

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN:

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**ANÁLISIS METAGENÓMICO COMPARATIVO DE LAS
COMUNIDADES FÚNGICAS Y BACTERIANAS ASOCIADAS
AL PROCESO DE DESARROLLO DE LAS ENFERMEDADES
DEL TRONCO DE LA VID (*Vitis vinifera* L.) EN PIURA, E
IDENTIFICACIÓN DE HONGOS POR ESPECTROMETRÍA DE
MASAS MALDI-TOF/TOF SHOTGUN PROTEOMICS**

MANUEL JESÚS SAUCEDO BAZALAR

TUMBES, PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN:

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**ANÁLISIS METAGENÓMICO COMPARATIVO DE LAS
COMUNIDADES FÚNGICAS Y BACTERIANAS ASOCIADAS
AL PROCESO DE DESARROLLO DE LAS ENFERMEDADES
DEL TRONCO DE LA VID (*Vitis vinifera* L.) EN PIURA, E
IDENTIFICACIÓN DE HONGOS POR ESPECTROMETRÍA DE
MASAS MALDI-TOF/TOF SHOTGUN PROTEOMICS**

MANUEL JESÚS SAUCEDO BAZALAR

TUMBES, PERÚ

2017

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Manuel Jesús Saucedo Bazalar, declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo declaro (hasta donde tengo conocimiento) no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto al que se reconoce como tal a través de citas bibliográficas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, también que, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita, la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi asesor de tesis y jurado calificador.

Manuel Jesús Saucedo Bazalar

RESPONSABLES

Blgo. MANUEL JESÚS SAUCEDO BAZALAR

EJECUTOR

Ph.D. ERIC LOUIS MIALHE MATONNIER

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dr. CARLOS ALBERTO DEZA NAVARRETE

PRESIDENTE

Dr. MIGUEL ÁNGEL GARRIDO RONDOY

SECRETARIO

Ph.D. VIRNA ALEXIA CEDEÑO ESCOBAR

VOCAL

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.	IX
ABSTRACT.	X
1. INTRODUCCIÓN.	11
2. MATERIAL Y MÉTODOS.	15
2.1. MUESTREO Y MATERIAL VEGETAL	15
2.2. MICROBIOLOGÍA MOLECULAR	15
Aislamiento de hongos y bacterias asociada a vides sanas y enfermas con síntomas de GTD	15
Extracción de ADN, amplificación por PCR, secuenciación y análisis bioinformático	17
2.3. ANÁLISIS METAGENÓMICO	19
Extracción de ADN metagenómico, secuenciación y análisis bioinformático	19
2.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO	19
Hongos patógenos y condiciones de cultivo	19
Extracción de proteínas	20
Migración de proteínas en SDS-PAGE, digestión de proteínas y extracción de péptidos	20
Análisis de muestras por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF	21
3. RESULTADOS.	23
3.1. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS DE GTD	23
3.2. MICROBIOLOGÍA MOLECULAR	25
Identificación y caracterización molecular de los aislamientos	25
3.3. ANÁLISIS METAGENÓMICO	28
Análisis metagenómico comparativo de hongos	28
Análisis metagenómico comparativo de bacterias	30
3.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO	30
4. DISCUSIÓN.	39
5. CONCLUSIONES.	48
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	49
7. ANEXOS Y APÉDICE	61

RESUMEN

Las enfermedades del tronco de la vid (GTD: *Grapevine Trunk Diseases*) son serios problemas para la industria del vino y la uva de mesa a nivel mundial. Las GTD han sido asociadas a una larga lista de hongos patógenos por ser los responsables de la necrosis del sistema vascular de la vid. Sin embargo, el proceso del desarrollo necrótico en los tejidos de la madera aún permanece poco claro, con recientes investigaciones sugiriendo la participación de algunas bacterias en la patogénesis mientras que otras podrían prevenir la necrosis. El Perú es el tercer exportador mundial de uva de mesa, siendo el departamento de Piura una de las principales zonas de producción. Las GTD han sido progresivamente detectadas en los viñedos piuranos mediante el análisis de síntomas y micología clásica. En este estudio, enfoques metagenómicos ha sido aplicados para caracterizar las comunidades fúngicas y bacterianas, a partir de plantas de vid sanas y enfermas. Hongos y bacterias fueron aislados e identificados molecularmente basados en la secuenciación parcial del ADNr. Además, aislamientos fúngicos fueron caracterizados e identificados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF de tipo *shotgun proteomics*. La diversidad fúngica reveló 433 OTUs, con *Aspergillus* y *Cladosporium* como los más representativos en plantas sanas, mientras *Peniophora*, *Lasiodiplodia*, *Alternaria* y *Fusarium* estuvieron presentes en plantas enfermas. El análisis de las comunidades bacterianas reveló 512 OTUs con *Proteus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus* como los más representativos en plantas sanas, mientras que *Pseudomonas* y *Curtobacterium* fueron marcadores en plantas enfermas. Espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF *shotgun proteomics* fue usada satisfactoriamente para la identificación de *Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodia* spp., *Neofusicoccum parvum*, *Macrophomina phaseolina* y *Phaeoacremonium minimum*. Una cepa de *Bacillus* sp. M1, aislada de la corteza interna, ha sido usada satisfactoriamente *in vitro* como un antagonista nativo de *L. theobromae*, uno de los principales patógenos relacionado a las GTD en Piura.

Palabras clave: Vid, GTD, metagenómica, bacterias, hongos, espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

ABSTRACT

Grapevine Trunk Diseases (GTD) are serious problems for wine and table grape industries worldwide. GTD have been associated with a large list of pathogenic fungi to be responsible for necrosis in the grapevine vascular system. However, the necrotic processes in woody tissues remain poorly understood, with recent research suggesting the involvement of some bacteria in the pathogenesis whereas other bacteria could prevent the necrosis. Peru is the third world exporter of table grapes, being Piura one of the major grape-production Peruvian areas. GTD have been increasingly detected in Peruvian vineyards through clinical signs and classical mycological analysis. In this study, metagenomics approaches has been applied to characterize fungal and bacterial communities from both healthy and sick grapevine plants. Fungi and bacteria have been isolated and molecularly identified based on partial sequencing of rDNA. Moreover, fungal isolates have been characterized and identified through MALDI-TOF/TOF mass spectrometry shotgun proteomics. Fungal diversity revealed 433 fungal OTUs, being *Aspergillus* and *Cladosporium* present in healthy plants whereas *Peniophora*, *Lasiodiplodia*, *Alternaria* and *Fusarium* were present in sick plants. The analysis of bacterial communities revealed 512 bacterial OTUs with *Proteus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Enterococcus* more represented in healthy plants whereas *Pseudomonas* and *Curtobacterium* were markers in sick plants. MALDI-TOF/TOF mass spectrometry shotgun proteomic has been successfully used for identification of *Lasiodiplodia theobromae*, *Diplodia* spp., *Botryosphaeria parva*, *Macrophomina phaseolina* and *Phaeoacremonium minimum*. A *Bacillus* sp. M1 strain, isolated from internal bark, is currently used as an efficient native antagonist *in vitro* of *L. theobromae* a main pathogens related to GTD in Piura.

Keywords: Grapevine, GTD, metagenomic, bacteria, fungi, MALDI-TOF/TOF mass spectrometry.943296055

1. INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los frutales más ampliamente cultivado y económicamente importante a nivel mundial, sin embargo está altamente sometido al ataque de diferentes patógenos que pueden impactar negativamente en la salud de la planta y, consecuentemente, reducir el rendimiento y la calidad de las uvas. Las enfermedades del tronco de la vid (GTD: *Grapevine Trunk Diseases*, en inglés) son las patologías más destructivas y actualmente no existe control. Estas enfermedades afectan negativamente los viñedos y causan serias pérdidas económicas en la industria del vino y uva de mesa en el mundo (Fontaine *et al.*, 2015).

Esca disease, *Eutypa dieback* y *Botryosphaeria dieback* son las tres principales GTD. Estas enfermedades han sido asociadas a un complejo de hongos patógenos considerados por ser responsables de la necrosis del sistema vascular de la vid, conduciendo a síntomas en las hojas y bayas, y causando esencialmente la muerte a largo plazo de la planta (Bertsch *et al.*, 2012). *Phaeomoniella chlamydospora* (Crous and Gams, 2006), *Phaeoacremonium aleophilum* (Crous *et al.*, 1996), *Fomitiporia mediterranea* (Fischer, 2002), *Eutypa lata* (Rappaz, 1984), y varios miembros de la familia Botryosphaeriaceae son las principales especies que han sido asociadas a las GTD a nivel mundial. La frecuencia de los síntomas se ha ido incrementando considerablemente durante las últimas décadas (Bruez *et al.*, 2015).

Sin embargo, la etiología de estas enfermedades complejas en términos de crono-secuencia de patógenos, así como la dinámica del desarrollo necrótico en los tejidos de la madera, aún permanecen poco claro. No se sabe si otros microorganismos, aparte de los hongos, podrían interactuar *in planta* con los patógenos asociados a las GTD, ni qué tipo de microorganismos son exactamente (Hofstetter *et al.*, 2012; Úrbez-Torres *et al.*, 2014; Bruez *et al.*, 2015; Andreolli *et al.*, 2016).

Bacterias han sido descritas como habitantes de varios tejidos de una gran parte de las plantas estudiadas. Ciertos colonizadores bacterianos que inducen efectos benéficos sobre sus hospederos, tienen un interés agronómico como promotores de crecimiento vegetal (Long *et al.*, 2008) mediante la limitación y/o prevención del ataque de patógenos. Otros, sin embargo, pueden tener efectos patogénicos (Compant *et al.*, 2005; Hardoim *et al.*, 2015). La vid naturalmente hospeda un reservorio de microorganismos epífitos y endófitos que interactúan con ella (Schulz *et al.*, 1999; Compant *et al.*, 2011).

Recientes investigaciones describen la ecología microbiana de la vid como altamente diversa, con comunidades específicas colonizando las diferentes partes de la planta (Campisano *et al.*, 2014; Zorraonaindia *et al.*, 2015). Bacterias han sido caracterizadas en la raíz, ramas, hojas, flores, frutos y semillas (Compant *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2013, Pinto *et al.*, 2014). Estos estudios muestran que la mayoría de las bacterias que habitan la vid podrían provenir de la rizósfera y colonizar las partes aéreas de la planta; incluso algunas derivar de otras partes de la fitósfera y colonizar internamente los tejidos (Compant *et al.*, 2011; Hardoim *et al.*, 2015).

Estudios sobre bacterias habitando los tejidos internos de la madera de la vid han sido recientemente llevados a cabo por Bruez *et al.* (2015), Haidar *et al.* (2016), Andreolli *et al.* (2016) y Rezgui *et al.* (2016), sin embargo muchas piezas de información aún son necesarias.

Hongos y bacterias cohabitan dentro su huésped de manera compleja en términos de tipos de interacciones (de Boer *et al.*, 2005). Varios estudios indican que la presencia de bacterias pueden alterar la composición de las comunidades fúngicas y viceversa (Whipps, 2001; Leveau and Preston, 2008; Berg, 2009).

Un conocimiento profundo de las interacciones hongo-bacteria así como de las comunidades microbianas en los tejidos de la madera es necesaria debido al incremento de la incidencia de las GTD en los viñedos de todo el

mundo. La reciente emergencia de enfoques independientes de cultivo, tales como aquellas basadas en “*Next Generation Sequencing*”, han proporcionado significativos avances en la exploración del microbioma y sus interacciones en la planta (Müller and Ruppel, 2014; Pinto *et al.*, 2014). La mayoría de estos estudios independientes de cultivo están basados en biotecnologías denominadas “ómicas” tales como la metagenómica (Turner *et al.*, 2013). Estas metodologías permiten el conocimiento profundo de la diversidad microbiana total y revelan una mayor complejidad de la comunidad microbiana que aquellas reportadas previamente con estudios dependientes de cultivo (Müller and Ruppel, 2014).

Estudios para el diagnóstico y filogenética de microorganismos incluyen metodologías desde las más tradicionales como la caracterización morfológica, cultural y patrones bioquímicos, hasta las más actuales como la PCR y *microarrays*, las cuales son comúnmente empleadas en biología molecular. Sin embargo, la identificación rápida y confiable de microorganismos ha llegado a ser indispensable en los últimos años, principalmente de hongos fitopatógenos importantes en la agricultura (Liu *et al.*, 2007, Chalupová *et al.*, 2012). En este contexto, la espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI: *Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization*) tiempo de vuelo (TOF: *Time of Flight*) (MALDI-TOF) ha sido recientemente establecida como una poderosa herramienta para la identificación microbiana directa y biotipificación, proporcionando un diagnóstico fluido en base a un único espectro de masas de péptidos/proteínas de las especies analizadas (Sulc *et al.*, 2009).

Recientemente, varias investigaciones han venido desarrollando e implementando la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para la identificación de hongos, a saber: *Aspergillus* (Kallow *et al.*, 2006) *Penicillium* (Hettick *et al.*, 2008), *Fusarium* (Seyfarth *et al.*, 2008), *Oidium* (Chalupová *et al.*, 2012) y *Diplodia*, un patógeno del tronco de la vid (Mancini *et al.*, 2013); sin embargo, es primordial realizar más estudios para la identificación proteómica del complejo fúngico de las GTD.

El Perú es el tercer exportador de uva de mesa a nivel mundial (COMTRADE, *United Nations*, 2016), siendo el departamento de Piura una de las principales regiones en su producción. Las GTD han sido recientemente detectadas en los viñedos piuranos. Solo un estudio reportado ha sido relacionado a la identificación molecular y patogenicidad de especies de *Lasiodiplodia* causando muerte regresiva en uvas de mesa en Piura (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2014). Los objetivos del presente estudio fueron: a) caracterizar las comunidades fúngicas y bacterianas asociadas a plantas de vid sanas y con síntomas de GTD mediante un enfoque metagenómico b) aislar y caracterizar las cepas fúngicas y bacterianas de ramas, tronco y cuello de plantas de vid sanas y con síntomas de GTD y c) identificar hongos causantes de GTD mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Finalmente, en anexos se presentan resultados de la interacción *in vitro* de una cepa nativa de *Bacillus* sp., endófito del tronco de la vid, con carácter antagonista a *Lasiodiplodia theobromae*, uno de los principales patógenos asociado a las GTD en Piura, mediante un análisis por espectrometría de masas MALDI TOF/TOF.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MUESTREO Y MATERIAL VEGETAL

ECOSAC AGRÍCOLA SAC. es propietaria de aproximadamente 1200 ha de cultivo de uva de mesa instaladas en Chapairá, distrito de Castilla, Piura ($5^{\circ}07'06.6''$ LS y $80^{\circ}35'52.3''$ LO) (ANEXO), las cuales fueron evaluadas con autorización entre abril y diciembre del 2016. El método de colecta del material vegetal se realizó de manera destructiva (Bruez *et al.*, 2014). Plantas de vid (vr. *Red Globe*) de aproximadamente siete años de edad, sanas y con síntomas de GTD, fueron podadas en varias partes longitudinales categorizándolas de acuerdo a su posición en la planta (rama, tronco y cuello). Además, para realizar el análisis metagenómico, se tomaron muestras de ramas a partir de 3 estados de las plantas: VS (vid sana), VR (vid sana ubicada en una zona de vides enfermas con síntomas de GTD) y VE (vid enferma con síntomas de GTD). La toma de muestra se realizó con total asepsia (instrumentos de poda y manipulación) para evitar cambios en la composición del microbioma y, finalmente, fueron almacenadas inmediatamente a temperatura de refrigeración (4°C). El procesamiento de las muestras en laboratorio se realizó no pasadas las 12 h desde su almacenamiento.

