

# **DETECCIÓN TEMPRANA DE ORGANISMOS CAUSANTES DE LAS ENFERMEDADES DEL TRONCO DE LA VID**

## **Proyecto FPTA-237 Detección temprana de organismos causantes de las enfermedades del tronco de la vid**

**Directora del Proyecto: Sandra Lupo**

**Equipo de Trabajo:** Ing. Agr., Dr. Eduardo Abreo<sup>1</sup>  
Ing. Agr., Sebastian Martínez<sup>2</sup>  
Lic. Fernando Navarrete<sup>1</sup>  
Dra. Lina Bettucci<sup>1</sup>  
Dra. Sandra Lupo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias, UDELAR.

\*Correo electrónico: slupo@fing.edu.uy

<sup>2</sup>INIA Treinta y Tres.

**Título:** DETECCIÓN TEMPRANA DE ORGANISMOS CAUSANTES DE LAS ENFERMEDADES DEL TRONCO DE LA VID

**Directora de Proyecto:** Sandra Lupo

**Equipo de Trabajo:** Ing. Agr., Dr. Eduardo Abreo<sup>1</sup>  
Ing. Agr. Sebastian Martínez<sup>2</sup>  
Lic. Fernando Navarrete<sup>1</sup>  
Dra. Lina Bettucci<sup>1</sup>  
Dra. Sandra Lupo<sup>1\*</sup>

**Serie:** FPTA N° 44

© 2013, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia del Tecnología del INIA

Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay  
<http://www.inia.org.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

# Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

## Integración de la Junta Directiva

**Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel** - Presidente

**D.M.T.V., PhD. José Luis Repetto** - Vicepresidente



**D.M.V. Álvaro Bentancur**

**D.M.V., MSc. Pablo Zerbino**



**Ing. Agr. Joaquín Mangado**

**Ing. Agr. Pablo Gorriti**





## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 40/00 del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.

b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.

c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.



# CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN .....	9
Enfermedad de Petri.....	9
Esca .....	9
Brazo muerto: botryosphaeria y eutypa die-back .....	10
Pie negro .....	11
Objetivos del proyecto .....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
Cuantificación de síntomas externos .....	11
Obtención de muestras de plantas con síntomas externos .....	12
Obtención de muestras de plantas sin síntomas externos .....	12
Obtención de aislamientos fúngicos .....	12
Identificación de las especies .....	12
Análisis de los datos .....	13
Evaluación de métodos de extracción de ADN de madera, de cebadores específicos ya existentes y diseño de nuevos cebadores .....	14
RESULTADOS .....	15
Descripción de los síntomas en campo.....	15
Incidencia de la enfermedad.....	16
Aislamiento e Identificación de los hongos endófitos y asociados a síntomas.....	17
Relación entre los síntomas, cultivares, regiones vitícolas y los géneros de hongos .....	23
Caracterización de los síntomas según géneros.....	23
Caracterización de cultivares según géneros que contienen especies patógenas.....	24
Caracterización de regiones según géneros de hongos que contienen especies patógenas .....	24
Hongos asociados a material de vivero .....	25
Hongos aislados de plantines .....	25
Especificidad de cebadores .....	27
DISCUSIÓN .....	27
CONCLUSIONES GENERALES .....	29
AGRADECIMIENTOS .....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	29



Eduardo Abreo<sup>1</sup>  
Sebastián Martínez<sup>2</sup>  
Fernando Navarrete<sup>1</sup>  
Lina Bettucci<sup>1</sup>  
Sandra Lupo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias.

<sup>2</sup>INIA Treinta y Tres .

# DETECCIÓN TEMPRANA DE ORGANISMOS CAUSANTES DE LAS ENFERMEDADES DEL TRONCO DE LA VID

Proyecto FPTA 237

Período de Ejecución: Nov. 2006-Dic. 2008

## INTRODUCCIÓN

La reproducción de la vid por medio de órganos vegetativos leñosos conlleva la transmisión de hongos endófitos, patógenos débiles y patógenos en estado latente que no son diagnosticados, ni son objeto de los sistemas de certificación actualmente en práctica. Sin embargo, plantas de vid en bloques productores desarrollan enfermedades del tronco cuyo origen de dispersión puede ser el material reproductivo contaminado. Entre ellas, se cuentan la enfermedad de Petri, esca, pie negro y brazo muerto (Mugnai *et al.*, 1999).

Estas enfermedades atacan el viñedo en distintos momentos. Las enfermedades de Petri y pie negro se manifiestan en los primeros años causando la pérdida de vigor y la muerte de la planta mientras que el brazo muerto y la esca aparecen en el viñedo adulto, causando podredumbres de los brazos y troncos de la planta de vid.

