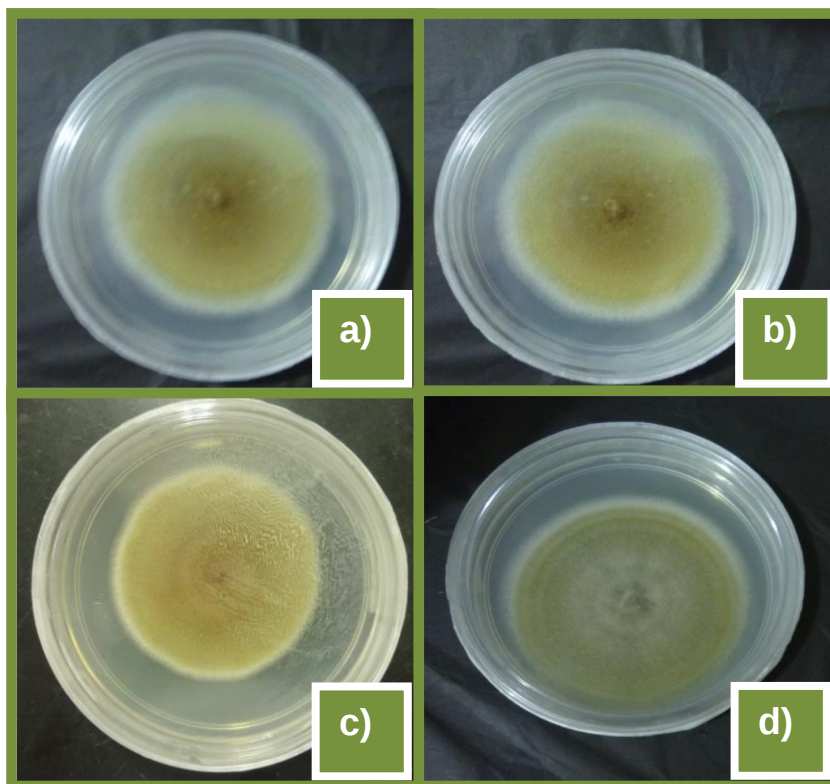


Figura 13. *Phoma* sp. (a y b) y *P. glomerata* (c y d) obtenidos de hojas de vid en la zona vitícola de Querétaro.

### 5.2. Identificación morfológica

De los hongos identificados, se realizó la descripción morfológica de *Phoma glomerata* para conocer sus características estructurales, donde se observó la presencia de micelio de color castaño, los conidios unicelulares, ligeramente curvados, oblongos y ovalados con extremos redondeados, hialinos (Figura 14) por su aspecto los conidios son parecidos a los de *Alternaria* sp. Los picnidios son



casi esféricos de color café oscuro con paredes delgadas de tamaño muy variable y con un conspicuo ostiolo protuberante (Figura 15).

Según Nadal *et al.*, (1991), menciona que las colonias son poco características ya que su aspecto y coloración varía según la relación C/N del sustrato y edad del cultivo. La relación antes indicada influye en la formación de picnidios.

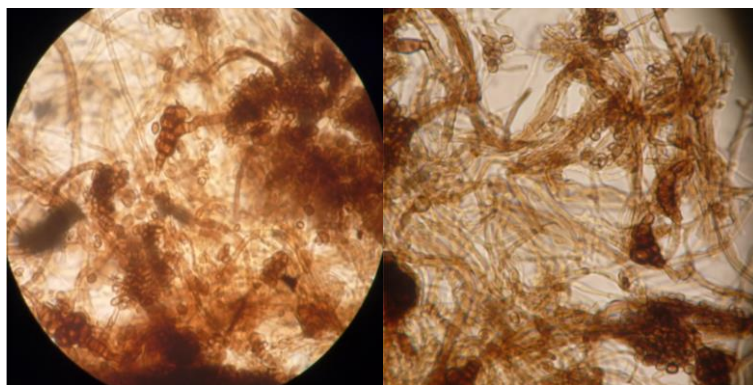


Figura 14. Micelio y conidios de *P. glomerata* obtenidos de hojas de vid del estado de Querétaro.

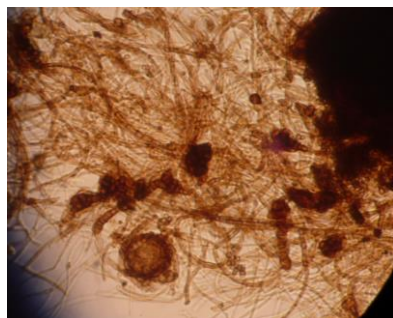


Figura 15. Picnidios de *P. glomerata* obtenidos de hojas de vid del estado de Querétaro.