2.2. MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

Aislamiento de hongos y bacterias asociadas a vides sanas y enfermas con síntomas de GTD

Para el aislamiento de hongos y bacterias, pequeñas porciones de madera de 5 mm^3 aproximadamente, fueron cortadas a partir de diferentes partes de las muestras de ramas, tronco y cuello tanto de plantas sanas y enfermas en cámara de flujo laminar (BIOBASE Biotech).

En el caso de los hongos, se siguió el protocolo de aislamiento descrito por Rodríguez-Gálvez *et al.* (2014). Los pequeños fragmentos de madera fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 2% por 1 min y lavados 2 veces en agua destilada estéril. Posteriormente, las piezas de madera fueron colocadas en placas con medio PDA (*Potato Dextrose Agar*) y/o MEA (*Malt Extract Agar*) e incubadas a 28°C por 5 días. Las colonias fúngicas fueron transferidas y purificadas en placas de Petri con medio PDA y/o MEA fresco. Posteriormente las cepas fúngicas fueron colocadas en crioviales de 5 ml conteniendo 4 ml de medio PDA inclinado con cloranfenicol (25 mg/ml) y almacenadas a 4°C.

Para el caso de las bacterias, se siguió el protocolo de aislamiento descrito por Rashid *et al.* (2012), con ciertas modificaciones. Las pequeñas porciones de madera fueron tomadas y separadas de acuerdo a dos grupos específicos de microorganismos evaluados: epífitos y endófitos. Para las bacterias epífitas, pequeñas porciones de la superficie externa fueron colocadas directamente en tubos de 50 ml conteniendo 20 ml agua de destilada estéril y/o caldo LB (*Luria Bertani Broth*) y se agitaron en un *shaker* (BIOSAN ES-20) a 200 RPM por 30 min. Las suspensiones obtenidas fueron usadas para realizar diluciones seriadas hasta una concentración final de 10^{-5} . Se agregaron 25 μ l de cada dilución en placas de Petri conteniendo medio TSA (*Trypticase Soy Agar*) y/o LBA (*Luria Bertani Agar*) y se esparcieron sobre toda superficie de la placa. Las placas fueron incubadas a 27°C por 24 h para el crecimiento bacteriano. Posteriormente se realizaron las purificaciones y las bacterias puras se recuperaron en tubos de 1.5 ml conteniendo 1 ml de caldo LB. Para las bacterias endófitas, pequeñas porciones de la madera fueron desinfectadas externamente con hipoclorito de sodio al 2% por 1 min y lavadas 2 veces en agua destilada estéril, seguidamente se cortaron porciones de la madera interna y se colocaron en tubos de 50 ml conteniendo 20 ml caldo LB y se agitaron en un *shaker* a 200 RPM por 24 h. Los co-cultivos fueron usados para realizar

diluciones seriadas y la siembra, el aislamiento y la purificación se realizaron como lo descrito anteriormente para las bacterias epífitas. Finalmente, un duplicado de cada bacteria (endófito y epífita) fueron usadas para la extracción de ADN y la otra fue almacenada con glicerol (15%) en un congelador a -20°C.

Extracción de ADN, amplificación por PCR, secuenciación y análisis bioinformático

Para las cepas fúngicas, aislamientos puros de 7 días de edad, fueron usados para la extracción de ADN genómico mediante el protocolo CTAB (*Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*), previamente descrito por Karthikeyan *et al.* (2010). La amplificación de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) se realizó mediante PCR utilizando los *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). El *mix* de reacción de PCR incluyó concentraciones finales de: *buffer Taq* 1X (Thermo Scientific); *Taq DNA polymerase recombinant* 1U (Thermo Scientific); 2.5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific); 0.2 mM dNTP's; 0.6 pmol de cada *primer*, 2 µl de ADN y llevados hasta un volumen final de 25 µl con agua ultra pura. Los ciclos de amplificación fueron realizados en un termociclador (BIOMETRA UNO-Thermoblock) bajo las siguientes condiciones: un paso inicial de pre-desnaturalización a 94°C por 6 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 45 s, 72°C por 45 s y un paso de elongación final de 72°C por 5 min.

Para las cepas bacterianas, tubos de 1.5 ml conteniendo los aislamientos puros de 24 a 48 h de crecimiento, fueron usados para la extracción de ADN genómico mediante el protocolo CTAB, previamente descrito por Worden (2009). La amplificación del gen 16S ADNr se realizó mediante PCR utilizando los *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). El *mix* de reacción de PCR

incluyó concentraciones finales de: *buffer Taq* 1X (Thermo Scientific); *Taq DNA polymerase* recombinant 0.04U/μl (Thermo Scientific); 2.5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific); 0.2 mM dNTP's; 0.36 pmol de cada *primer*; 2 μl de ADN y llevados hasta un volumen final de 25 μl con agua ultra pura. Los ciclos de amplificación fueron realizados en un termociclador bajo las siguientes condiciones: un paso inicial de pre-desnaturalización a 94° C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94° C por 30 s, 58° C por 45 s, 72° C por 90 s y un paso de elongación final de 72° C por 6 min.

Los productos de PCR (fúngico y bacteriano) fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Clever Scientific Ltd. AG500) usando 150 ml de *buffer* TAE 1X (40 mM Tris-Acetato; 1 mM EDTA). El gel se tiñó con 7.5 μl bromuro de etidio (10 mg/ml) y finalmente los productos se visualizaron en un transiluminador (Vilber Lourmot TFX20M) bajo luz ultravioleta (UV).

Finalmente, 30 μl de cada producto amplificado, fueron enviados a secuenciación a los laboratorios de la empresa MACROGEN (USA) mediante el método Sanger con electroforesis capilar. Los resultados de secuenciación fueron indispensables para el análisis y procesamiento de datos mediante el uso de la bioinformática.

Para la identificación de los aislamientos fúngicos y bacterianos, las secuencias de las regiones ITS y 16S fueron alineadas con la herramienta ClustalW incluida en el *software* bioinformático MEGA 6.0 (<http://www.megasoftware.net/>) y posteriormente subidas a la herramienta *online* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.3. ANÁLISIS METAGENÓMICO

Extracción de ADN metagenómico, secuenciación y análisis bioinformático

Las muestras de tejido de madera de las plantas VS, VR y VE fueron maceradas en nitrógeno líquido. El ADN fue extraído a partir de 60 mg de alícuotas de tejidos de madera macerado usando un DNeasy® PowerSoil Kit (QIAGEN, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue cuantificado en un biofotómetro (BIOPHOTOMETER-*Eppendorf*). Las muestras de ADN metagenómico fueron amplificadas previamente por PCR, dirigidas a las regiones ITS Y 16S para hongos y bacterias, respectivamente.

Alícuotas de 25 µl de las muestras de ADN metagenómico fueron enviadas a secuenciación, dirigidas a las regiones ITS y 16S mediante tecnología “NGS” (Ion Torrent PGM *system*). Todas las lecturas de secuencia fueron procesadas en el NGS *analysis pipeline* de SILVA rRNA *gene database Project* (SILVAngs; Quast *et al.*, 2013) además de análisis mediante herramientas bioinformáticas *jvarkit* e *iTOL online*.

2.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO

Hongos patógenos y condiciones de cultivo

Seis hongos aislados de ramas, tronco y cuello mostrando síntomas de GTD, fueron crecidos en placas de Petri con medio PDA e incubados a 27°C por 7 días. Discos de PDA de 4 mm de diámetro, conteniendo micelio fueron extraídos de las placas Petri y colocados en frascos Boeco de 100 ml conteniendo 80 ml de caldo MEB (*Malt Extract Broth*) e incubados con agitación (180 RPM) a 27°C por 10 días bajo oscuridad.

Extracción de proteínas

Las proteínas fueron extraídas usando el protocolo de Pasquali *et al.* (2010) con ciertas modificaciones. Micelio de 10 días de edad fue filtrado y macerado con nitrógeno líquido. Se recuperó 100 mg del macerado en un tubo de 50 ml y se agregó 1.2 ml de *buffer* lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 2% SDS; 10 mM DTT; 0.1 mM EDTA; 0.2 mM PMSF), seguidamente se incubó a 4°C por 30 min e inmediatamente llevado a 95°C por 10 min. Se centrifugó a 5000 RPM a 4°C por 45 min y el sobrenadante fue recuperado en un nuevo tubo de 50 ml. El precipitado sobrante fue nuevamente tratado con 1.2 ml de *buffer* lisis siguiendo el mismo procedimiento de incubación y centrifugado como antes mencionado. El nuevo sobrenadante fue recuperado y unido con el primer sobrenadante obtenido. En seguida, 8.5 ml de *buffer* de precipitación (20% TCA y 0.1% DTT en Acetona) fueron agregados y se dejó precipitar a -20°C por 12 h. Después de la incubación, el contenido del tubo fue repartido en tubos de 1.5 ml conteniendo una alícuota de 1 ml. Los tubos fueron centrifugados a 10 000 RPM por 30 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 200 µl *buffer* de lavado (0.1% DTT en Acetona) dos veces. Finalmente el precipitado (proteínas) fue resuspendido en 50 µl de *buffer* de rehidratación (8 M Urea; 20 mM DTT; 4% CHAPS).

Migración de proteínas en SDS-PAGE, digestión de proteínas y extracción de péptidos

Se preparó el gel de corrida al 12% (12% de acrilamida; 0.38 M Tris pH 8.8; 0.1% SDS; 0.1% APS; 0.04% TEMED hasta un volumen final de 5 ml con agua bidestilada). Seguido, se preparó el gel de alineamiento (3.3% de acrilamida; 0.083 M pH 6.8; 0.067% SDS; 0.067% APS; 0.067% TEMED hasta un volumen final de 3ml con agua bidestilada) y se montaron en el cassette hasta su solidificación. Previamente, una mezcla de 30 µl de proteínas con 20 µl de *buffer* de carga en un tubo de 0.2 ml fue incubado a 95° por 5

min, se dejó enfriar y finalmente 20 µl de la mezcla de cada muestra fueron depositadas en el gel, la electroforesis vertical se realizó bajo las siguientes condiciones: 90 v - 120 A por 3 h.

Después de la migración, el gel fue desmontado y fijado (solución de fijación: 50% metanol; 10% ácido acético en agua bidestilada), teñido (solución de tinción: 50% metanol, 10% ácido acético, 0.1% azul de Coomasin en agua bidestilada) y decolorado (solución de lavado: 45% metanol, 10% ácido acético, diluido en agua bidestilada). Las bandas presentes se cortaron con un bisturí estéril y se depositaron en tubos de 0.2 ml de forma individual, y fueron decoloradas según el protocolo descrito por Schevchenko *et al.* (2006), mediante incubación en bicarbonato de amonio y acetonitrilo (1:1) por 30 min., seguido de incubación en acetonitrilo. Para la saturación y digestión de las proteínas, se realizó mediante incubación en *buffer* tripsina (13 ng/ µl) a -4°C por 2 h, seguido de una incubación a 37°C por 5 h. Para la extracción de péptidos, se utilizó *buffer* de extracción (5% ácido fórmico/acetonitrilo 1:2 (V/V)), seguido de pasos de incubación, sonicación y secado por 3 h en condiciones de vacío.

Análisis de muestras por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF

Para la lectura de muestras, se utilizó una placa opti-TOF 1-1 V/V, en la cual se depositaron las muestras resuspendidas en TFA 0.1%, mezcladas con matriz CHCA 10 mg/ml (∞ -cyano- 4-hidroxicinámico acid), (la matriz fue resuspendida en 0.1% de TFA en agua grado HPLC y 0.1% TFA en acetonitrilo). Los péptidos fueron analizados en un equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (5800, AB SCIEX *System*), en modo ion reflector positivo, con una intensidad de laser Nd: YAG de 349 nm a una velocidad de 600 µm/segundo, 750 disparos por espectro y analizados dentro de un rango de masas entre 800 a 3500 m/z, y procesados mediante *software* ProteinPilot™; para la calibración del equipo se utilizó un kit

Mass Standards AB SCIEX TOF/TOF™ *Instruments*. Las secuencias no detectadas por el software ProteinPilot™, fueron analizadas mediante Protein BLAST.

3. RESULTADOS

3.1. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS DE GTD

Síntomas de GTD fueron detectados en campo. Ramas con necrosis severa y necrosis foliar fueron observadas en plantas de vid durante el muestreo (Fig. 1A y 1B). Algunas ramas presentaron necrosis en los cortes de poda además, presencia de picnidios y conidias sobre la superficie de ramas fueron visibles (Fig. 1C y 1D). Síntomas estuvieron presentes en plantas con frutos (Fig. 1E).





Fig. 1. Identificación de síntomas de GTD en campo. A) Planta de vid afectada por necrosis generalizada en ramas, tronco y hojas. B) Necrosis y clorosis foliar en plantas de vid mostrando síntomas tempranos de muerte regresiva en ramas. C) Ramas afectadas mostrando miles de esporas sobre la superficie del tejido necrosado. D) Ramas afectadas presentando necrosis en la zona de poda, además las ramas presentan picnidios sobre la superficie. E) Síntomas de necrosis y decaimiento fueron detectados afectando plantas cargadas con frutos.

3.2. MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

Identificación y caracterización molecular de los aislamientos

Se logró identificar 27 cepas fúngicas (Tabla 1) y 62 cepas bacterianas (Tabla 2), basados en la secuenciación parcial del ADNr ITS y 16S respectivamente. Ambas regiones revelaron identidades con las secuencias del GenBank del NCBI entre 86 al 100%.

Tabla 1. Hongos identificados molecularmente y caracterizados según su carácter patogénico, procedencia y estado de la planta.