### Enfermedad de Petri

Esta enfermedad afecta principalmente plantas de entre 1 y 5 años de edad. Los síntomas externos incluyen crecimiento atrofiado, marchitamiento y posible muerte. No se producen síntomas en las hojas, mientras que en la madera, se observan puntos o estrías ennegrecidas y la producción de una goma negra que se observa en el corte transversal del tronco luego de algunos minutos. Las

plantas muestran una clásica coloración de los vasos del xilema que es el resultado de tilosis, gomas y compuestos fenólicos formados dentro de los vasos por el hospedero como reacción al hongo creciendo dentro y alrededor del xilema. La severidad es mayor en plantines injertados que en estacas auto-enraizadas. *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* son los hongos más comúnmente aislados y se cree que son los principales agentes causales (Crous y Gams, 2000; Mugnai *et al.*, 1999). Otras especies de *Phaeoacremonium* y otros patógenos como *Cadophora luteo-olivacea* han sido también implicadas en la enfermedad de Petri (Halleen *et al.*, 2007, Navarrete *et al.*, 2011). Recientemente, se ha propuesto el uso del término Phaeotracheomicosis para designar las distintas sintomatologías causadas por este grupo de hongos (Surico, 2009).

En Uruguay, estudios preliminares sobre los organismos asociados a la enfermedad de Petri permitieron identificar a *Pa. chlamydospora* como uno de los organismos asociados al declinamiento de plantas de *Vitis vinifera* cv. Tannat, Cabernet Sauvignon, Merlot, Sirah, Chardonnay y Sauvignon Blanc, y de los portainjertos SO4, 3309C y 101-14 de menos de 7 años de edad (Marroni y Abreo 2005).

### Esca

Los organismos causales son los mismos que en la enfermedad de Petri, pero

en plantas adultas se los encuentra asociados a Basidiomycetes generalmente Hymenochaetales, tales como *Fomitiporia punctata* e *Inocutis jamaicensis*, que producen la pudrición blanca de textura esponjosa típica de la esca (Fischer, 2006).

Una sintomatología semejante, denominada hoja de malvón, fue descrita por Gatica *et al.* (2000, 2001) en Argentina y está asociada a *Inocutis jamaicensis* (Lupo *et al.*, 2006). La esca produce síntomas foliares como vegetación reducida y hojas atigradas que toman una coloración rojiza o amarilla dependiendo de que los cultivares sean tintos o blancos respectivamente. La fisiología de los carbohidratos se ve afectada, con reducción en la acumulación de reservas, el vigor y el rendimiento, afectando finalmente la longevidad de la planta (Petit *et al.*, 2006).

### **Brazo muerto: botryosphaeria y eutypa die-back**

La eutipiosis o eutypa die-back es causada por el hongo *Eutypa lata*. Esta enfermedad puede causar la muerte de parte o de la totalidad de una planta de vid, produciendo reducciones significativas en el rendimiento del viñedo (Munkvold *et al.*, 1994). Este hongo también se encuentra en las plantas que sufren esca, donde actúa como pionero (Larignon y Dubois, 1997) cuando penetra a través de las heridas producidas por la poda para colonizar el tejido vascular de los cordones y del tronco. Sin embargo, el micelio no se encuentra en las varas del año o el follaje de las plantas infectadas. El patógeno induce en la madera una necrosis en forma de "V", libera enzimas implicadas en la degradación de varios componentes de la pared celular y también metabolitos que son transportados hacia las hojas. Es una enfermedad crónica que se desarrolla muy lentamente y presenta síntomas altamente variables, lo que hace que el diagnóstico en campo sea muy difícil (Moller y Kasimatis, 1978). Los primeros síntomas externos de la enfermedad aparecen tres a diez años después de la infección. Los síntomas foliares consisten principalmente de la inhibición del crecimiento de los entrenudos y del desarrollo de las hojas en las

que se observan cambios en la forma, clorosis y necrosis marginal. La muerte del cordón, o de la planta entera, puede producirse varios años después de la aparición de los síntomas (Rudelle *et al.*, 2005).

Después de la pérdida del ritidoma en la zona donde se produjo el cancro, el hongo produce numerosas peritecios con ascosporas infecciosas (Carter, 1988). En medio de cultivo, *Eutypa lata* produce estructuras de reproducción asexual de manera lenta y errática y casi nunca la forma de reproducción sexual.

*Eutypella vitis* ha sido aislada de plantas con eutipiosis y su patogenicidad ha sido demostrada en varas de vid (Jordan y Schilder 2005) mientras que otros autores la consideraron poco virulenta (Úrbez-Torrez *et al.*, 2009).