### 5.3. Velocidad de crecimiento

Los datos utilizados para la gráfica de velocidad de crecimiento fueron solo de las especies de *Phoma* sp., y *P. glomerata*. De acuerdo a la prueba de la LSD ( $p \leq 0.05$ ) no hay diferencias significativas en cuanto a la velocidad de crecimiento de los aislamientos de *Phoma* sp., y *P. glomerata*, como se observa en el cuadro 6, siendo todos los aislamientos estadísticamente iguales, en el crecimiento radial del micelio (Figura 16).



Cuadro 6. Prueba de medias para la velocidad de crecimiento de los aislamientos correspondientes a *Phoma* sp., y *P. glomerata*

| Trat (Aislamiento) | Media  | Agrupamiento |
|--------------------|--------|--------------|
| H44                | 2.3375 | A            |
| H13                | 2.1875 | A            |
| H39                | 2.0625 | A            |
| H27                | 2.0000 | A            |
| H4                 | 1.8625 | A            |
| H50                | 1.7125 | A            |

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de la LSD ( $P \leq 0.05$ ). Donde el crecimiento de los seis aislamientos es estadísticamente igual.

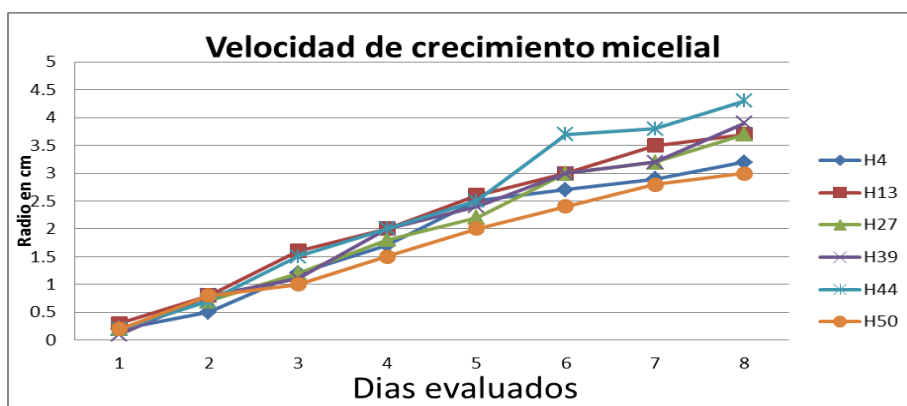


Figura 16. Velocidad de crecimiento de los hongos *Phoma* sp., y *P. glomerata* aislados de hojas de vid, donde se observa el crecimiento del micelio en días.

Se aprecia que los aislamientos de *Phoma* sp. y *P. glomerata* tienden a tener un comportamiento similar en cuanto a crecimiento radial de micelio. Gutiérrez *et al.*, (1999), mencionan que la medición de la velocidad de hongos filamentosos, indica la capacidad del microorganismo para colonizar algún sustrato empleado, el crecimiento radial es un método propuesto para evaluar la capacidad de los hongos para invadir y adaptarse a los nutrientes sobre un sustrato. Otro aspecto importante son las condiciones ambientales que requiere el hongo para germinar y crecer sobre su hospedante u sustrato, como el factor agua que según Fernández (1961), manifiesta que el agua es indispensable para la germinación del hongo y para su proceso de invasión. Por otra parte Devarajan (2006), menciona que la lluvia es uno de los principales diseminadores del hongo. Sin embargo Gómez,



(1976) y Bucker *et al.*, (2012), mencionan que el óptimo de germinación en *Phoma* sp., se consigue con una película de agua alrededor de las conidias, lo cual no necesariamente requiere altas o abundantes precipitaciones.

Salgado *et al.*, 2003 reporta que se requiere una temperatura óptima para el desarrollo de los conidios de 20 °C, mientras que Fernández (1961), menciona que a temperaturas mínimas inferiores a 14 °C se generan un incremento en el desarrollo del hongo.

La humedad relativa para el desarrollo del hongo debe ser superior a 80 % (Hata, 2008). Y para las horas luz Gutiérrez (1999), manifiesta que la mejor expresión del hongo se presenta entre las 3 y las 6 horas.