Cepa	Accesión	Ident.	Especie	Caráct. patogénico	Procedencia	Estado
2AMS	KX146504	98%	<i>Chaetomium brasiliense</i>	No patógeno	Rama	Sana
3AMS	KR709026	100%	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Patógeno	Rama	Sana
5AMS	FJ882040	94%	<i>Peniophora laxitexa</i>	Patógeno	Rama	Sana
14AMS	HQ315840	100%	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Patógeno	Rama	Sana
15AMS	KX401428	100%	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Patógeno	Rama	Sana
18AMS	KX499521	100%	<i>Alternaria longipes</i>	Patógeno	Rama	Sana
21AMS	KX443224	98%	<i>Aspergillus</i> sp.	No patógeno	Rama	Sana
24AMS	AF099008	99%	<i>Trichoderma virens</i>	No patógeno	Rama	Sana
25AMS	KX816009	99%	<i>Trichoderma</i> sp.	No patógeno	Tronco	Sana
28AMS	EF567981	99%	<i>Aspergillus niger</i>	No patógeno	Rama	Sana
29AMS	KX443224	98%	<i>Aspergillus</i> sp.	No patógeno	Rama	Sana
4AMS	KJ832022	95%	<i>Peniophora</i> sp.	Patógeno	Rama	Enferma
6AMS	JF502430	93%	<i>Peniophora</i> sp.	Patógeno	Tronco	Enferma
7AMS	KU507487	99%	<i>Lasiodiplodia laeliocattleyae</i>	Patógeno	Rama	Enferma
10AMS	KY473068	99%	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Patógeno	Rama	Enferma
11AMS	MF480345	100%	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Patógeno	Rama	Enferma
12AMS	KY655212	99%	<i>Lasiodiplodia brasiliensis</i>	Patógeno	Rama	Enferma
16AMS	KY473061	99%	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Patógeno	Tronco	Enferma
17AMS	KY473068	99%	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Patógeno	Rama	Enferma
19AMS	MF136589	99%	<i>Diplodia</i> sp.	Patógeno	Rama	Enferma
20AMS	KM508494	99%	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Patógeno	Rama	Enferma
22AMS	KJ941006	100%	<i>Phaeoacremonium</i> sp.	Patógeno	Tronco	Enferma
23AMS	KF179094	99%	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Patógeno	Cuello	Enferma

26AMS	KX394413	99%	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Patógeno	Tronco	Enferma
27AMS	KF179094	99%	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Patógeno	Cuello	Enferma
30AMS	KY680345	100%	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Patógeno	Cuello	Enferma
31AMS	KX394413	99%	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Patógeno	Rama	Enferma

Tabla 2. Bacterias identificadas molecularmente y caracterizadas según su carácter residente, procedencia y estado de la planta.

Cepa	Accesión	Ident.	Especie	Caráct. residente	Procedencia	Estado
1IIB	NR_024640	98%	<i>Enterobacter asburiae</i>	Epífita	Rama	Sana
1IID(1)	NR_126208	99%	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	Epífita	Rama	Sana
1IIC	NR_104933	96%	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Epífita	Rama	Sana
1IIA	NR_116797	91%	<i>Pantoea dispersa</i>	Epífita	Rama	Sana
1ID	NR_042349	97%	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Epífita	Rama	Sana
1IIIC	NR_042349	94%	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Epífita	Rama	Sana
1IA	NR_126208	95%	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	Epífita	Rama	Sana
1IVC	NR_042349	96%	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Epífita	Rama	Sana
1IID(2)	NR_041715	95%	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Epífita	Rama	Sana
1IB	NR_116755	98%	<i>Pantoea dispersa</i>	Epífita	Rama	Sana
1BM	NR_104839	99%	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	Epífita	Rama	Sana
2BM	NR_104839	98%	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	Epífita	Rama	Sana
4BM	NR_028983	99%	<i>Roseomonas ludipueritiae</i>	Epífita	Rama	Sana
5BM	NR_042315	93%	<i>Curtobacterium pusillum</i>	Epífita	Rama	Sana
8BM	NR_025922	98%	<i>Staphylococcus warneri</i>	Endófito	Rama	Sana
9BM	NR_025922	99%	<i>Staphylococcus warneri</i>	Endófito	Rama	Sana
11BM	NR_134084	93%	<i>Microbacterium hydrothermale</i>	Epífita	Rama	Sana
12BM	NR_104839	98%	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	Epífita	Rama	Sana
15BM	NR_025922	99%	<i>Staphylococcus warneri</i>	Endófito	Rama	Sana
17BM	NR_114215	99%	<i>Pseudomonas luteola</i>	Epífita	Rama	Sana
19BM	NR_025922	97%	<i>Staphylococcus warneri</i>	Endófito	Rama	Sana
3SP6	NR_104749	97%	<i>Bacillus subterraneus</i>	Epífita	Rama	Sana
3SP7	NR_075005	93%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Epífita	Rama	Sana
3SN1	NR_075005	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Endófito	Rama	Sana
4SP1	NR_075005	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Epífita	Rama	Sana
4SP2	NR_075005	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Epífita	Rama	Sana
4SP3	NR_075005	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Epífita	Tronco	Sana

4SP4	NR_075005	91%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Epífita	Rama	Sana
4SP5	NR_075005	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Epífita	Rama	Sana
4SP6	NR_104749	86%	<i>Bacillus subterraneus</i>	Epífita	Tronco	Sana
4SP7	NR_075005	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Epífita	Rama	Sana
4SP8	NR_075005	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Epífita	Rama	Sana
4SP9	NR_075005	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Epífita	Rama	Sana
4SN1	NR_043334	98%	<i>Bacillus niabensis</i>	Endófito	Rama	Sana
2IIB	NR_121761	91%	<i>Bacillus toyonensis</i>	Epífita	Rama	Sana
2IIB	KT591342	86%	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Epífita	Tronco	Sana
2IB	NR_044546	94%	<i>Bacillus nealsonii</i>	Epífita	Tronco	Sana
2IVA	GU584975	89%	<i>Bacillus cereus</i>	Epífita	Rama	Sana
2VB	NR_104873	94%	<i>Bacillus subtilis</i>	Endófito	Rama	Sana
3IID	NR_042349	95%	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Epífita	Rama	Enferma
3IIC	NR_118011	99%	<i>Enterobacter</i> sp.	Epífita	Rama	Enferma
3IVA	NR_111998	97%	<i>Pantoea agglomerans</i>	Epífita	Rama	Enferma
3IB	NR_024662	95%	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Epífita	Cuello	Enferma
3IA	NR_042349	97%	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Epífita	Cuello	Enferma
3IIA	NR_024662	99%	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Epífita	Rama	Enferma
3IIIA	NR_024662	98%	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Epífita	Rama	Enferma
3IC	NR_024662	99%	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Epífita	Rama	Enferma
3IIIC	NR_042349	99%	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Epífita	Rama	Enferma
3IIB	NR_042349	99%	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Epífita	Cuello	Enferma
3BM	NR_042315	98%	<i>Curtobacterium pusillum</i>	Endófito	Rama	Enferma
6BM	NR_042315	95%	<i>Curtobacterium pusillum</i>	Epífita	Rama	Enferma
7BM	NR_026156	99%	<i>Curtobacterium citreum</i>	Epífita	Rama	Enferma
10BM	NR_104839	97%	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	Endófito	Rama	Enferma
13BM	NR_026156	98%	<i>Curtobacterium citreum</i>	Epífita	Rama	Enferma
14BM	NR_042315	99%	<i>Curtobacterium pusillum</i>	Epífita	Rama	Enferma
16BM	NR_025922	99%	<i>Staphylococcus warneri</i>	Endófito	Tronco	Enferma
18BM	NR_104839	99%	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	Epífita	Rama	Enferma
20BM	NR_114215	93%	<i>Pseudomonas luteola</i>	Epífita	Rama	Enferma
21BM	NR_025922	91%	<i>Staphylococcus warneri</i>	Epífita	Rama	Enferma
3EP1	NR_117946	97%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Epífita	Rama	Enferma
4EP1	NR_118950	88%	<i>Bacillus subtilis</i>	Epífita	Rama	Enferma
4EP3	NR_025122	99%	<i>Bacillus endophyticus</i>	Epífita	Rama	Enferma

3.3. ANÁLISIS METAGENÓMICO

Análisis metagenómico comparativo de hongos

Un total de 433 OTUs fúngicos fueron detectados en el análisis metagenómico para este estudio. Las comunidades fúngicas presentes en los tres tipos de plantas (VS, VR y VE), estuvieron representadas por los Phylum Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota en diferentes porcentajes con VS (G=1.2%; A=97.6% y B=1.2%); VR (G=0.1%; A=99.2% y B=0.7%) y VE (G=0.0%; A=41.2% y B=58.8%) (Fig. 2A). A nivel de género, plantas VS estuvieron conformadas por *Aspergillus* (*A. penicillioides*), la cual resaltó como especie representativa mostrando un porcentaje de 93.2%, también aparece el género *Lasiodiplodia* con 4.3%; por otro lado, en plantas VR aparecen los géneros *Alternaria* con 33.0% y *Aureobasidium* (*Aureobasidium* sp.) con 23.9% como especies representativas, además aparecen en menor porcentaje *Cladosporium* con 13.4% y *Aspergillus* con 12.3%, por otro lado aparecen *Acremonium* con 8.4% y *Bartalinia* con 6.0% como especies marcadoras; finalmente, en plantas VE aparece *Peniophora* (*P. aurantiaca*) como especie marcadora con 57.9%, además aparece *Alternaria* con 15.9% y *Lasiodiplodia* con 11.9%, *Deniquelata* y *Fusarium* (*F. oxysporum*) aparecen como especies marcadoras en menor porcentaje con 6.3% y 3.3% (Fig. 2B).

Las comunidades fúngicas evaluadas, mostraron especies en común en los tres tipos de muestra; plantas VS y VR compartieron 7 especies; plantas VR y VE compartieron 12 especies; plantas VS y VE compartieron 3 especies y finalmente, plantas VS, VR y VE compartieron 3 especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Alternaria* y *Lasiodiplodia* (Fig. 2C).

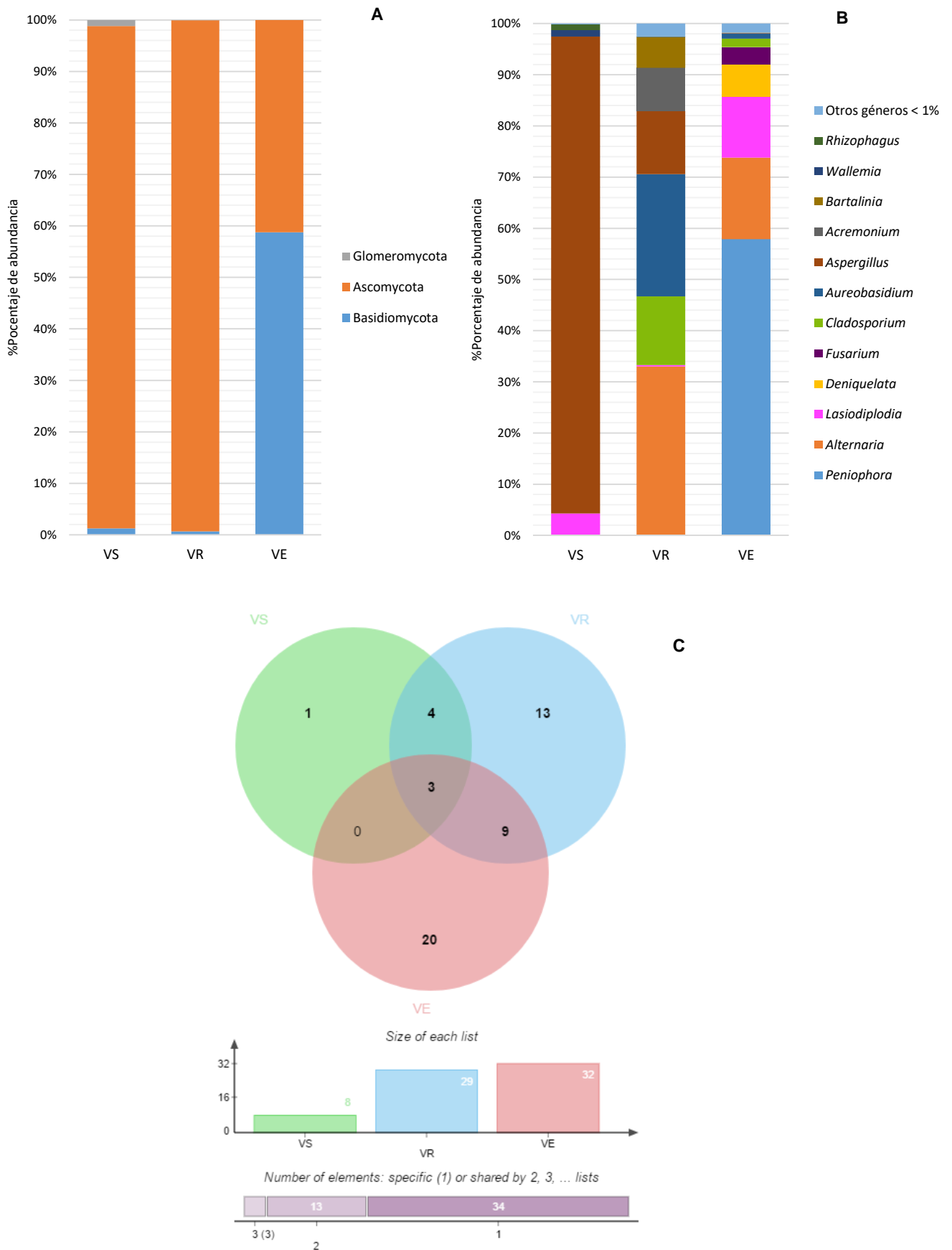


Fig. 2. Análisis metagenómico de hongos basado en la secuenciación del ADNr ITS. A) Composición taxonómica y porcentaje de abundancia a nivel de Phylum. B) Composición taxonómica y porcentaje de abundancia (>1%) a nivel de género para cada tipo de muestra. C) Representación de Venn mostrando el número de especies únicas y comunes en los tipos de plantas evaluadas.

Análisis metagenómico comparativo de bacterias

Un total de 512 OTUs bacterianos fueron detectados, además la relación taxonómica de las bacterias asociadas a los tres estados de la planta, fueron representadas y visualizadas en un árbol filogenético (Fig. 3). Se observó diferencia en la riqueza de OTUs para los tres tipos de muestra, siendo VE la que presentó mayor diversidad (Fig. 4A). Las comunidades bacterianas presentes en los tres tipos de plantas estuvieron representados principalmente por los Phylum Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes con VS (P=78.8%; F=20.8%; A=0.3% y B=0%); VR (P=85.0%; F=14.6%; A=0.3% y B=0.1%) y VE (P=75.7%; F=13.4%; A=9.8% y B=1.0%) (Fig. 4B). A nivel de especie, los microorganismos bacterianos reportados en VS, VR y VE fueron *Proteus vulgaris* con 61.1%, 62.8% y 45.1% como especie representativa respectivamente; *Bacillus* spp. con 5.5%, 3.8% y 3.4%; *Serratia marcescens* con 1.7%, 1.9% y 1.5% respectivamente, mientras que solo en VE se encontraron bacterias marcadoras como *Pseudomonas oryzae* con 10.9%, *Curtobacterium pusillum* con 7.6% y *Curtobacterium* sp. con 1.6% (Fig. 4C).

3.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO

Se logró identificar 90 secuencias peptídicas de diferentes proteínas celulares correspondientes a 6 especies de hongos patógenos asociados a las GTD (Tabla 3). La mayoría de secuencias de proteínas obtenidas del análisis *shotgun proteomics* fueron identificadas a un nivel de identidad del 99% (UNIPROT database, usando la herramienta ProteinPilot™) y del 100% (ProteinBank NCBI, usando la herramienta ProteinBLAST); por otro lado el resto de secuencias tuvieron un porcentaje relativamente bajo. La longitud de las secuencias de péptidos estuvo en un rango de 7 a 26 aminoácidos (Tabla 3).