Por otra parte, las especies de *Botryosphaeriaceae* han sido aisladas con gran frecuencia de tejidos vegetales de plantas que exhiben síntomas similares. Esta forma del brazo muerto ha sido consecuentemente definida como cancro de botryosphaeria (bot. canker) o también brazo negro muerto (black dead arm) y más recientemente botryosphaeria die-back (Úrbez-Torres, 2011). Es conocido que especies de este grupo pueden ser patógenas, saprofitas o endófitas de angiospermas y gimnospermas (Denman *et al.*, 2000), siendo controvertida su participación como patógenos en el brazo muerto de la vid (Gubler 2005). Los anamorfos de las especies de *Botryosphaeriaceae* son actualmente atribuidos a los géneros *Fusicoccum*, *Neofusicoccum*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia* y *Dothiorella* (Crous y Palm 1999, Denman *et al.*, 2000, Phillips *et al.*, 2005). Recientemente, se ha demostrado la patogenicidad de aislamientos de todas estas especies en plantas de vid de distintas variedades y en diferentes regiones, aunque la virulencia varió entre especies (Úrbez-Torres y Gubler, 2009). Estos estudios mostraron que las especies de *Botryosphaeriaceae* son patógenos de la vid más importantes de lo que originalmente se pensaba, y que en consideración a las variaciones en la virulencia, es de fundamental importancia poder distinguir las especies de manera de conocer el riesgo de ocurrencia de cancos.

## Pie negro

El pie negro de la vid es una enfermedad presente en viñedos en todas las regiones productoras de uva del mundo. Esta enfermedad afecta plantas jóvenes y adultas. (Halleen *et al.*, 2006a). Los síntomas principales de la enfermedad son vasos oscurecidos e inclusiones de goma en los vasos del xilema de los portainjertos afectados. Las plantas enfermas muestran poco vigor, troncos pequeños, entrenudos cortos, reducción en el follaje total y tamaño de las hojas, con hojas que presentan clorosis internerval y necrosis (Scheck *et al.*, 1998). Al comienzo de la primavera las plantas adultas, no desarrollan brotes o estos alcanzan poco desarrollo y finalmente mueren en mitad del verano (Halleen *et al.*, 2006a). Varias especies de *Cylindrocarpon* y *Campylocarpon*, presentes frecuentemente en el suelo, han sido asociadas al pie negro de la vid (Halleen *et al.*, 2004, 2006b).

La manera en que los hongos causantes de las enfermedades del tronco de la vid contaminan el material de propagación no es claro. Se especula que podrían infectar las varas de los portainjertos sistémicamente a partir de plantas madre de portainjerto infectadas o infectar las heridas producidas durante el proceso de vivero. El aislamiento repetido de *Pa. chlamydospora* y varias especies de *Phaeoacremonium* de plantas jóvenes injertadas, portainjertos y troncos de plantas asintomáticos sugiere que estos hongos pueden existir también como endófitos (Fourie y Halleen, 2002). Estos autores sugirieron que se deben desarrollar y validar métodos de detección más sensibles con el propósito de evaluar la eficacia de las medidas de erradicación de los mismos del material de propagación y establecer su estatus fitosanitario.

En la actualidad, el diagnóstico de estas enfermedades en Uruguay se basa en la observación de los síntomas presentes en el campo varios años después del inicio de la infección original y cuando otras plantas -aún asintomáticas- pueden estar ya infectadas. La forma encubierta en que se encuentran estas enfermedades impide no solamente su detección sino incluso la realización de trata-

mientos preventivos. La falta de una herramienta de diagnóstico precoz lleva así a la aceptación de costos por pérdida de plantas, e impone restricciones a la vida útil de los viñedos, limitando el desarrollo de métodos de control.

Los métodos microbiológicos de identificación consumen mucho tiempo y pueden producir falsos negativos cuando los niveles de infección son bajos. El uso de cebadores específicos fue eficiente para identificar *Pa. chlamydospora* a partir de micelio, en plantines, madera infectada y suelo (Tegli *et al.*, 2000, Ridgway *et al.*, 2002, Whiteman *et al.*, 2002). De forma similar, Aroca *et al.* (2008) diseñaron cebadores específicos para aislamientos de *Phaeoacremonium* spp. en España con la finalidad de detectar en forma temprana la presencia de estas especies.

## Objetivos del proyecto

### Objetivo general

Disponer de métodos de diagnóstico rápido de los principales hongos causantes de las enfermedades del tronco de la vid en Uruguay

### Objetivos específicos

- 1) Determinar la incidencia de las enfermedades del tronco de la vid en el Uruguay.
- 2) Conocer la diversidad de especies asociadas a las enfermedades del tronco de la vid en Uruguay.
- 3) Evaluar cebadores ya existentes y/o diseñar nuevos cebadores específicos para los hongos que son objeto de este estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cuantificación de síntomas externos

Se realizó un relevamiento de plantas de vid con los síntomas externos antes descritos en todas las regiones vitícolas del país. Se relevaron los síntomas de esca, brazo muerto y enfermedad de Petri. Los síntomas de pie negro, que

externamente pueden ser confundidos con la enfermedad de Petri o Esca, no fueron considerados. Se contaron entre 300 y 600 plantas ubicadas en filas en los distintos viñedos y las filas fueron elegidas al azar.