### 5.4. Prueba de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad in vitro son una herramienta efectiva ya que arrojan resultados rápidos y un procedimiento efectivo (Grupo Upia, 2007). De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad, se observó que no hubo presencia de lesiones en los frutos, solo hubo presencia de estructuras morfológicas en los raquis del racimo (Figura 17), así como se describe en el Cuadro 7, donde ambos hongos no generaron podredumbre ni invasión de los racimos, a comparación del raquis donde en ambos hongos si se presentó la invasión del tejido, lo que confirma su posible papel como antagonista de los patógenos de la vid coincidiendo con Arie *et al.*, (1998).

Cuadro 7. Pruebas de patogenicidad realizadas en racimos de uva con *Phoma* sp. y *P. glomerata*

| Hongo inoculado     | Podredumbre o invasión del fruto | Podredumbre o invasión de raquis | Signo presente |
|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------|
| <i>Phoma</i> sp.    | -                                | +                                | +              |
| <i>P. glomerata</i> | -                                | +                                | +              |



Figura 17. Síntomas y lesiones en racimos de uva, después de ocho días de evaluación; a) *Phoma* sp. y b) *P. glomerata*

Cabe mencionar que hubo presencia de otros hongos como *Botrytis* sp. y *Rhizopus stolonifer* (Figura 18 ) conceptuados como contaminantes (Agrios,2005) que ejercen en el hospedante estudiado, un papel patógeno, ya que al cubrir la superficies de las mismas degradan las paredes celulares del fruto llevando consigo una rápida pudrición del fruto. Así desencadenando la germinación de otros patógenos de almacenamiento como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. (Figura 19).



Figura 18. a) Invasión de *Phoma* sp. y b) Invasión de *P. glomerata*, ambos inoculados sobre racimos de vid.



Figura 19. a) *Rhizopus stolonifer* y b) *Botrytis* sp., en frutos de uva, hongos contaminantes durante la evaluación de la prueba de patogenicidad.

Los conidios de *Phoma* sp., provocan invasión en las partes leñosas de la planta, así como se observó en la prueba de patogenicidad, tal como lo menciona Dikson, (1956), donde menciona que este hongo origina síntomas en tallos y hojas de vid. También coinciden con los resultados obtenidos por Regnault *et al.*, (1987) donde observo los mismos síntomas en plántulas de colza.



### VI. CONCLUSIONES

En la zona vitícola ubicada en los municipios de Ezequiel Montes y Tequisquiapan en el estado de Querétaro, se detectó a *Phoma* sp., y *P. glomerata* mediante análisis de secuencias ITS. Asimismo, estas especies se han reportado en la literatura como especies endófitas. También se encontró a *Alternaria alternata* el cual se reporta como patógeno de otras especies de cultivos.

Malbec, Merlot, Chardonnay y Moscatel fueron las variedades de vid, en donde se encontraron las especies de hongos endófitos identificados.

La diversidad de hongos endófitos varía de acuerdo a la ubicación geográfica, donde *Phoma* sp., se detectó en el municipio de Ezequiel Montes y Tequisquiapan, y *Phoma glomerata* en el municipio de Tequisquiapan.

No existe diferencias significativas en la velocidad de crecimiento micelial de *Phoma* sp., y *P. glomerata*.

*Phoma* sp., y *P. glomerata* no son especies patógenas para el cultivo de la vid, de acuerdo a los resultados de pruebas de patogenicidad realizados en frutos de uva a nivel de laboratorio.



## VII. LITERATURA CITADA

**Arie, K., Okada, Kono and Yamaguchi. 1998.** Control of soilborne clubroot disease of cruciferous plants by epoxydon from *Phoma glomerata*. Plant Pathology. Vol. 47: 743–748.

**Agrios, G.N. 2005.** Plant Pathology. Academic Press. San Diego. 819 p.

**Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D., Kursar, T.A. 2000.** Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. Ecology Letters, 3: 267-274.

**Arnold, A.E., Mejía, L.C., Kylo D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E.A., 2003.** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:15649–15654.

**Atlas, R.M. y Cerniglia, C.E. 1995.** Bioremediation of petroleum pollutants. BioScience, 45: 332–338.

**Backman, P.A. y Sikora, R.A. 2008.** Endophytes: an emerging tool for biological control. Biological Control, 46: 1-3.

**Bacon, C.W. y Hill, N.S. 1996.** Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses. In Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants. Systematics, Ecology, and Evolution (eds. S.C. Redlin y L.M. Caris). APS Press. pp. 155 – 178.