Las proteínas identificadas fueron clasificadas de acuerdo a su proceso biológico y/o función molecular. El 21% de las proteínas estuvieron relacionadas con actividades glicolíticas; 10% con actividades catalíticas; 10% con actividades de óxido-reducción; 5% a trasducción de señales, 5% relacionadas a la transcripción; 5% relacionadas a la traducción; 3% a procesos co-enzimáticos; 3% a proteínas de unión al ATP; 2% a proteínas de unión al ADN; 2% a proteínas de unión a ARN; 2% a proteínas transmembrana; 17% a otras proteínas con funciones que representaban el 1% y finalmente 15% de proteínas con función no determinada (Fig. 5).

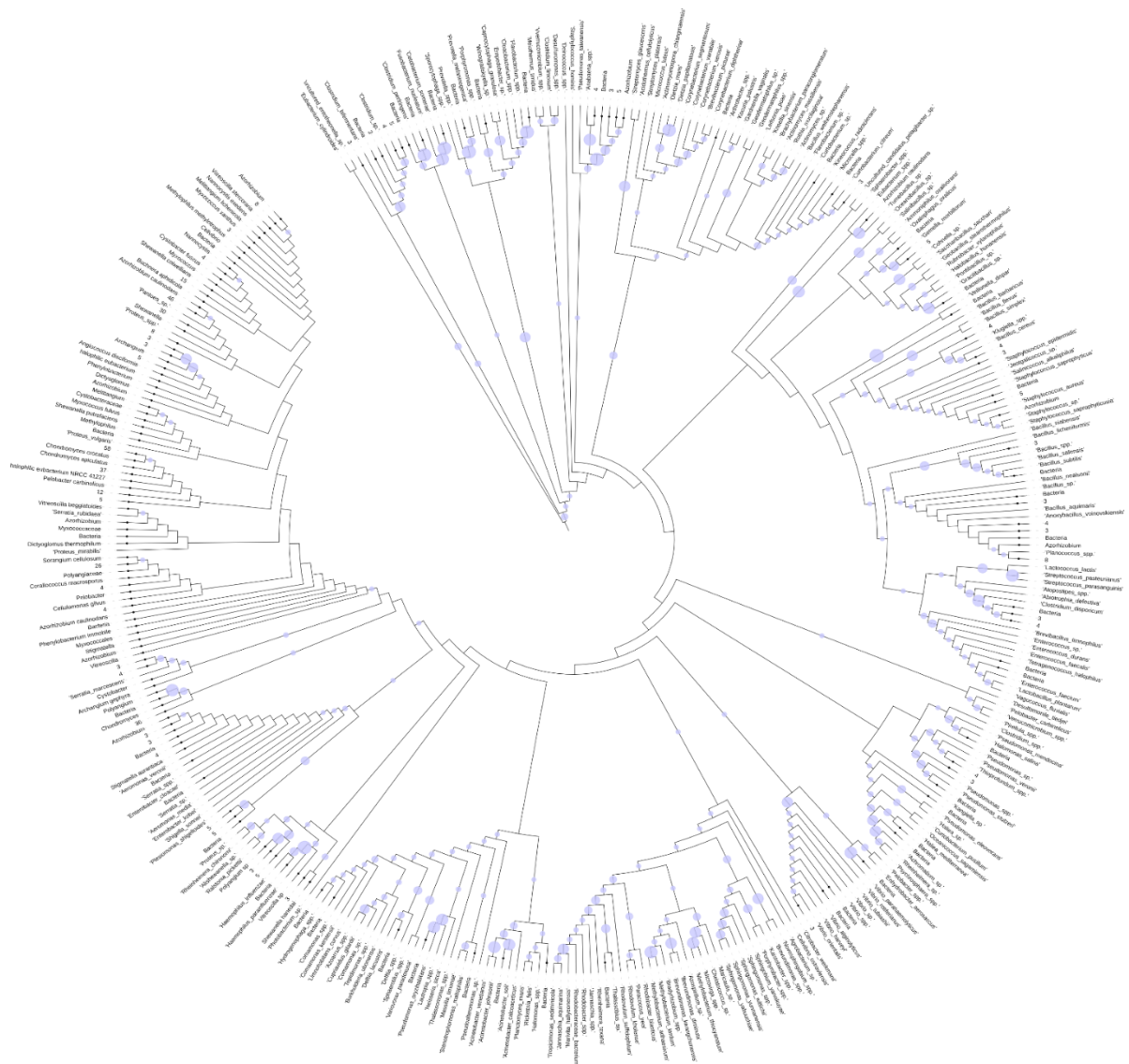


Fig. 3. Árbol filogenético basado en el método *Neighbor-Joining*, que muestra la diversidad (OTUs) de la comunidad bacteriana encontrada en las muestras.

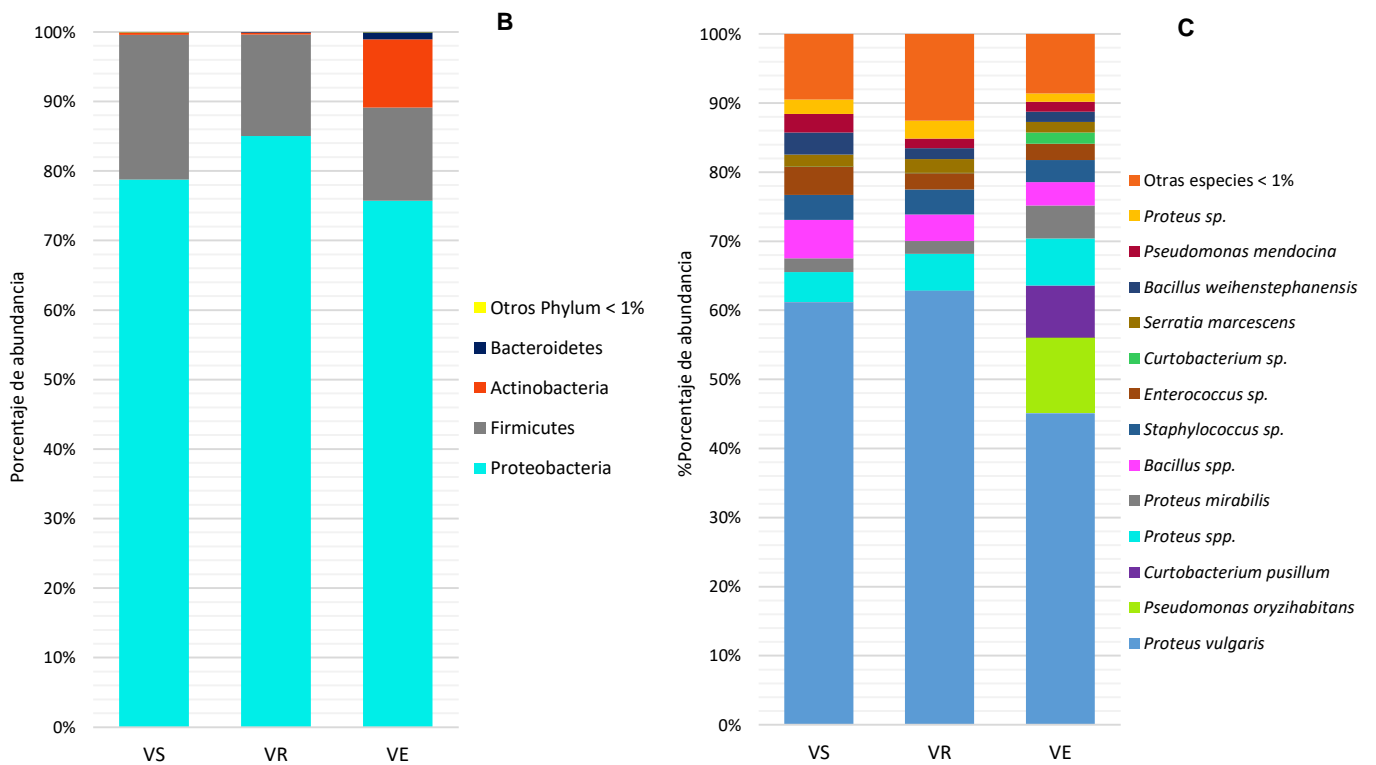
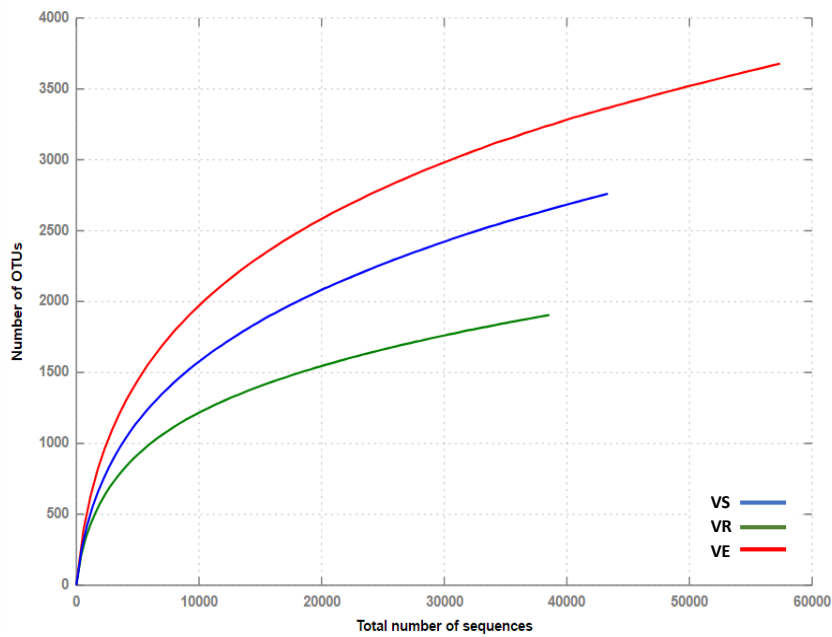


Fig. 4. Análisis metagenómico de bacterias basado en la secuenciación del ADNr 16S. A) Curva de rarefacción muestra la diferencia en la diversidad de OTUs. B) Composición taxonómica y porcentaje de abundancia a nivel de Phylum. C) Composición taxonómica y porcentaje de abundancia (>1%) a nivel de especie para cada tipo de muestra.

Tabla 3. Secuencias peptídicas obtenidas del análisis MALDI-TOF/TOF MS, las cuales correspondieron a proteínas de seis especies de hongos asociados a las GTD.

Prec MW	Prec m/z	Secuencia peptídica	Proteína	Especie	Identificación	Ident	Accesión
1673.6967	1674.704	LVSWYDNEWGYSR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein Pilot	99%	K2SSH4
2151.8887	2152.896	GILGYTEDDIVSSDLNGDNR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein Pilot	99%	K2SSH4
818.4304	819.4377	VGINGFGR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein Pilot	13.90%	K2SSH4
2368.0466	2369.054	SAVDETLPNYGGVYAGDGSNAGVR	Thiamine pyrophosphate enzyme TPP-binding protein	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein Pilot	99%	K2QQI7
1053.5096	1054.517	FVELYMPR	Thiamine pyrophosphate enzyme TPP-binding protein	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein Pilot	99%	K2QQI7
969.4402	970.4475	YSEYPGVR	Thiamine pyrophosphate enzyme TPP-binding protein	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein Pilot	32.40%	K2QQI7
1051.4617	1052.469	DLWWNYR	FAD linked oxidase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein Pilot	99%	K2RK68
975.5063	976.5136	VWLQQFR	FAD linked oxidase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein Pilot	0.70%	K2RK68
1656.7286	1657.736	YPEGDNIHVNWGTGR	6-phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein Pilot	99%	K2S8M9
1143.5726	1144.58	SSLGPSDAVLAK	hypothetical protein MPH_09945	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein BLAST	100%	EKG12953
1673.6987	1674.706	RSTLPDAVACGIATSR	hypothetical protein MPH_06777	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein BLAST	100%	EKG16082
1646.7107	1647.718	ANTNCTVAEGIDRAR	hypothetical protein MPH_06175	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein BLAST	100%	EKG16594
2058.9197	2059.927	TTGMAASAYTTNMERNSPR	hypothetical protein MPH_01866	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein BLAST	100%	EKG20832
2192.1206	2193.128	AGEEAAADAALGLVLLLDQVPR	hypothetical protein MPH_09564	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein BLAST	100%	EKG13282
1695.6497	1696.657	RPSCAVDMQHAPRR	Glycoside hydrolase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein BLAST	100%	EKG13172
2025.0046	2026.012	QNLEETGMGFDAEVQMVK	Putative TIM-barrel signal transduction protein	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein BLAST	100%	EKG17264
2951.2017	2952.209	LPMWEKMQAPDIAIDYWKMPENR	Alternative oxidase	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein BLAST	100%	EKG17769
2210.0476	2211.055	FVDTSAQEAAAAWQDVFQR	SNF2-related protein	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein BLAST	100%	EKG15835
1862.9547	1863.962	KGAQVIYDVVTSTGAAAGR	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein BLAST	100%	EKG13230
2883.2146	2884.222	QHIASWWPSWNMEPRAPRWEFR	protein of unknown function	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Protein BLAST	100%	EKG14295
2253.9036	2254.911	MNFSHGSYEHQSVIDNAR	Pyruvate kinase	<i>Botryosphaeria parva</i>	Protein Pilot	99%	R1GDV7

1834.8607	1835.868	TEWLSQLNTEYRPAK	Pyruvate kinase	<i>Botryosphaeria parva</i>	Protein Pilot	99%	R1GDV7
1053.5117	1054.519	FVELYMPR	Putative pyruvate decarboxylase protein	<i>Botryosphaeria parva</i>	Protein Pilot	99%	R1EZ71
1307.5427	1308.55	SDFNTTGFTYR	Putative pyruvate decarboxylase protein	<i>Botryosphaeria parva</i>	Protein Pilot	98.90%	R1EZ71
1518.6687	1519.676	DSFAAGWGVMSHR	Putative enolase protein	<i>Botryosphaeria parva</i>	Protein Pilot	99%	R1GXH7
1708.8707	1709.878	VIVVAYHPSNNELVR	40S ribosomal protein S8	<i>Botryosphaeria parva</i>	Protein Pilot	99%	R1GA90
1195.5256	1196.533	WSYEDVEIR	Putative 40s ribosomal protein S5	<i>Botryosphaeria parva</i>	Protein Pilot	99%	R1GEL1
1256.6947	1257.702	LGSVLVQCILR	Putative phosphate transporter protein	<i>Botryosphaeria parva</i>	Protein Pilot	99%	R1G8S4
1244.4907	1245.498	YGEDWEKYR	Putative delta-sterol reductase protein	<i>Botryosphaeria parva</i>	Protein Pilot	99%	R1EL76
1272.6387	1273.646	AVSLTWPNETR	putative trna processing endoribonuclease protein	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007587580
1607.7966	1608.804	DGSIAMAVLGVRFTR	putative polyketide synthase protein	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007588609
2951.3357	2952.343	FHGSATWNIEICGANFKPLMYLNR	putative rna-dependent rna polymerase protein	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007589444
1481.7167	1482.724	DRRDKPEGNMHK	putative inositol monophosphatase protein	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007583401
2247.0427	2248.05	TSSHSESNLYEAKPVLGQGR	putative integral membrane protein	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007584725
1350.6107	1351.618	EYAAEAIQGSRR	putative cercosporin toxin biosynthesis protein	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007585443
1053.5096	1054.517	FVELYMPR	Putative pyruvate decarboxylase	<i>Diplodia seriata</i>	Protein Pilot	99%	A0A0G2GHC2
1350.6107	1351.618	QPIDVAEYLFRR	Putative pyruvate decarboxylase	<i>Diplodia seriata</i>	Protein Pilot	99%	A0A0G2GHC2
2265.0518	2266.059	ENDIVITETGTANFGIWETR	Putative pyruvate decarboxylase	<i>Diplodia seriata</i>	Protein Pilot	89.40%	A0A0G2GHC2
1779.9507	1780.958	ALENPQRPVAILGGAK	Phosphoglycetare kinase	<i>Diplodia seriata</i>	Protein Pilot	99%	A0A0G2EPE0
1440.7556	1441.763	ATDGQIVLLENLR	Phosphoglycerate kinase	<i>Diplodia seriata</i>	Protein Pilot	99%	A0A1S8BL31
1790.8947	1791.902	LEKGASYDEIKETIR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	OMP86720
1524.6127	1525.62	HYGMTPPDDYTAVR	Putative thiamine biosynthesis protein	<i>Diplodia seriata</i>	Protein Pilot	99%	A0A0G2F1L8
1868.8436	1869.851	IEEELGSQAVYAGKNFR	putative phosphopyruvate hydratase	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	XP_020127401
2090.9397	2091.947	AQAEQALWKWVGEWHPR	Aldehyde reductase 2	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	OMP84324
1394.5747	1395.582	YYPAEDEQQPR	putative 60s ribosomal protein l6	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	KKY22334