### Obtención de muestras de plantas con síntomas externos

Se realizó el muestreo de plantas de vid con síntomas externos de las enfermedades del tronco de la vid en viñedos localizados en los departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, Rivera, Tacuarembó, Durazno, Colonia, San José, Canelones, Montevideo y Maldonado (Figura 1). El muestreo fue más intenso en aquellos departamentos donde existe mayor superficie de viñedo, en particular en Canelones. En el caso de la enfermedad de Petri, cada muestra consistió en una sección del tronco que se extiende 10 cm por arriba y por debajo de la unión del injerto; en las plantas con esca y brazo muerto, la muestra consistió en una sección del tronco que contuviese la podredumbre. En el caso del pie negro el muestreo se circunscribió a los departamentos de Canelones, Montevideo, Colonia y Maldonado, y cada muestra consistió de secciones de raíces obtenidas del suelo próximo al cuello de la planta.



Figura 1. Localización de los sitios de muestreo.

### Obtención de muestras de plantas sin síntomas externos

En vivero, se muestrearon varas del año de Tannat, Moscatel de Hamburgo, Sauvignon Blanc, SO4 y Paulsen en condiciones de ser injertadas, así como plantines enraizados de Tannat, Petit Verdot, Merlot, Cabernet Franc injertados en SO4 y 3309C que no presentaban síntomas.

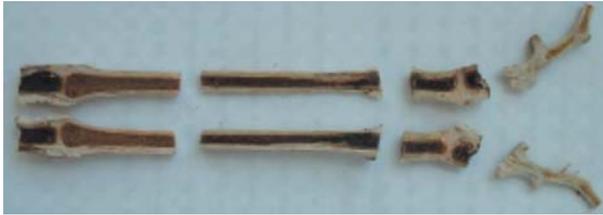
### Obtención de aislamientos fúngicos

Las muestras fueron descortezadas y lavadas bajo agua corriente. Posteriormente fueron desinfectadas superficialmente mediante inmersión durante un minuto en alcohol 80%, 4 minutos en hipoclorito de sodio 4%, y finalmente enjuagadas en agua estéril y secadas sobre papel estéril. La muestra desinfectada fue abierta longitudinalmente con una tijera previamente esterilizada por calor, y se tomaron segmentos de xilema ennegrecido de 3 x 1 mm. Diez segmentos de cada muestra fueron sembrados en placas de Petri conteniendo medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar) acidificado con ácido láctico (pH 4,5). Las placas fueron cultivadas a 25 °C durante cuatro semanas para permitir la emergencia de los hongos buscados. Los segmentos que no mostraron crecimiento inicial fueron transferidos a otras placas con el mismo medio de cultivo para que no fuesen contaminados por hongos de rápido crecimiento.

En el material de vivero, se tomaron segmentos de 4 cm de largo del xilema a distintas alturas desde las raíces hasta el brote, que fueron desinfectados superficialmente (Figura 2). A partir de cada segmento se obtuvieron 10 fragmentos de 2 x 2 mm (80 por plantín) de un total de 37 plantines.

### Identificación de las especies

La caracterización morfológica de las especies se realizó a partir de cultivos en medio PDA. En el caso de algunos géneros, se llevó a cabo el cultivo en otros medios y en condiciones diferenciales para permitir el desarrollo de caracteres fenotípicos que pudiesen ser usados para



**Figura 2.** Plantín descortezado y fraccionado para la obtención de segmentos.

la identificación de las especies. Los aislamientos de *Phaeoacremonium* fueron cultivados en placas conteniendo extracto de agar-malta al 2 % (MEA) a 25 y 37 °C. Los aislamientos de *Botryosphaeriaceae* fueron cultivados en agar agua (2%) con acículas de pinos con el fin de facilitar la producción de conidios y estructuras reproductivas (Samson *et al.*, 1995). Se observó y registró la producción de pigmentos en PDA.

#### **Extracción de ADN de cultivos puros**

Los aislamientos fueron cultivados hasta que las colonias alcanzaron al menos 20 mm de diámetro. El micelio fue colectado con bisturí estéril, y el ADN fue extraído y purificado de acuerdo al protocolo de Lee y Taylor (1990).

#### **Amplificación de ADN con cebadores generales de hongos**

El ADN de los aislamientos puros fue amplificado mediante PCR con cebadores generales ITS4 e ITS5 que amplifican la totalidad de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal. En aislamientos del género *Phaeoacremonium* se amplificó parte del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina con los cebadores T1 y  $\beta$ t2b. En aislamientos del género *Greeneria* se amplificó una parte de la región LSU del ADN ribosomal con los cebadores LR0R y LR7 (Cuadro 1).

La reacción de amplificación se realizó en 25  $\mu$ l de volumen final, en las condiciones indicadas por los autores. Los productos de amplificación fueron

visualizados en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, bajo luz ultravioleta y secuenciados por Macrogen (Seul, Corea del Sur). Se secuenciaron las dos hebras de ADN y ambas secuencias fueron alineadas y corregidas manualmente utilizando el programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). Se seleccionaron secuencias del GenBank mediante el algoritmo Blast ([www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)) y se utilizaron para el análisis filogenético de las cepas propias.