**Bills, G.F. y Polishook, J.D. 1994.** Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. Mycologia, 86: 187-198.

**Bisseger M, Sieber, T.N. 1994.** Assemblages of endophytic fungi in coppice shoots of *Castanea sativa*. Mycologia 86:648–655.

**Breen, J.P. 1994.** Acremonium endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. Annual Review of Entomology, 39: 401-423.

**Carroll, G.C. 1995.** Forest endophytes: pattern and process. Canadian Journal of Botany, 73: 1316-1324.

**Carroll, G.C., y Carroll, F.E. 1978.** Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. pp. 3034–3043.

**Carroll, G.C. 1986.** The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. En: Microbiology of the Phyllosphere (eds.



Fokkema NJ, van den Huevel J). Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 205–222.

**CIMMYT. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo.** Ensayo para la semilla de maíz y trigo. (Consultado el 23 de septiembre de 2015). Link: <http://libcatalog.cimmyt.org/download/cim/67049.pdf>.

**Clay, K. 1990.** Fungal endophytes of grasses. Annual Review of Ecology and Systematics, 21: 275–295.

**Closse, A., Mauli, R., Sigg, H.P., 1966.** Die Konstitution von Epoxydon. Helvetica Chimica Acta 25; 204.

**Collado, J., Platas, G., González, I., Peláez, F. 1999.** Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. New Phytologist, 144: 525-532.

**Danti, R., Sieber, T.N., Sanguineti, G. 2002.** Endophytic mycobiota in bark of European beech (*Fagus sylvatica*) in the Apennines. Mycological Research, 106: 1343–1348.

**De Bary, A. 1986.** Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten, Vol. II.-Hofmeister's Handbook of Physiological Botany. W. Engelmann: Leipzig. pp. 123-145.

**Devarajan, P.T. y Suryanarayanan, T.S. 2006.** Evidence for the role of phytophagous insects in dispersal of non-grass fungal endophytes. Fungal Diversity, 23: 111-119.

**Dikson, J. G., 1956.** Diseases of Field Crops. Me. Graw Hill Book Company, inc. Second Edit. 490 p.

**Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990.** A rapid total ADN preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15.

**Duong, L.M., Jeewon, R., Lumyong, S., Hyde, K.D. 2006.** DGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes. Fungal Diversity, 23: 121-138.

**Faeth, S.H., y Fagan, W.F., 2002.** Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. Comp. Biol. 42:360–368.

**Freeman, E.M. 1904.** The seed fungus of *Lolium temulentum*, the darnel. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 196: 1-27.



**Freeman, E.M. 1906.** The affinities of the fungus of *Lolium temulentum*. Annual Mycology, 4: 32-34.

**Fisher, P.J., Graf, F., Petrini, L.E., Sutton B.C., Wookey, P.A. 1995.** Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high polar semidesert and from the Swiss Alps. Mycology, 8: 319-323.

**Freeman, S. y Rodríguez, R.J. 1993.** Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. Science, 260: 75–78.

**Grupo Upia, 2007.** Informe mensual Avance Investigaciones Marchitez Letal. 45 p.

**Gutierrez, S.G., Saucedo, C.G., Gaime, P. Augur, C. 1999.** Comparacion de dos métodos para la selección de cepas para su uso en fermentación en medio solido: crecimiento radial y longitudinal. Congreso latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería A.C. Huatulco, Oaxaca, Mexico, 12 al 17 de septiembre de 1999, 104.

**Hata, K. y Sone, K. 2008.** Isolation of endophytes from leaves of *Neolitsea sericea* in broadleaf and conifer stands. Mycoscience, 49: 229-232.

**Hawksworth, D.L. 2001.** The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research, 105: 1422-1432.

**INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.** Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos (Consultado el 12 de septiembre de 2015). Link: <http://www.inegi.org.mx/>

**Jumpponen, A. y Trappe, J.M. 1998.** Dark Septate Endophytes: A Review of Facultative Biotrophic Root-Colonizing Fungi. New Phytologist, 140: 295-310.

**Tlalpal, B. B. y Leyva, G.M. 2013.** Manual de Micología Taxonómica. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. 205 p.

**Li, W.C., Zhou, J., Guo, S.Y., Guo, L.D. 2007.** Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. Fungal Diversity, 25: 69-80.

**Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2004.** Los Parásitos de la Vid, Estrategias de protección razonada. Ediciones Mundi-Prensa. 5ta. Edición. Pp. 387.