1006.3928	1007.4	AGATAQMGAGR	hypothetical protein BK809_0004048	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	OMP85378
2367.0156	2368.023	ANQANHWNIDYRAVLQIWR	putative 6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	KKY14827
1389.6766	1390.684	EGTNGSTQPAYGAR	GTP-binding protein rhoC	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	OMP86342
1705.7537	1706.761	AGIPKESIFDEELMK	Chromatin-remodeling complexes subunit NGG1	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	OMP82564
1481.7167	1482.724	GAPGSMGPPQRPADK	putative transcription initiation factor tfiid component taf4	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	KKY13456
2020.8997	2021.907	LSAQFQNGFHDSNADQSR	putative cch zinc finger and rrm domain-containing protein	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	KKY23048
2673.2666	2674.274	NAAFLVEPIQGEAGIVVPDDSYLR	putative l-ornithine aminotransferase	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	KKY17893
1834.8937	1835.901	GTVIAEYVWIDGNSGVR	putative glutamine synthetase	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	KKY14390
2934.2397	2935.247	AGCYAPTLHEHNTPGRCYSYHCQR	Rho1 guanine nucleotide exchange factor 3	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	OMP83955
2951.2507	2952.258	HYELHKNTVLPFIPLDDDDGEEDINK	Serine/threonine-protein kinase ATG1	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	OMP85750
2151.8887	2152.896	DGEETGYPIGMPKQSRNR	ATP-dependent DNA helicase mph1	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	OMP87502
1193.5616	1194.569	AVNMPGNYVGR	Pumilio-like protein 1	<i>Diplodia seriata</i>	Protein BLAST	100%	OMP86744
1673.7136	1674.721	LVSWDYNEWGYSR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Diplodia corticola</i>	Protein Pilot	99%	A0A1J9R8I0
1053.5096	1054.517	FVELYMPR	Pyruvate decarboxylase	<i>Diplodia corticola</i>	Protein Pilot	99%	A0A1J9R1X2
2306.1357	2307.143	KPYVLPVPFQNVLNNGSHAGGR	enolase	<i>Diplodia corticola</i>	Protein Pilot	99%	A0A1J9RUF2
1382.7677	1383.775	ATGGQIVLLENLR	Phosphoglycerate kinase	<i>Diplodia corticola</i>	Protein Pilot	99%	A0A1J9RAW6
1601.8247	1602.832	ARARAATTELDNSAR	epidermal growth factor receptor substrate 15-like	<i>Diplodia corticola</i>	Protein BLAST	100%	XP_020129707
2367.0437	2368.051	DGVKVDYDFLPMQTVVNATVVR	conidiation-specific protein (con-13) protein	<i>Diplodia corticola</i>	Protein BLAST	100%	XP_020128865
1655.6816	1656.689	RSSDPSSPPQSPEER	hypothetical protein BKCO1_300072	<i>Diplodia corticola</i>	Protein BLAST	100%	XP_020134487
1440.7556	1441.763	SDRVSVDPKAVIR	10-deacetylbaccatin III-10-O acetyltransferase	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Protein Pilot	99%	A0A0D4BT92
1440.7556	1441.763	LSESDIRPDRIR	LasS1 (Lasiodiplodin)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Protein Pilot	99%	X4Y158
1382.7677	1383.775	LTIGNPGLDLTLR	LasS1 (Lasiodiplodin)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Protein Pilot	0.20%	X4Y158
1382.7677	1383.775	LDDALRDGDSIR	LasS1 (Lasiodiplodin)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Protein BLAST	100%	AHV78245
1351.6857	1352.693	EFKPVNQKPRR	LasS2 (Lasiodiplodin)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Protein BLAST	100%	AHV78247

1382.7677	1383.775	QDNGGVVLEENLR	Phosphoglycerate kinase	<i>Togninia minima</i>	Protein Pilot	99%	R8BAM1
1647.7806	1648.788	LGDVYINDAFGTAHR	Phosphoglycerate kinase	<i>Togninia minima</i>	Protein Pilot	94.50%	R8BAM1
1673.7136	1674.721	LVSWYDNEWGYSR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Togninia minima</i>	Protein Pilot	97.30%	R8BM12
1456.7496	1457.757	VPTSNVSVVDLTAR	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Togninia minima</i>	Protein Pilot	80.90%	R8BM12
1101.5797	1102.587	GQKLADNSNR	Putative Zn 2cys6 transcription factor protein	<i>Togninia minima</i>	Protein Pilot	99%	R8BE84
1354.6866	1355.694	RYQAQELGENM	Putative cortical actin cytoskeleton protein asp1 protein	<i>Togninia minima</i>	Protein Pilot	99%	R8BHX7
1868.8436	1869.851	QLEEQQAAYVQRSR	putative phosphorus acquisition-controlling protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007914704
1440.7556	1441.763	LAISKETIAINLR	putative cleavage and polyadenylation specificity protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007916345
1501.7777	1502.785	RYTLDVVQPKR	putative developmental regulator protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007914683
1790.8947	1791.902	LSTSQEEEEPITLSTK	putative surfeit locus protein 6 protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007913292
2151.8887	2152.896	GDVMIRDLRLWHAGMPNR	putative phytanoyl- dioxygenase protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007919464
2400.0896	2401.097	AEMEAFLTKYSQSYFGNDKR	putative vps52 sac2 family protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007918651
2673.2666	2674.274	EIPEFTNNIAMESIKMATDPEHR	putative short chain dehydrogenase protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007916810
2414.0818	2415.089	EAPPEQMVFYEAANDSAMEER	putative serine threonine protein kinase protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007918280
2367.0437	2368.051	RKDVWNLLTAMSEYLICVR	putative upf0171 domain protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007918350
1779.9797	1780.987	KGPGSTTNSDKNMSAER	putative fibronectin type III domain-containing protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007916911
2400.1157	2401.123	TESAIRLTHIPSGTVVSMQDSR	putative peptide chain release factor 1 protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007912665
1518.6277	1519.635	MMEGFARDVMER	putative dna-binding protein smubp-2 protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007916178
2934.1746	2935.182	IMTDAVTGQSRGYGFVRFEEGDQQR	putative trna selenocysteine-associated protein 1 protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007911032
1481.7537	1482.761	SQKWGQPHCQAR	putative dipeptidyl-peptidase 3 protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007913215
1318.6997	1319.707	IQDSQDELQSR	putative rho-gtpase-activating protein 8 protein	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Protein BLAST	100%	XP_007917645

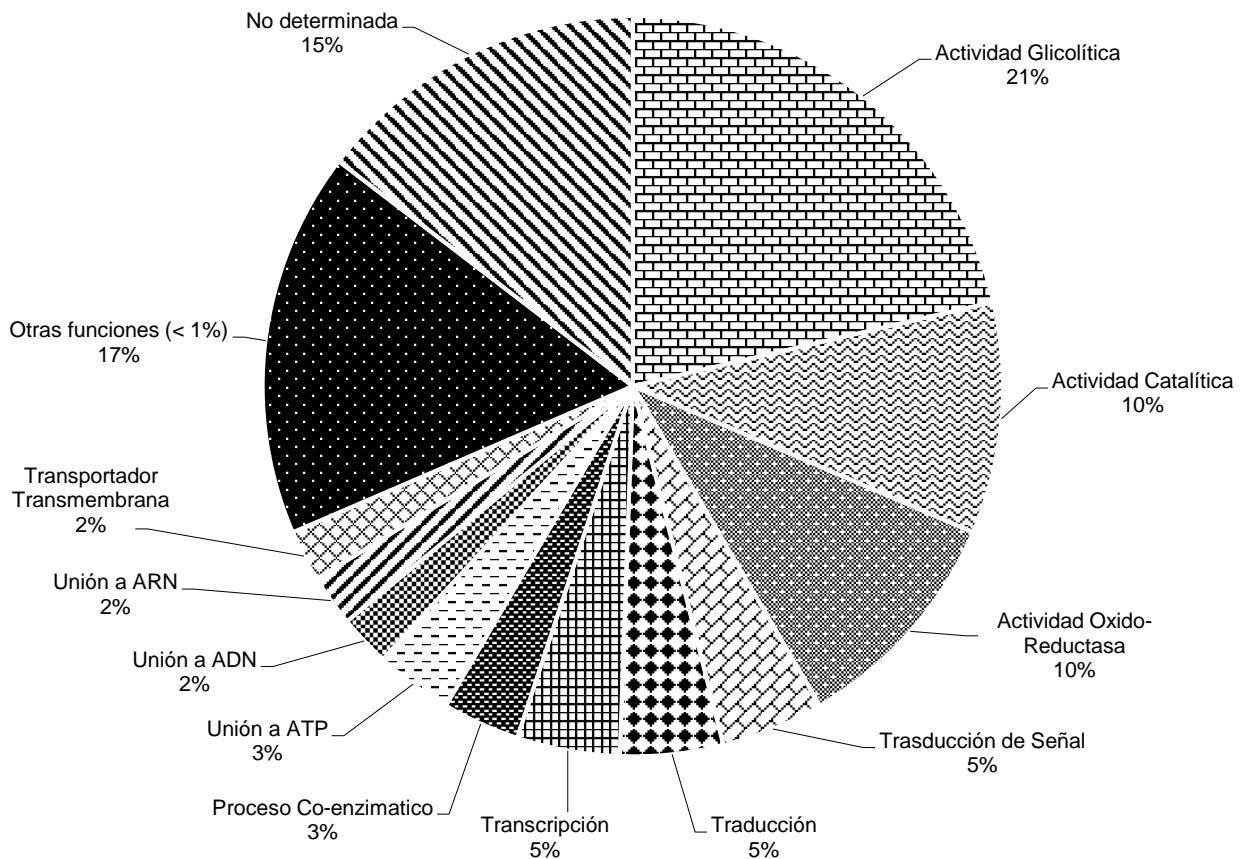


Fig. 5. Clasificación de las proteínas fúngicas de acuerdo a su proceso biológico y/o función molecular, mostrando diferencias en porcentajes.

Las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF correspondieron a *M. phaseolina* (agente causal de Botryosphaeria dieback); *B. parva* (= *Neofusicoccum parvum*, agente causal de Botryosphaeria dieback); *D. seriata* (agente causal de Botryosphaeria dieback); *D. corticola* (agente causal de Botryosphaeria dieback); *L. theobromae* (agente causal de Botryosphaeria dieback) y *T. minima* (= *Phaeoacremonium minimum*, agente causal de Petri disease). Espectros de masas de las especies *L. theobromae* (Fig. 6) y *T. minima* (Fig. 7) detectaron la intensidad de las secuencias de péptidos para la enzima de biosíntesis de la fitotoxina lasiodiplodin y una fibronectina tipo III respectivamente.

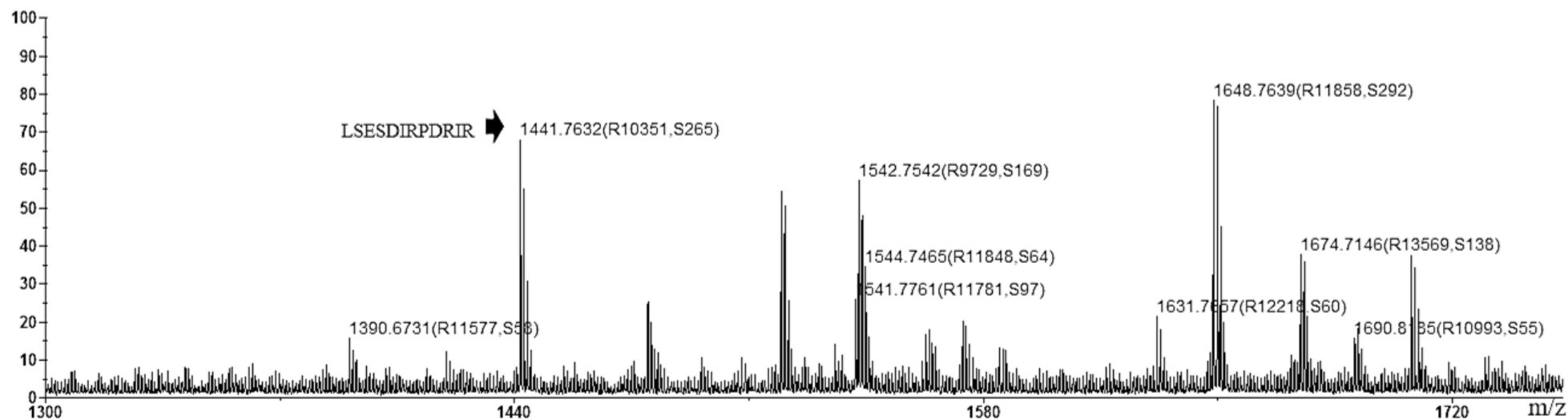


Fig. 6. Espectro de masas muestra la intensidad de picos detectados por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. El pico 1441.7632 (m/z) representa la secuencia de LSESDIRPDRIR la cual corresponde a LasS1, una enzima relacionada a la síntesis de la fitotoxina Lasiodiplodin de *L. theobromae*.