#### **Análisis filogenético**

El análisis filogenético por el método de máxima parsimonia fue realizado mediante el programa PAUP4 -Phylogenetic Analysis Using Parsimony (Swofford 2003). Se incluyeron secuencias corregidas de los aislamientos propios, secuencias de las cepas tipo y otras cepas relacionadas obtenidas del GenBank cuyos códigos de identificación se encuentran indicados en los árboles filogenéticos producidos.

#### **Análisis de los datos**

La frecuencia de aparición de las especies aisladas de la madera mostrando distintos síntomas y provenientes de distintas regiones del país fue evaluada mediante un análisis de correspondencia.

Se contabilizó un aislamiento de cada especie patógena o potencialmente patógena identificada por planta sintomática. Las especies se agruparon por géne-

**Cuadro 1.** Secuencia de los cebadores y tamaño esperado de los productos de amplificación

Cebadores	Secuencia	pb	Referencia
ITS 4/ ITS 5	5'-tcctccgcttattgatatgc-3'/5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3'	600	White <i>et al.</i> , 1990
T1 / $\beta$ t2b	5'-aacatgcgtgagattgtaagt-3'/5'-accctcagtgtagtacccttggc-3'	600	O' Donnell y Cigelnik 1997, Glass y Donalson, 1995
LR0R / LR7	5'-accgcgctgaacttaagc-3'/5'-tactaccaccaagatct-3'	1300	Vilgalys y Hester 1990

ros. Se generaron matrices de la abundancia de los géneros en relación con los síntomas, cultivares y regiones, del tipo sitio-especie. A partir de éstas, se formularon matrices con la densidad relativa de cada género en relación al total de aislamientos ( $d_r = \text{núm. de aislamientos de un género} / \text{núm. total de aislamientos}$ ) a partir de las cuales se realizaron los análisis de correspondencia. Para el ordenamiento de síntomas, cultivares y regiones se usó el análisis de correspondencia del programa PAST (Hammer *et al.*, 2001).

En la matriz géneros-cultivares, los cultivares de portainjertos de los que se desconoce su identidad fueron agrupados y considerados genéricamente en la categoría "Portainjertos"; los cultivares de *V. vinifera* sub-representados en el total con respecto a Cabernet Sauvignon, que fue el más ampliamente muestreado y analizado, fueron agrupados en la categoría "Otros cultivares".

El análisis de la relación entre síntomas y regiones (Departamentos) se realizó en base a una matriz de géneros-regiones que excluyó las regiones y géneros submuestreados.

El análisis de la relación entre síntomas externos y cultivares de *V. vinifera* se realizó en base al registro de síntomas en los distintos cultivares. Debido a que el número de plantas relevado varió entre cultivares, se crearon tablas en base 100 a partir de la cual se generó la matriz de frecuencia relativa de síntomas externos que se analizó mediante análisis de correspondencia.

### **Evaluación de métodos de extracción de ADN de madera, de cebadores específicos ya existentes y diseño de nuevos cebadores**

#### **Extracción y amplificación directa a partir de material vegetal**

La extracción de ADN a partir de material vegetal se realizó utilizando el kit Axyprep Multisource Genomic DNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Axygen, CA, USA).

#### **Evaluación de especificidad de cebadores en ADN de cultivos puros**

Se evaluó la especificidad de cebadores disponibles para *Pa. chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp. e *I. jamaicensis* en ADN de estas especies purificado a partir de aislamientos locales, y en ADN de un conjunto de hongos que fueron encontrados en estrecha asociación en los tejidos sintomáticos. En el caso de los cebadores Pal1N/Pal2 se llevó a cabo un PCR en gradiente de temperatura debido a que no se registró amplificación a la temperatura de hibridación indicadas. El tamaño esperado de los productos de amplificación se presenta en el cuadro 2. La especificidad de los cebadores se evaluó en todos los aislamientos de *Phaeoacremonium* (37), en 13 de *Phaeoconiella* y en otras especies de hongos presentes en vid, *N. parvum*, *Cadophora melinii*, *Greeneria uvicola*, *Inocutis jamaicensis*, *Alternaria alternata*, *Campylocarpon pseudofasciculare*, *Phomopsis viticola*, *Phomopsis* sp1. y *Phomopsis* sp2.

#### **Evaluación de especificidad de cebadores en ADN total de madera enferma**

Los cebadores seleccionados Pmo1f/Pmo2r para *Pa. chlamydospora* y Pac1f/Pac2r y F2bt/R1bt para *Phaeoacremonium* spp. fueron usados para amplificar ADN obtenido de la madera de plantas con síntomas de la enfermedad de Petri. Se removió la corteza de las muestras de sarmientos de un año tomadas de plantas con síntomas externos correspondientes a la enfermedad. Posteriormente, se realizó una desinfección superficial como se describió anteriormente y luego con un bisturí estéril se generaron pequeños fragmentos de xilema a partir de los cuales se obtuvo ADN usando el kit Axyprep Multisource Genomic DNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Axygen, CA, USA). Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa para confirmar la presencia de bandas de los tamaños esperados. Se secuenciaron las bandas del tamaño esperado con el fin de confirmar mediante el análisis de secuencia que el producto de PCR correspondiese a la especie objetivo.