**Mostert, L., Crous, P.W., Petrini O. 2000.** Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia*, 54: 46-58.

**Musetti, R., Vecchione, A., Stringher, L., Borselli, S., Zulini, L., Marzani, C., D'Ambrosio, M., Sanità di Toppi L., Pertot. 2006.** Inhibition of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 96:689–698.

**Nagasawa, H., Suzuki, A., Tamura, S. 1978.** Isolation and structure of (+) desoxyepiepoxydon and (+) epiepoxydon, phytotoxic fungal metabolites. *Agricultural and Biological. Chemistry* 42:1303.

**Neill, J.C. 1940.** The endophyte of ryegrass (*Lolium perenne*). *NZ J. Sci. Teehnol., Ser. A*, 21: 280-291.

**Nsabimana, J.M., Moutschen M., Thiry E., Meurens F. 2008.** Human infection with simian herpes B virus in Africa. *Sante*, 18: 3-8.

**Petrini O. 1991.** Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews JH, Hirano SS (eds) *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, New York. pp. 179–197.

**Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde K.D. 2004.** Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens?. *Fungal Diversity*, 16: 131-140.

**Porras-Alfaro, A., Herrera, J., Sinsabaugh, R.L., Odenbach, K.J., Lowrey, T., Natvig, D.O. 2008.** Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 2805–2813.

**Promptuttha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., Jeewon, R. 2007.** A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*, 53: 579-590.

**Redman, R.S., Dunigan, D.D. Rodríguez, R.J. 2001.** Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?. *New Phytologist*, 151: 705-716.

**Regnault, Y., Laville, J., Penaud, A. 1987.** *Le Phoma* (La necrose du collet) *Phoma lingam* (Tode) Desm., forme imparfaite de *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. Cl. Ascomycetes Fam. Pléosporacées. *Cahier Technique Colza Maladies*, 3 p.



**Reynier, A. 2005.** Manual de viticultura. Ediciones Mundi-Prensa. España. 487 p.

**Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, .G., Sydenham, E.W., Shepard, G.S., van Schalkwyk, D.J. 1992.** *Fusarium moniliforme* and *Fumosins* in Corn in Relation to Human Esophageal Cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82: 353-357.

**Rodriguez, R.J. y Redman, R.S. 2008.** More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 59: 1109-1114.

**Rodriguez, K.F. 1994.** The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, 86: 376– 385.

**Rodríguez, K. F. y Samuels, G.J. 1999.** Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. *Journal of Basic Microbiology*, 39: 131–135.

**Sabariego, R. A. 2004.** Estudio aerobiológico de los conidios de *Alternaria* y *Cladosporium* en la atmósfera de la ciudad de Almería. *Rev. Iberoamericana de Micología* 2004; 21: 121-127.

**Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M., Sullivan, T.J. 1998.** Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 319-343.

**Sakai, R., Sato, R., Niki, H., Sakamura, S., 1970.** Biological activity of phyllosinol, a phytotoxic compound isolated from a culture filtrate of *Phyllosticta* sp. *Plant and Cell Physiology* 11: 907.

**Schulz, B., Wanke, U., Draeger S., Aust H.J. 1993.** Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 97: 1447-1450.

**SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.** (Consultado el 05 de septiembre de 2015). Link: <http://www.siap.gob.mx/>

**Stierle A., Strobel, G., Stierle, D. 1993.** Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260: 214-216.

**Stone, J.K., 2004.** Endophytic fungi. In: Mueller G, Foster M, Bills G (eds) *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods*. Academic, Amsterdam. 728 p.



**Stone, J.K., Polishook, J.D., White, J.F. Jr. 2004.** Endophytic fungi. In: Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods (eds. Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S.). Elsevier Academic Press, USA. Pp. 241-270.

**Strobel, G.A. 2002.** Rainforest endophytes and bioactive products. Critical Reviews in Biotechnology, 22: 315-333.

**Tadych, M., Bergen, M., Dugan, F.M., White, J.F. Jr. 2007.** Evaluation of the potential role of water in spread of conidia of the *Neotyphodium* endophyte of *Poa ampla*. Mycological Research, 111: 466-472.

**Whalley, A.J.S. y Edwards, R.L. 1987.** Xylariaceous fungi: Use of Secondary Metabolites. In: Evolutionary Biology of the Fungi (eds. Rayner ADM, Brsler CM, Moore D). Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra. Pp. 423-434.