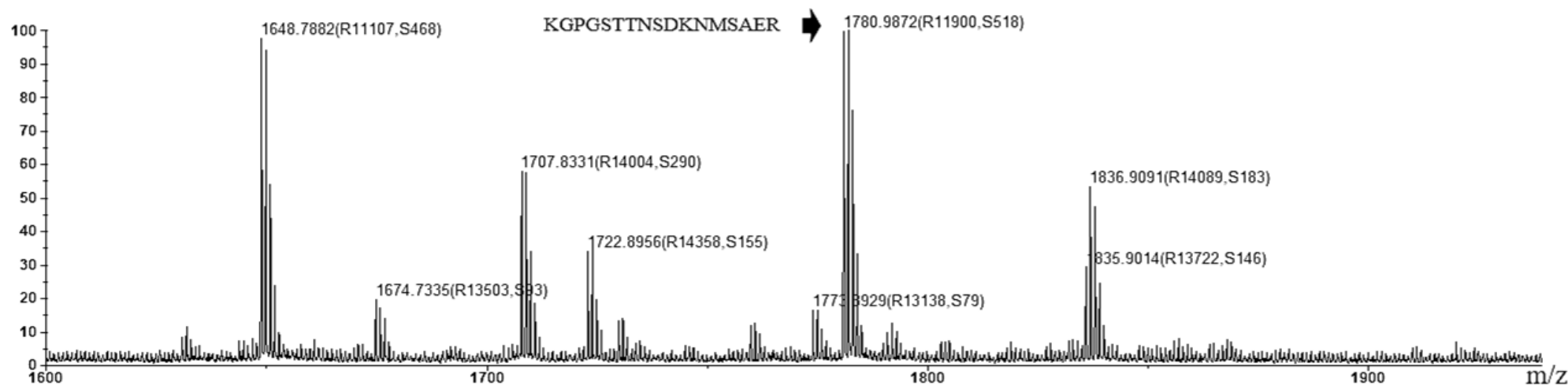


Fig. 7. Espectro de masas muestra la intensidad de picos detectados por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. El pico 1780.9872 (m/z) representa la secuencia de KPGGSTTNSDKNMSAER la cual corresponde a una putative fibronectin tipo III de *T. minima*.

4. DISCUSIÓN

En los últimos años, las GTD se han establecido como las patologías más importantes en el cultivo de uva de mesa bajo las condiciones de Piura. Todos los parrones de vid evaluados, mostraron plantas con síntomas de GTD: clorosis y necrosis de hojas, muerte regresiva acompañada de defoliación de las ramas, presencia de estructuras fúngicas, así como necrosis vascular en ramas y tallos infectados, estos concuerdan con lo descrito por Úrbez-Torres y Gubler (2009); Mondello *et al.* (2013) Rodríguez-Gálvez *et al.* (2014); Bruez *et al.* (2015).

Piura, se ha visto afectada por esta enfermedad, siendo reportada por primera vez por Rodríguez-Gálvez *et al.* (2014). Los autores reportaron a la especie *L. thebromae* como el agente causal de la enfermedad, sin embargo, la etiología no ha sido bien aclarada (Bertsch *et al.*, 2012) ya que existe la hipótesis de un complejo de hongos asociados a las GTD que se encuentren afectando de manera dinámica en la planta, incluso Bruez *et al.* (2015) sugirieron la participación de microorganismos bacterianos en el desarrollo necrótico de los tejidos del tronco. Este estudio fue desarrollado bajo la hipótesis establecida por Bruez *et al.* (2015), lo que permitió revelar de manera clara la participación de bacterias y su rol en una enfermedad fúngica.

En este estudio, métodos dependientes e independientes de cultivo fueron combinados para comparar la composición de hongos y bacterias asociadas a plantas sanas y enfermas con síntomas de GTD. Estos enfoques revelaron diferencias en la biodiversidad microbiana entre las diferentes muestras.

El análisis comparativo de las comunidades fúngicas y bacterianas, a partir de plantas de vid sanas y con síntomas de GTD fueron realizadas por primera vez. Las comunidades fúngicas y bacterianas que habitaban ramas en dos estados de tejido (necrótico y no necrótico) fueron analizadas partir

de plantas sintomáticas como asintomáticas usando un enfoque metagenómico con el propósito de determinar cuál es el rol de estos microorganismos en el proceso de desarrollo de las GTD en Piura.

Bruez *et al.* (2015) observaron una microflora bacteriana compleja habitando los tejidos necróticos y no necróticos de cordones (ramas) y del tejido no necrótico del tronco. Por medio de una técnica *fingerprinting* (SSCP), ellos demostraron que, dependiendo del tipo de muestra, las comunidades bacterianas fueron diferentes en ambos estados del tejido. Nuestros hallazgos coinciden con lo reportado previamente por Bruez *et al.* (2015); en este estudio demostramos las diferencias dentro de la composición de las comunidades microbianas (fúngicas y bacterianas) que habitan plantas de vid sintomáticas y asintomáticas, siendo reportadas por primera vez utilizando técnicas de secuenciación masiva.

Mediante el uso de secuenciación masiva de siguiente generación (NGS), nuestro estudio pudo revelar que microorganismos estuvieron asociados a plantas sanas y con síntomas de GTD. Un total de 433 OTUs fúngicos y 512 OTUs bacterianos fueron revelados. Presencia de especies fúngicas y bacterianas fueron marcadoras para cada tipo de planta.

La abundancia de eucariotas y procariotas identificados, pertenecieron al phylum Ascomycota y a la familia Enterobacteriaceae, respectivamente, lo cual coincide con estudios previamente publicados (Nisiotou *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2014).

De acuerdo a nuestros datos, la abundancia del phylum Ascomycota en plantas VS, se debe a la presencia de *Aspergillus* (*A. penicillioides*). *A. penicillioides* resalta como especie marcador (93.2%), esto revelaría un posible equilibrio armónico existente entre el género *Aspergillus* y las plantas VS. A pesar de que el género *Aspergillus* ha sido catalogado en investigaciones como una especie oportunista y en otras como patógenos causantes de pudrición negra en uva por *Aspergillus* sección Nigri productoras de toxinas de tipo Ochratoxin A (Romero *et al.*, 2005; Logrieco

et al., 2007; Favilla *et al.*, 2008; Ponsone *et al.*, 2011), y pudrición en maíz y maní (Palencia *et al.*, 2010), varios estudios confirman su carácter benéfico como promotor de crecimiento, solubilizador de fosfatos y carácter antagonista contra patógenos en diferentes especies de plantas. Kohler *et al.* (2007) demostraron la capacidad de incrementar significativamente el peso seco de raíces de lechuga por *A. niger*; Salas-Marina *et al.* (2011) demostraron la capacidad promotora de crecimiento y cambio en la arquitectura radicular en plantas de papa y *Arabidopsis thaliana* por *A. ustus*, además confirió resistencia sistémica inducida contra *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae*; finalmente, Zhao *et al.* (2014) demostraron en su estudio que la aplicación de un biofertilizante para el tratamiento de marchitez causada por *F. oxysporum* en plantas de melón, modificó la comunidad fúngica del suelo e incremento los niveles de hongos benéficos tales como *A. penicillioides* y *Chaetomium* sp. y disminuyó la proporción de algunos hongos patógenos en comparación con el suelo no tratado. Así, esto demuestra para nuestro estudio que *Aspergillus* revela una estrecha asociación mutualista con las plantas VS, generando un buen estado en la salud de la planta.

Por otro lado, el género *Lasiodiplodia* reportado como patógeno causante de *Botryosphaeria dieback*, fue encontrado en plantas VS, aunque en una abundancia relativamente baja (4.3%). Esto demuestra que ciertos patógenos pueden formar parte de la microbiota asociada a plantas sanas sin mostrar sintomatología alguna, esto coincide con el estudio de Bruez *et al.* (2014) donde reportaron la presencia de especies Botryosphaeriaceae en plantas de vid que no mostraban síntomas de *Esca disease*, así, *D. seriata* y *N. parvum* fueron encontrados habitando los tejidos no necróticos, además pudieron observar que no incrementan las áreas necróticas durante el periodo de un año en el cual duró su estudio. Bruez *et al.* (2014) sugieren que factores bióticos, por ejemplo bacterias y abióticos, por ejemplo cambios climáticos, prácticas culturales y otros necesitan ser estudiados con el propósito de entender cómo es que estos factores favorecen los procesos patogénicos en este tipo de escenarios.

También estuvieron presentes en plantas VS, los géneros *Wallemia* (1.2%) y *Rhizophagus* (1.1%). Sin embargo no hay reportes de ambos hongos en el cultivo de vid.

Hubo mayor diversidad en la comunidad fúngica para plantas VR. Presencia de los géneros *Alternaria* (*Alternaria* sp. y *A. alternata*) (33.0%) y *Aureobasidium* (*Aureobasidium* sp. y *A. pollulans*) (23.9%), fueron los más resaltantes. El género *Alternaria* contiene muchas especies que son saprofitas o patógenas. *A. alternata* es la especie más común y conocida por ser el agente causal de la pudrición del racimo de uva (*grape bunch rot*) causando pérdidas significantes según lo manifestado por Kakalíková *et al.* (2009), Mikušová *et al.* (2014) y Lorenzini *et al.* (2014). Nuestro estudio pudo detectar *Alternaria* sp. y *A. alternata* mediante metagenómica, además se pudo detectar la presencia de *A. longipes* a partir de ramas con presencia de necrosis mediante métodos dependientes de cultivo, esto evidenciaría que *Alternaria* no solamente estaría asociada a enfermedades de pudrición de frutos, sino también al complejo asociado a las GTD. Por otra parte, *Aureobasidium*, es frecuentemente reportado como endófito de varios cultivos, incluyendo a la vid, además aislamientos de *A. pollulans* son capaces de exhibir actividad antagonista a algunos fitopatógenos como *B. cinerea* y *Penicillium expansum* (Schena *et al.*, 1999; Nigro *et al.*, 2003; Schena *et al.*, 2003).

En plantas VR, también resaltaron otros géneros como *Cladosporium* (*Cladosporium* sp., *C. sphaerospermum* y *C. cladosporioides*) (13.4%). *C. cladosporioides* un hongo epífita reportado por causar pudrición en uvas (Latorre *et al.*, 2011), *Acremonium* (*Acremonium* sp.) (8.4%) también reportado por Król (2006) y Hofstetter *et al.* (2012) en la madera de la vid, y *Bartalinia* (5.9%). Finalmente, aparecen nuevamente los géneros *Aspergillus* y *Lasiodiplodia* con porcentaje de abundancia de (12.3%) y (0.2%) respectivamente, porcentaje mucho menor respecto a las plantas VS.

En plantas VE, aparece el género *Peniophora* (*P. aurantiaca*) con el porcentaje de mayor abundancia en este grupo (57.5%). Fischer y Kassemeyer (2003) reportan por primera vez en vid el género *Peniophora* (*P. incarnata* específicamente) como un hongo saprófito asociado a *Esca disease*. A pesar de que este Basidiomicetes, también ha sido reportado por White *et al.* (2011) como un hongo asociado a *Esca disease* en Sudáfrica, sugieren que su asociación con la pudrición blanca es incierta. La percepción de que los basidiomicetos no son una amenaza para la vid ha limitado las investigaciones sobre este grupo (Fischer, 2006). En este contexto, *P. aurantiaca* determinado mediante metagenómica, fue un marcador visible para plantas VE, por otra parte, *Peniophora* sp. y *P. laxitexta* determinados por métodos dependientes de cultivo, confirman su participación en el complejo de las GTD, los cuales deben ser evaluados y tomados en cuenta para futuras investigaciones.

Presencia del género *Deniquelata* (*Deniquelata* sp.) (6.4%) le permite calificarse como especie marcador para plantas VE. No hay reportes de esta especie en vid y sería la primera vez en este estudio, sin embargo ha sido reportado como patógeno parasitando hojas de *Barringtonia asiatica* (Ariyawansa *et al.*, 2013).

Fusarium (*F. oxysporum*) (3.3%) aparece también como especie marcador para plantas VE. Bruez *et al.* (2014) reporta a *F. oxysporum* aislado de plantas de vid sintomáticas y asintomáticas de *Esca disease*; por otro lado Hofstetter *et al.* (2012) reporta a *F. oxysporum* a partir de plantas asintomáticas pero no de plantas sintomáticas de *Esca disease*.

Finalmente reaparecen los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aureobasidium* y *Aspergillus* en plantas VE, pero con abundancia relativamente menor que en los anteriores escenarios. Solo el género *Lasiodiplodia* reaparece con mayor índice de abundancia que en los anteriores estados de la planta, esto consolida a este género su persistencia durante el desarrollo de la enfermedad como un patógeno importante en la vid.

Resumiendo, plantas de vid, sanas y con síntomas de GTD, mostraron diferencias en la riqueza de hongos. Nuevas ideas de la participación del complejo fúngico en el desarrollo de la enfermedad en el tronco de la vid se pone de manifiesto con lo revelado por el análisis metagenómico. Además hongos patógenos, tales como *Lasiodiplodia* fueron identificados tanto en plantas sanas como enfermas.

Las comunidades bacterianas fueron reveladas y mostraron ser dinámicas a través de los diferentes estados de la planta. De acuerdo a nuestros resultados, el Phylum más sobresaliente fue el Proteobacteria, seguido del Firmicutes y finalmente el Actinobacteria.

Las especies del género *Proteus* han sido aisladas de diferentes ambientes humanos y no humanos y su presencia en organismos superiores, agua y suelo está bien documentada (Drzewiecka *et al.*, 2016). *Proteus* spp. son bacterias muy bien conocidas por ser patógenos oportunistas en humanos, aislados de orina, heridas y otras fuentes clínicas (Drzewiecka y Sidorczyk, 2005; Manos y Belas, 2006; Armbruster y Mobley, 2012). Muchos animales domésticos y salvajes también son huéspedes de *Proteus* spp. los cuales son conocidos por jugar un rol importante como parásitos o comensales. A pesar que *Proteus* spp., como elementos de la microflora intestinal de humanos y animales, ellos juegan un papel efectivo y especializado como biorremediadores de hidrocarburos, pesticidas, herbicidas, compuestos aromáticos y metales pesado en ambientes contaminados, como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) y como controladores de fitopatógenos. Existen varios ejemplos reportados de relaciones benéficas entre *Proteus* – planta: leguminosas, *wild grass*, té, col, maíz, arroz, trigo y *A. thaliana* (Barthakur *et al.*, 1999; Rau *et al.*, 2009; Yu y Lee, 2013; Islam *et al.*, 2014; Billah y Bano, 2015; Drzewiecka *et al.*, 2016). Sin embargo, no hay reportes de *Proteus* formando parte de la microflora asociada a plantas de vid, y sería el primer reporte en este estudio. La especie *Proteus vulgaris* fue la que se presentó en mayor abundancia con 61.1% (VS), 62.8% (VR) y 45.1% (VE). Además tres especies de *Proteus* (dos *Proteus* spp. y *P. mirabilis*) también fueron

reveladas pero en menor índice mediante metagenómica. Nuestros resultados muestran a esta especie como dominante en los tres estados de la planta. Es probable que *P. vulgaris* proceda del suelo (inclusive del abono) y esté formando parte de las zonas aéreas de las plantas de vid (caulósfera) tal y como lo postula Zorraonaindia *et al.* (2015). Estos resultados prometedores abren posibilidades más amplias de utilizar cepas de *Proteus* spp. como PGPR. Adicionalmente, Drzewiecka *et al.* (2016) sugieren que el análisis metagenómico del suelo y agua, así como de diferentes nichos en organismos humanos, animales y vegetales utilizando secuencias adecuadas de *primers*, puede revelar la presencia de *Proteus* spp. en estos hábitats, incluso si exhiben actividades atípicas y desempeñan papeles inusuales.