**Cuadro 2.** Cebadores específicos, secuencia y tamaño de los productos de amplificación esperados

Cebadores	Región del ADN	Secuencia	pb	Referencia
Pal1N/Pal2	ITS	5'-aggtcgggggccaac-3'/5'-aggtgtaaactactgcgc-3'	400	Tegli <i>et al.</i> , 2000
Pac1f/Pac2r	ITS	5'-acccttgtgaacatacctg-3'/5'-tactgcgctcggagtcctg-3'	420	Overton <i>et al.</i> , 2004
F2bt/R1bt	β-tubulina	5'-vagcttcgacrwccctcgacg-3'/5'-gctacttacrcaytgrccggctcg-32	115	Aroca <i>et al.</i> , 2008
Pch1/Pch2	ITS	5'-ctccaacccttgtttatc-3'/5'-tgaaagttgatatggacc-3'	360	Tegli <i>et al.</i> , 2000
Pmo1f/Pmo2r	ITS	5'-gttacatgtgacgtctgaacg-3'/5'-cagtgatgcttgattgctcg-3'	320	Overton <i>et al.</i> , 2004
INO1/INO7	ITS	5'-gttcactggctcggaggaaa -3'/5'-caaaccgacctagctccta-3'	111	Perez <i>et al.</i> , 2003

### Diseño de cebadores

Se diseñó un par de cebadores específicos para *Cadophora luteo-olivacea* a partir de la secuencia de la región ITS. Para ello se utilizó el programa Primer3. Se le asignaron los siguientes parámetros: tamaño de los cebadores entre 20 y 22 nucleótidos, TM 60 °C, porcentaje de GC entre 50 y 60 . El programa identificó 4 pares de cebadores con esas características y con cuyas secuencias se realizó una búsqueda mediante el algoritmo Blast ([www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)) en la base de datos GenBank. Sólomente un par fue seleccionado para su posterior evaluación en madera.

## RESULTADOS

### Descripción de los síntomas en campo

En el caso de la enfermedad de Petri, las plantas sintomáticas fueron identificadas en cuadros de vid recientemente implantados, integrados por plantas jóvenes menores de 3 años mayoritaria-

mente sanas con abundante desarrollo vegetativo (Figura 3 a). Entre éstas, se constató la presencia de plantas con escaso desarrollo foliar (Figura 3 b), con puntos oscuros en el corte transversal del tronco, característicos de la enfermedad de Petri (Figura 3 c).

Las plantas de vid con esca crónica se identificaron en cuadros en producción. Estas plantas adultas presentaban escaso desarrollo foliar (Figura 4 a) y en el corte transversal del tronco se observó una podredumbre con coloraciones blanca, amarilla y parda, de textura blanda y límites irregulares (Figura 4 b). Las plantas con esca aguda (apoplejía) se identificaron por el colapso del follaje y la existencia de rebrotes tardíos en las partes sanas del tronco (Figura 4 c). En algunos casos, se observó la presencia, sobre el tronco afectado, de basidiocarpos producidos por Basidiomycetes (4 d).

Las plantas con brazo muerto fueron identificadas por la presencia de pulgares con yemas que no brotaron (Figura 5 a) que presentaron tejidos internos necrosados (Figura 5 b). En el corte transversal de los brazos y del tronco princi-



**Figura 3.** Síntomas de enfermedad de Petri. a: planta joven sana, b: planta joven enferma, c: puntos castaños y negros que pueden exudar una sustancia gomosa negra.



**Figura 4.** Síntomas externos y signo de la esca. a: esca crónica, b: podredumbre blanca, c: apoplejía, d: basidiocarpio de *Inocutis jamaicensis* (signo) en tronco viejo de vid.



**Figura 5.** Síntomas de brazo muerto. a: pulgar con yemas que no brotan, b: pulgar con tejidos internos necrosado c: necrosis en "V" descendente



**Figura 6.** Síntomas de pie negro. a: retraso y fallas de brotación, b: raíces oscurecidas.

pal, se observó la podredumbre sectorial de color oscuro y consistencia firme en forma de V (Figura 5 c).

Las plantas con pie negro fueron identificadas por el retraso observado en la brotación de las yemas al inicio de la primavera (Figura 6 a) y por la presencia de raíces necrosadas (Figura 6 b).

### Incidencia de la enfermedad

La incidencia de Esca, Petri y brazo muerto mostró gran variación entre los cuadros relevados. Otros factores como

las características de la región y sistema de poda (poda a pulgar/poda a vara) podrían ser los responsables de esa variación (Cuadro 3).

Los cultivares que presentaron los porcentajes más altos del síntoma brazo muerto fueron Cabernet Sauvignon, Marselan, Cabernet Franc y Sauvignon Blanc (Cuadro 3). Estos cultivares están relacionados genéticamente dado que Cabernet Sauvignon y Marselan descienden de Sauvignon Blanc y Cabernet Franc.

Los síntomas de Esca se encontraron en todos los cultivares analizados (Cua-

**Cuadro 3.** Porcentaje de plantas con síntomas según enfermedad y cultivar

	Cabernet Franc	Cabernet Sauvignon	Marselan	Merlot	Sauvignon Blanc	Tannat
Petri	1,9	1,5	0,3	2,7	0,6	4,1
Brazo muerto	4,2	7,8	15,6	0,0	9,1	0,7
Esca	0,2	0,6	0,0	0,0	0,7	0,2
Total de plantas	100	100	100	100	100	100

dro 3) y agrupó síntomas variables que van desde el crecimiento reducido, muerte de brazos y hojas coloreadas hasta la muerte de la planta.

### Caracterización de cultivares según síntomas externos

El análisis de correspondencia muestra que el primer eje es responsable del 91% de la variabilidad total, agrupando por un lado a los cultivares Cabernet Franc, Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon y Marselan, genéticamente emparentados, y por otro a los cultivares Merlot y Tannat (Figura 7). El segundo eje, que resume un 7,8% de la variación, establece un gradiente que separa al Cabernet Franc y al Sauvignon Blanc, del Cabernet Sauvignon y del Marselan.

### Aislamiento e Identificación de los hongos endófitos y asociados a síntomas

#### Identificación morfológica y filogenética de las especies fitopatógenas

Se aislaron e identificaron las siguientes especies patógenas asociadas a las enfermedades del tronco de la vid: *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium australiense*, *Cadophora luteo-olivacea*, *C. melinii*, *Campylocarpon pseudofasciculare*, *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodimum*, *C. olidum* var. *crassum*, *C. pauciseptatum*, *Eutypella vitis*, *Neofusicoccum parvum*, *N. luteum*, *Fusicoccum aesculi* (*B. dothidea*), *Diplodia seriata*, *Greeneria uvicola*, *Inocutis jamaicensis*, *Phomopsis viticola*.

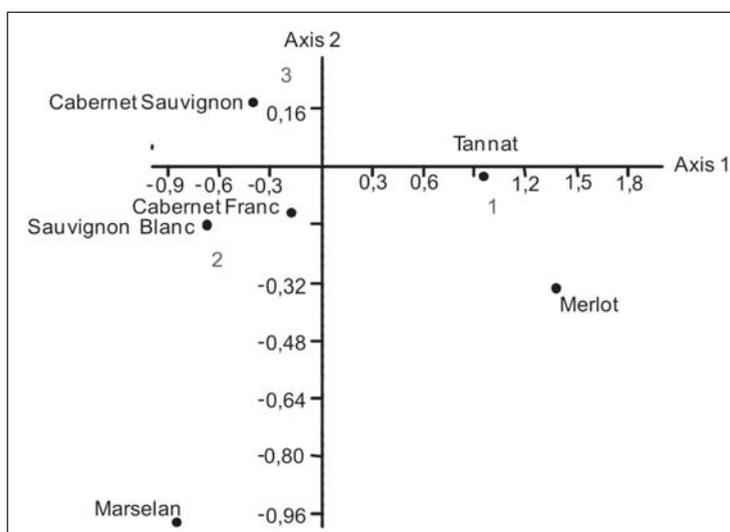
#### *Phaeoconiella chlamydospora*

Se obtuvieron 51 aislamientos de *Pa. chlamydospora* provenientes de todas las regiones muestreadas. Las colonias emergieron tardíamente, diez a quince días después de la siembra, e inicialmente eran blancas volviéndose verde oliva en los días posteriores (Figura 8 a, b). A nivel microscópico, se observaron las células apicales hialinas sobre células basales de pared engrosada, e hifas con abultamientos similares a clamidosporas (8 c, d). Los aislamientos fueron muy semejantes morfológicamente y tuvieron una alta homología (99 a 100 %) en las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal.

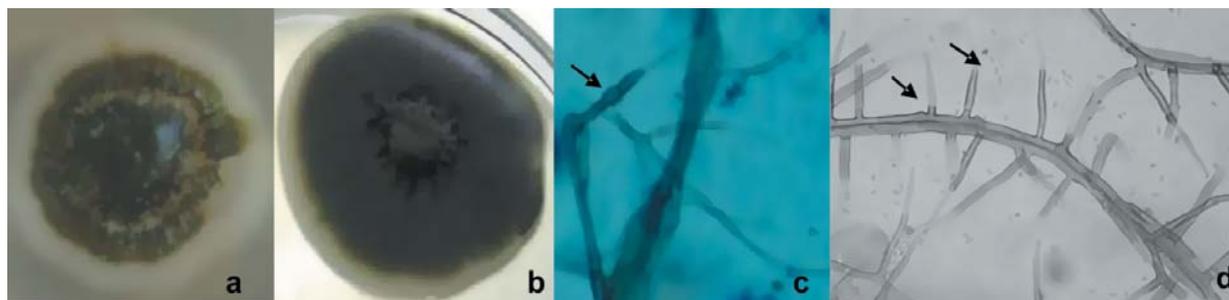
#### *Phaeoacremonium* spp.