El género *Bacillus* (*Bacillus* spp. y *B. weihenstephanensis*) también fue revelado en los tres estados de la planta. *Bacillus* spp. han sido ampliamente reportadas como endófito de la vid (Compant *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2014; Bruez *et al.*, 2015) y formando parte de la rizósfera (Karagöz *et al.*, 2012), las cuales están directamente relacionadas por influir en la salud de la planta (Pinto y Gomes, 2016). Varias cepas del género *Bacillus* fueron aisladas mediante métodos dependientes de cultivo en este estudio. Un *Bacillus* sp. M1 aislado del tejido interno de ramas sanas de vid ha mostrado su capacidad antagonista al suprimir el crecimiento de *L. theobromae* en condiciones *in vitro*. Se espera en trabajos a futuro utilizar la cepa M1 como posible bacteria promotora de crecimiento en plantas de vid y su potencial de suprimir patógenos del tronco en ensayos *in vivo*.

Pseudomonas (*P. oryzihabitans* y *P. mendocina*) y *Curtobacterium* (*Curtobacterium* sp. y *C. pusillum*) aparecen como marcadores bacterianos en plantas VE. *Pseudomonas* ha sido reportada como habitante de hojas y bayas (Zorraonaindia *et al.*, 2015), del interior de las flores (Compant *et al.*, 2011), en los tejidos necróticos de la madera (Bruez *et al.*, 2015) y habitando la rizósfera (Karagöz *et al.*, 2012). *Curtobacterium* también ha sido aislado de las bayas, hojas, corteza y suelo (Martins *et al.*, 2013)

además también reportado como endófito y epífito del tronco de la vid (West *et al.*, 2010).

La caulósfera de la vid hospeda una mayor diversidad bacteriana en plantas enfermas que en plantas sanas. Esto demuestra, efectivamente, que ciertas bacterias, *Pseudomonas* y *Curtobacterium*, estarían asociadas a los hongos y posiblemente influir de manera directa en las patologías de las GTD. Por otra parte, entre los diferentes grupos de procariotas reportados en este estudio, se han identificado potenciales microorganismos antagonistas. De acuerdo a estudios previos, los antagonistas bacterianos más conocidos son las especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Pantoea* y *Actinomycetes* (Trotel-Aziz *et al.*, 2008; Bulgari *et al.*, 2011), además, está bien documentado que cepas bacterianas pertenecientes al género *Streptococcus* también muestran actividad antagonista contra hongos patógenos (Trotel-Aziz *et al.*, 2008). En este estudio, algunas de ellas fueron detectadas y aisladas, lo que conllevará a seguir realizando estudios para explorar su potencial y uso en el control biológico de las GTD.

En resumen, este estudio pudo determinar la biodiversidad microbiana del tronco de la vid, a través de un enfoque metagenómico, y la interpretación de las comunidades microbianas revelaron ser esenciales para entender el balance y la dinámica de los microorganismos patógenos y benéficos en el estado de la salud de la planta. Así, nuestros resultados podrían representar un paso crucial para el desarrollo de estrategias eco-amigables para la protección de las plantas de vid y la producción de uva de mesa.

Metodologías de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF *shotgun proteomics*, fueron usadas para la detección de microorganismos fúngicos a nivel de especie. Esta investigación pudo identificar mediante secuencia de péptidos una diversidad de proteínas celulares asociadas a varios procesos biológicos básicos de las especies fúngicas patógenas de la vid. Además, también se detectaron enzimas relacionadas a la biosíntesis de fitotoxinas importantes en la patogenicidad.

L. theobromae fue identificado por medio de secuencias para la enzima LasS1 y LasS2, que están involucradas en la síntesis de una fitotoxina, lasiodiplodin, importante en los procesos de patogenicidad del hongo, esto es corroborado por Xu *et al.* (2014). Además, *N. parvum* también fue identificado por medio de secuencias para la enzima relacionada a la biosíntesis de cercosporin, otra fitotoxina fúngica que participa en los procesos patogénicos en las GTD.

Además, otros patógenos fúngicos asociados a las GTD también fueron identificados en base a su secuencia de peptídica tales como *M. phaseolina*, *D. seriata*, *D. corticola* y *P. minimum*.

Por otra parte MALDI-TOF/TOF y MS IMAGING han sido exitosamente usadas para la identificación de lipopéptidos de importancia antifúngica a partir de bacterias nativas del tronco con carácter antagonista (*Bacillus* sp. cepa M1) y cuyos resultados están en preparación. Con esto, demostramos que la espectrometría de masas constituye una, rápida, fácil y precisa metodología en el estudio del campo de la proteómica.

5. CONCLUSIONES

Este estudio, ha podido revelar la presencia de las GTD en las condiciones de Piura. *Botryosphaeria dieback* y *Petri disease* (young Esca) han sido confirmadas en este estudio como establecidas en los viñedos piuranos afectando de manera seria y con amenaza de propagarse rápidamente si no se toman medidas urgentes.

Por primera vez fue revelada la comunidad microbiana asociada a los tejidos de la madera de vid mediante metagenómica. Las comunidades bacterianas están interactuando con los hongos asociados a las GTD, algunas de ellas son marcadoras de plantas sanas y enfermas, lo cual permitiría responder a las cuestiones de cuál es el rol de las bacterias en una enfermedad que ha sido considerada por mucho tiempo netamente fúngica. Sin embargo queda mucho por investigar.

Este trabajo, reporta por primera vez, 4 nuevas especies de hongos patógenos asociados a GTD en Piura, *Peniophora* sp., por secuenciación de la región ITS y *M. phaseolina*, *D. corticola* y *D. seriata* por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, con esto la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF es una tecnología potente para la identificación de hongos patógenos de la vid mediante su secuencia peptídica.

Además, se reporta aislamientos bacterianos candidatos para su uso en control biológico de las GTD, tales como *Bacillus* sp. M1. Adicionalmente MALDI-TOF/TOF han permitido analizar e identificar moléculas de interés e importancia antifúngica.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andreolli, M., Lampis, S., Zapparoli, G., Angelini, E., & Vallini, G. (2016). Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. *Microbiological research*, 183, 42-52.
2. Ariyawansa Hiran A., Maharachchikumbura Sajeewa S. N., Karunarathne Samantha C., Chukeatirote Ekachai, Bahkali Ali H., Kang Ji-Chuan, Bhat Jayarama D. and Kevin D. Hyde. (2013). *Deniquelata barringtoniae* gen. et sp. nov., associated with leaf spots of *Barringtonia asiatica*. *Phytotaxa* 105 (1): 11–20. doi 10.11646/phytotaxa.105.1.2.
3. Armbruster CE and Mobley HLT (2012) Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nat Rev Microbiol* 10(11):743–754.
4. Barthakur M and Bezbaruah B (1999) Plant beneficial effect of two strains of *Proteus vulgaris* isolated from tea plantations. *India J Exp Biol* 37:919–924.
5. Berg G, (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84: 11e18.
6. Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C. and Fontaine, F. (2012). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62(2), 243–265. doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x.
7. Billah M and Bano A. (2015). Role of plant growth promoting rhizobacteria in modulating the efficiency of poultry litter composting

with rock phosphate and its effect on growth and yield of wheat. *Waste Manag Res* 33(1):63–72.

8. de Boer, W. D., Folman, L. B., Summerbell, R. C., and Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 795-811.
9. Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J. P., Guerin-Dubrana, L., & Rey, P. (2014). Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. *PloS one*, 9(5), e95928.
10. Bruez, E., Haidar, R., Alou, M. T., Vallance, J., Bertsch, C., Mazet, F. ... and Rey, P. (2015). Bacteria in a wood fungal disease: characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. *Frontiers in microbiology*, 6:1137.
11. Bulgari D, Casati P, Crepaldi P, Daffonchio D, Quaglino F, *et al.* (2011). Restructuring of endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. plants. *Appl Environ Microbiol* 77: 5018–5022.
12. Campisano, A., Antonielli, L., Pancher, M., Yousaf, S., Pindo, M., Pertot, I., *et al.* (2014). Bacterial endophytic communities in the grapevine depend on pest management. *PLoS ONE* 9:e112763.doi:10.1371/journal.pone.0112763.
13. Chalupová, J., Sedlářová, M., Helmel, M., Řehulka, P., Marchetti-Deschmann, M., Allmaier, G., & Šebela, M. (2012). MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(8), 978-986.

14. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., and Ait Barka, E. (2005). Use of growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4951–4959. doi:10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005.

15. Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H., & Sessitsch, A. (2011). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial ecology*, 62(1), 188-197.

16. COMTRADE, United Nations (2016). http://www.agriexchange.apeda.gov.in/product_profile/Major_Exporting_Countries.aspx?categorycode=0205.

17. Crous, P. W. and Gams, W. (2006). «*Phaeomoniella chlamydospora*» Gen. et Comb. Nov., a Causal Organism of Petri Grapevine Decline and Esca. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), 112-118.

18. Crous, P. W., Gams, W., Wingfield, M. J., & Van Wyk, P. S. (1996). *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia*, 786-796.

19. Drzewiecka D and Sidorczyk Z (2005) Characterization of *Proteus penneri* species – human opportunistic pathogens. *Post Mikrobiol* 44:113–126.

20. Drzewiecka Dominika. (2016). Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microb Ecol.* DOI 10.1007/s00248-015-0720-6.

21. Favilla Mara, Pascale Michelangelo, Ricelli Alessandra, Evidente Antonio, Amalfitano Carmine, and Claudio Altomare. (2008). Inhibition

of species of the *Aspergillus* section Nigri and Ochratoxin a production in grapes by Fusapyrone. Applied and Environmental Microbiology. 74(7), 2248–225. doi:10.1128/AEM.01998-07.

22. Fischer M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). Mycological Progress, 1(3), 315-324.
23. Fischer M. and H. Kassemeyer. (2003). Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. Vitis. 42(3), 109–116.
24. Fischer M. (2006). Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. Phytopathologia Mediterranea 45, 30–42.
25. Fontaine, F., Pinto, C., Vallet, J., Clément, C., Gomes, A. C., and Spagnolo, A. (2015). The effects of grapevine trunk diseases (GTDs) on vine physiology. European Journal of Plant Pathology, 144(4), 707-721.
26. Haidar R., Deschamps A., Roudet J., Calvo-Garrido C., Bruez E., Rey P. and Fermaud M. (2016). Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine. Biological Control. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.003>.
27. Hardoim, P.R., vanOverbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., *et al.* (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 79, 293–320. doi:10.1128/MMBR.00050-14.
28. Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, Kashon ML, Slaven JE, Janotka E, *et al.* (2008). Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted

laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rapid Commun Mass Spectrom*; 22: 2555–60.

29. Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., & Gindro, K. (2012). What if Esca disease of grapevine were not a fungal disease?. *Fungal Diversity*, 54(1), 51-67.
30. Islam F, Yasmeen T, Riaz M, Arif MS, Ali S, Raza SH (2014) *Proteus mirabilis* alleviates zinc toxicity by preventing oxidative stress in maize (*Zea mays*) plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 110: 143–152.
31. Kakalíková L., Jankura E. and A. Šrobárová. (2009). First report of *Alternaria* bunch rot of grapevines in Slovakia. *Australasian Plant Disease Notes*. 4, 68–69. doi 10.1071/DN09029.
32. Kallow W, Santos I, Erhard M, Serra R, Venâncio A, Lima N. (2006) In: MeyerW, Pearce C, editors. *Aspergillus ibericus*: a new species of section Nigri characterised by MALDI-TOF MS. 8th International Mycological Congress, Cairns, Australia (Proceedings Book). Pianoro (BO). Italy: MEDIMOND. p. 189–93.
33. Karagöz Kenan, Ates Fadime, Karagöz Halit, Kotan Recep, Çakmakç Ramazan. (2012). Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of grapevine grown in alkaline and acidic soils. *European Journal of Soil Biology*. 50, 144-150.
34. Karthikeyan V, Patharajam S, Palani P, Spadaro D, Gullino ML and Garibaldi A. (2010). A modified simple protocol for efficient fungal DNA extraction Highly Suitable for PCR based Molecular Methods. *Global Journal of Molecular Sciences*. 5(1): p. 37-42.
35. Kohler J., Caravaca F., Carrasco L. and A. Roldán. (2007). Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a

- phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Applied Soil Ecology*. 35, 480–487. doi:10.1016/j.apsoil.2006.10.006.
36. Król Ewa. (2006). Fungi inhabiting decaying grapevine (*Vitis* spp.) cuttings. *Journal of Plant Protection Research*. 46(4).
 37. Leveau, J. H., & Preston, G. M. (2008). Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial–fungal interaction. *New Phytologist*, 177(4), 859-876.
 38. Liu H., Du Z., Wang J., Yang R. (2007). A universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1899–1907. DOI: 10.1128/AEM.02391-06.
 39. Logrieco A., Moretti A., Perrone G., Mulè G. (2007). Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with *Fusarium* ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grape. *International Journal of Food Microbiology* 119 11–16. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.020.
 40. Long, H. H., Schmidt, D. D., & Baldwin, I. T. (2008). Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS One*, 3(7), e2702.
 41. Lorenzini M. and G. Zapparoli. (2014). Characterization and pathogenicity of *Alternaria* spp. strains associated with grape bunch rot during post-harvest withering. *International Journal of Food Microbiology*. 186, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.008>.
 42. Mancini, V., Dapporto, L., Baracchi, D., Luchi, N., Turillazzi, S., & Capretti, P. (2013). Phenotypic characterization of cryptic *Diplodia*

species by MALDI-TOF MS and the bias of mycelium age. *Forest Pathology*, 43(6), 455-461.

43. Manos J and Belas R. (2006). The genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes* (3rd edn.) Springer pp. 245-269, DOI: 10.1007/0-387-30746-x_12.
44. Martins, G., Lauga, B., Miot-Sertier, C., Mercier, A., Lonvaud, A., Soulas, M. L. & Masneuf-Pomarède, I. (2013). Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations. *Plos one*, 8(8), e73013.
45. Mikušová Petra, Sulyok Michael and Antónia Šrobárová. (2014). *Alternaria* mycotoxins associated with grape berries in vitro and in situ. *Biologia*. 69/2: 173—177. DOI: 10.2478/s11756-013-0306-z.
46. Mondello V. Lo Piccolo S., Conigliaro G., Alfonzo A., Torta L. and Burrano S. (2013). First report of *Neofusicoccum vitifusiforme* and presence of other Botryosphaeriaceae species associated with Botryosphaeria dieback of grapevine in Sicily (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* (2013) 52, 2, 388–396.
47. Müller, T., & Ruppel, S. (2014). Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS microbiology ecology*, 87(1), 2-17. DOI: 10.1111/1365-3113.12763.
48. Nigro, F., Ippolito, A., Schena, L., Pentimene, I., and Logorio, A. (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharv. Biol. Tec.* 30:209-220.

49. Nisiotou A, Rantsiou K, Iliopoulos V, Cocolin L, Nychas G. (2011). Bacterial species associated with sound and *Botrytis*-infected grapes from a Greek vineyard. *Int J Food Microbiol* 145: 432–436.
50. Palencia Edwin R., Hinton Dorothy M. and Charles W. Bacon. (2010). The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. *Toxins*. 2, 399-416. doi:10.3390/toxins2040399.
51. Pasquali M, Giraud F, Lasserre JP, Planchon S, Hoffmann L, *et al.* (2010) Toxin induction and protein extraction from *Fusarium* spp. cultures for proteomic studies. *J Vis Exp*.
52. Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & Gomes, A. C. (2014). Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS One*, 9(1), e85622.
53. Pinto C. and A. C. Gomes. (2016). *Vitis vinifera* microbiome: from basic research to technological development. *BioControl*. DOI 10.1007/s10526-016-9725-4.
54. Ponsone María Lorena, Chiotta María Laura, Combina Mariana, Dalcerro Ana and Chulze Sofía. (2011). Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section Nigri in grapes. *International Journal of Food Microbiology*. 151, 70–77. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.005.
55. Quast C Pruesse E Yilmaz P Gerken J Schweer T Yarza P Peplies J Glöckner FO. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 41 : D590 – D596.

56. Rappaz F. (1984). Les espèces sanctionnées du genre *Eutypa* (Diatrypaeae, Ascomycetes). Etude taxonomique et nomenclaturale. *Mycotaxon* 20:567–586.

57. Rashid S, Charles T C, Glick B R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*. 61 217-224.

58. Rau N, Mishra V, Sharma M, DasMK, Ahaluwalia K, Sharma RS. (2009). Evaluation of functional diversity in Rhizobacterial taxa of a wild grass (*Saccharum ravennae*) colonizing abandoned fly ash dumps in Delhi urban ecosystem. *Soil Biol Biochem* 41:813–821

59. Rezgui, A., Ghnaya-Chakroun, A. B., Vallance, J., Bruez, E., Hajlaoui, M. R., Sadfi-Zouaoui, N., & Rey, P. (2016). Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards. *Biological Control*, 99, 28-37.

60. Rodríguez-Gálvez, E., Maldonado, E., and Alves, A. (2014). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European journal of plant pathology*, 141(3), 477-489.

61. Romero SM, Comerio RM, Larumbe G, Ritieni A, Vaamonde G, Fernández Pinto V. (2005). Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 104 43–49. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.001.

62. Salas-Marina M. A., Silva-Flores M. A., Cervantes-Badillo M. G., Rosales-Saavedra M. T., Islas-Osuna M. A. and S. Casas-Flores. (2011). The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(7), 686–696. doi: 10.4014/jmb.1101.01012.

63. Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F., and Droby, S. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharv. Biol. Tec.* 17:189-199.
64. Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., and Ippolito, A. (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharv. Biol. Tec.* 30:209-220.
65. Schulz B, Römmert K, Dammann U, Aust H, Strack D (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycol Res* 103: 1275–1283.
66. Seyfarth, F., Ziemer, M., Sayer, H. G., Burmester, A., Erhard, M., Welker, M., ... & Hipler, U. C. (2008). The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. *Experimental dermatology*, 17(11), 965-971.
67. Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), 2856-2860.
68. Sulc, M., Peslova, K., Zabka, M., Hajduch, M., & Havlicek, V. (2009). Biomarkers of *Aspergillus* spores: strain typing and protein identification. *International Journal of Mass Spectrometry*, 280(1), 162-168.
69. Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagianti S, Aziz A (2008) Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environ Exper Bot* 64: 21–32.

70. Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome*.
71. Úrbez-Torres, J. R. and Gubler W. D. (2009). Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *The American Phytopathological Society*, 93(6). doi:10.1094/PDIS-93-6-0584.
72. Úrbez-Torres, J. R., Haag, P., Bowen, P., & O’Gorman, D. T. (2014). Grapevine trunk diseases in British Columbia: incidence and characterization of the fungal pathogens associated with esca and petri diseases of grapevine. *Plant Disease*, 98(4), 469–482. doi:10.1094/pdis-05-13-0523-re.
73. West E.R., Cother E.J., Steel C.C., and G.J. Ash. (2010). The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Can. J. Microbiol.* 56: 209–216.
74. Whipps JM, (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487e511.
75. White Chana-Lee, Halleen Francois, Fischer Michael and Lizel Mostert. (2011). Characterization of the fungi associated with esca diseased grapevines in South Africa. *Phytopathol. Mediterr.* (2011) 50, 204–223.
76. Worden A. (2009). A CTAB method for DNA extraction in bacteria *Micromonas*.
77. Xu, Zhou, Espinosa-Artiles,P., Tang,Y., Zhan,J. and Molnar,I. (2014). Insights into the biosynthesis of 12-membered resorcylic acid lactones from heterologous production in *Saccharomyces cerevisiae* *ACS Chem. Biol.* 9 (5), 1119-1127.

78. Yu S-M and Lee YH. (2013). Plant growth promoting rhizobacterium *Proteus vulgaris* JBLS202 stimulates the seedling growth of Chinese cabbage through indole emission. *Plant Soil* 370:485–495.
79. Zorraonandia, I., Owens, S.M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., *et al.* (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *mBio* 6, e2527-14. doi:10.1128/mBio.02527-14.
80. Zhao Shuang, Liu Dongyang, Ling Ning, Chen Fadi, Fang Weimin and Shen Qirong. (2014). Bio-organic fertilizer application significantly reduces the *Fusarium oxysporum* population and alters the composition of fungi communities of watermelon *Fusarium* wilt rhizosphere soil. *Biol Fertil Soils*. DOI 10.1007/s00374-014-0898-7.

7. ANEXOS Y APÉNDICE

ANEXO 1. Mapa de la zona de muestreo



Fig. 8. Zona de muestreo. A) El estudio se llevó a cabo en cuatro puntos dentro de los viñedos de la empresa ECOSAC AGRICOLA SAC (1200 ha) ubicada en el centro poblado de Chapairá, distrito de Castilla, departamento de Piura ($5^{\circ}07'06.6''$ LS y $80^{\circ}35'52.3''$ LO). B) Síntomas de GTD fueron detectados en todas las zonas muestreadas.

ANEXO 2. A continuación se muestran resultados anexos obtenidos durante el desarrollo de esta tesis y que serán material para una publicación adicional.

Identificación y caracterización por MALDI-TOF/TOF y MS IMAGING de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus* sp. contra el patógeno del tronco de la vid *Lasiodiplodia theobromae*.

M. Saucedo-Bazalar^{1,2}; P. Masías²; G. León³; P. Duarte³; I. Fournier⁴; M. Salzet⁴; P. Dorresteins⁵; V. Cedeño² y E. Mialhe².

¹Maestría en Biotecnología Molecular, UNTumbes - CONCYTEC, Perú.

²INCA BIOTEC SAC, Perú.

³ECOSAC AGRICOLA, Perú.

⁴Laboratorio PRISM, Universidad de Lille, Francia.

⁵Laboratorio Dorresteins, Universidad de California, San Diego, USA.

RESUMEN

Algunas especies del género *Bacillus* son potentes agentes de control biológico que producen una amplia gama de lipopéptidos para la inhibición del crecimiento fúngico. Una cepa de *Bacillus* sp. M1 endófito, aislada del tejido interno del tronco de la vid ha mostrado un eficiente control *in vitro* sobre *Lasiodiplodia theobromae*, un hongo patógeno relacionado a las enfermedades del tronco de la vid. El presente estudio, fue dirigido para identificar y caracterizar por espectrometría de doble masa MALDI-TOF/TOF, los lipopéptidos responsables del control biológico de *L. theobromae* por *Bacillus* sp. M1 a partir de pruebas de antagonismo conducidas en medio líquido. Se logró identificar secuencias de aminoácido correspondientes a Bacisubin, una proteína con carácter antifúngico. Pruebas de antagonismo enfrentando ambos microorganismos sobre medio sólido, fueron conducidas para realizar análisis de espectrometría de masas de imágenes (MSI). Por MSI fue posible relacionar espectros de masas de lipopéptidos de Fengyncin (1463.80 m/z), Bacilysin (271.1 m/z), Mycobacillin (1529.69 m/z) e isoformas de Iturin (1043.48 m/z, 1057.49 m/z, 1071.51 m/z). Los genes de biosíntesis de los lipopéptidos fueron confirmados mediante amplificación por PCR. La identificación de lipopéptidos antifúngicos mediante un enfoque metabolómico, podría llevar a prospectivas de control biológico mediante productos, los cuales podrían tener utilidad a gran escala en la prevención de enfermedades fúngicas de la vid y otros cultivos de importancia económica en el Perú.

Palabras clave: Vid, GTD, *Bacillus* sp. M1, *L. theobromae*, lipopéptidos antifúngicos, espectrometría de masas MALDI TOF/TOF, MS IMAGING.

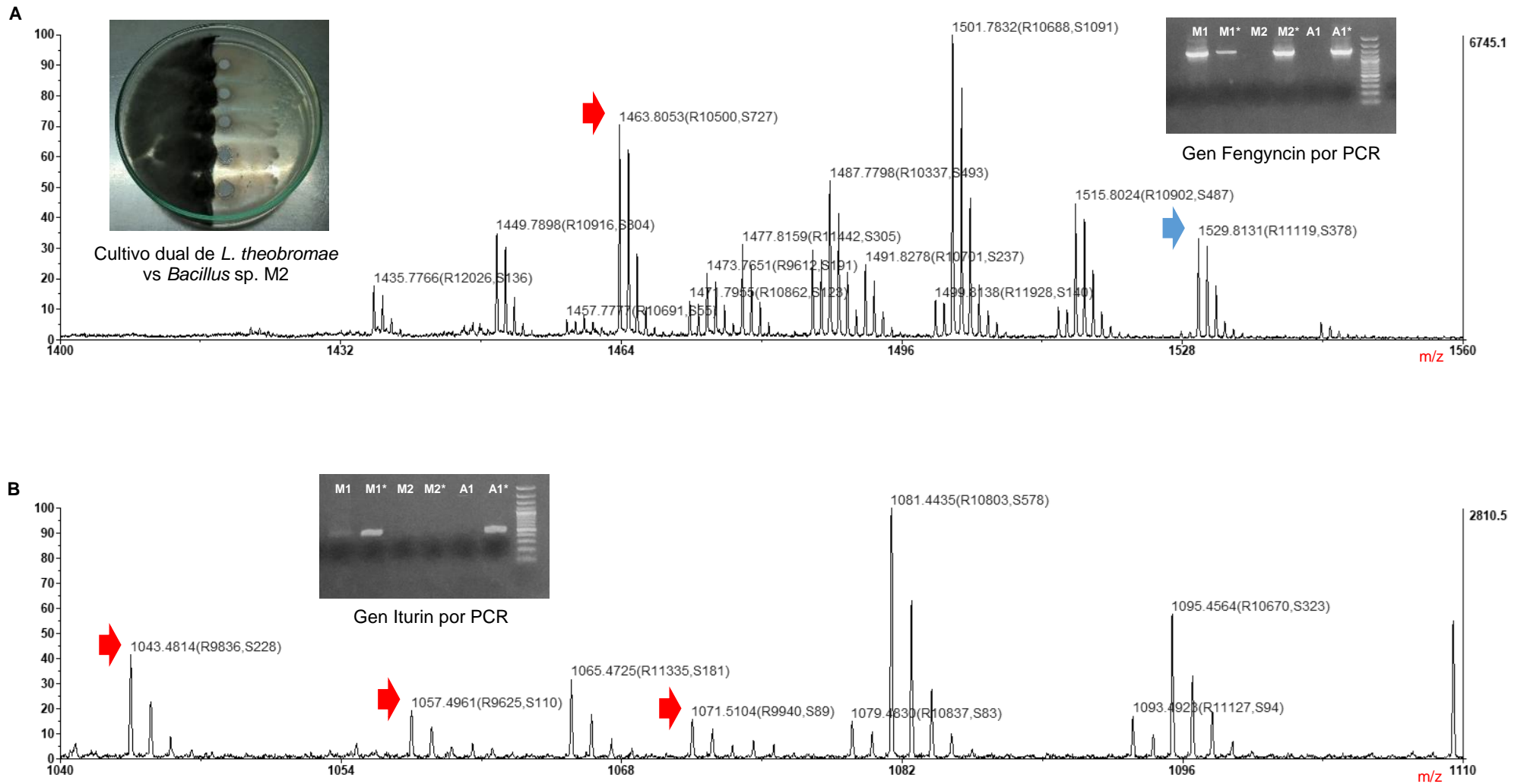


Fig. 9. Espectros de masas representando picos para lipopéptidos antifúngicos. A) Picos 1463.8053 (m/z) y 1529.831 (m/z) representan la m/z correspondiente a los lipopéptidos antifúngicos Fengycin y Mycobacillin respectivamente. B) Flechas rojas representan masas de isoformas de Iturin de *Bacillus* sp. cepa M1.

DEDICATORIA

*A mi madre Socorro, a mis hermanos Deyvi
y Stefany, y a la memoria de mis abuelos
Félix y Margarita.*

“¿No es una molécula de ADN garantía de la inmortalidad? Ella es -le decía a Descharnes poco antes de morir- la célula monárquica por excelencia. Cada una de las dos mitades está exactamente unida a la otra, de la misma manera que Gala estaba unida a mí... todo se abre y se cierra y se interrelaciona con precisión. La herencia depende de un mecanismo soberano, y la vida es el producto del papel absoluto del ácido desoxirribonucleico”

Salvador Dalí

AGRADECIMIENTOS

A CIENCIACTIVA de CONCYTEC por el apoyo en la beca de maestría en biotecnología molecular y por el financiamiento que permitió la movilización y exposición de los resultados de esta tesis en el 10th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases en la Université de Reims Champagne-Ardenne, Francia.

A la Universidad Nacional de Tumbes por el desarrollo de la maestría en biotecnología molecular, en particular al Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, Dr. Carlos Deza Navarrete y Dr. David Saldarriaga Yacila.

A los integrantes del equipo científico y técnico de la empresa en biotecnología molecular INCABIOTEC SAC, en especial a Eric Mialhe, Virna Cedeño, Emmerik Motte, Juan Quimi, César Santos, Pedro Masías, Petter Baca, Carlos Condemarín y Gandhi Morales quienes apoyaron este trabajo de investigación durante su desarrollo.

A Gustavo León y Paulo Duarte de la empresa ECOSAC AGRÍCOLA SAC, por proporcionar las autorizaciones para los muestreos.

A los profesores Isabelle Fournier y Michel Salzet del laboratorio PRISM de la Universidad de Lille, Francia, y al profesor Pieter Dorrestein del laboratorio Dorrestein de la Universidad de California, San Diego, USA, por su apoyo en las metodologías de espectrometría de masas.

A mis amigos de trabajo Erick Suárez, Juana Machuca, Anghi Chaves, Stalyn Córdova, Jean Silva, Aimi Nouchi, José Gonzáles, Margarita Paredes, Rosita Chang, Roxana Rodríguez y a todas las personas que estuvieron involucradas en este trabajo, mis más sincero agradecimiento.