Se obtuvieron 33 aislamientos de *Phaeoacremonium* spp.

Mediante el crecimiento a 25 y a 37 °C se establecieron distintos grupos morfo-



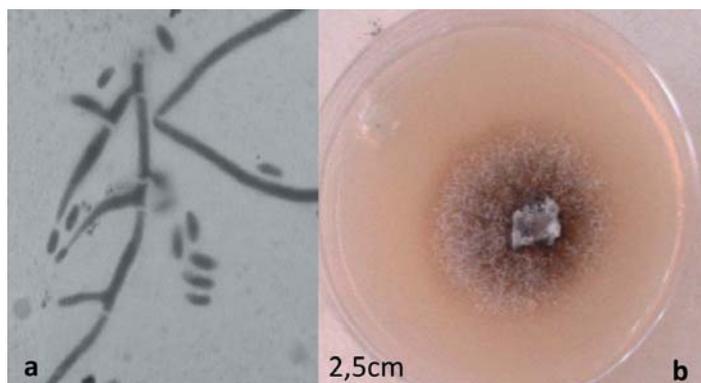
**Figura 7.** Ordenamiento de cultivares de acuerdo a la frecuencia relativa de síntomas externos: 1 Enfermedad de Petri, 2 Brazo muerto, 3 Esca.



**Figura 8.** Micromorfología y aspecto de la colonia de *Phaeoconiella chlamydospora*. a y b : colonia color verde oliva de 2 y 4 semanas de crecimiento respectivamente, c: abultamiento de las hifas, d: fiálides con células apicales hialinas y conidios

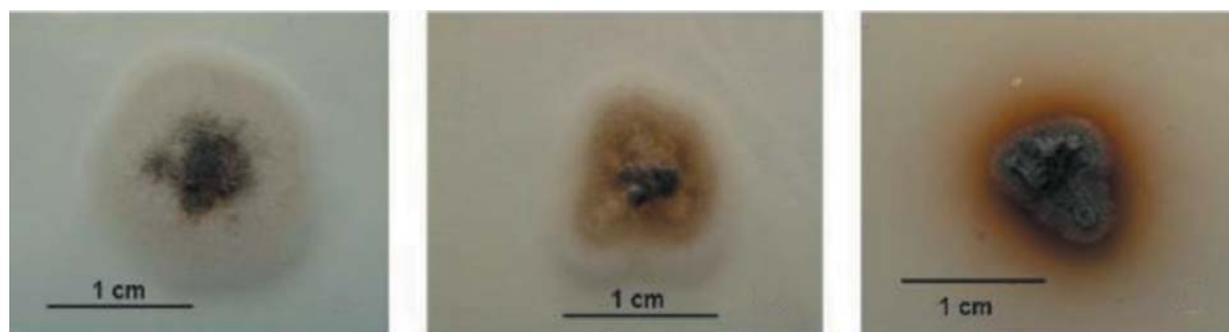
fisiológicos que podrían indicar la existencia de cepas con distintos requerimientos ambientales. A 25 °C se observó que el crecimiento y la morfología de las colonias fue similar en todos los aislamientos de *P. aleophilum* (Figura 9). A 37 °C las cepas capaces de crecer se agruparon de acuerdo a la morfología de la colonia en (I) colonias blancas reverso amarillo a oscuro (V92, V327, V322, V110, V 312, V87); (II) colonias castañas con borde de creci-

miento claro, reverso castaño en el centro (V154, V221); (III) colonias castañas con pigmentos difusibles castaño oscuro, reverso castaño oscuro (V67, V161, V197, V257, V90, V206, V207, V215) (Figura 10); otras cepas no crecieron a 37 °C. La morfología tipo (I) fue obtenida de muestras provenientes de los departamentos de Colonia y Rivera solamente. Las diferencias observadas en su crecimiento a 37 °C son indicativas de diferencias fisiológicas entre ellos.



**Figura 9.** Micromorfología y aspecto de la colonia de *P. aleophilum* en PDA a 25 °C. a: conidiogénesis y conidios, b: colonia castaña de 20 días de crecimiento.

Independientemente de las diferencias morfológicas observadas a 37 °C, todos los aislamientos excepto el V95 presentaron entre sí una alta identidad de secuencia de la región ITS y porcentajes de identidad de entre 100% y 99% con las secuencias de *P. angustius* (AB278178) y *P. aleophilum* (DQ 404355) del GenBank. Una selección de 28 aislamientos de *Phaeoacremonium* representativos de todos los morfotipos, fue usada en un análisis filogenético basado en la secuencia parcial del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina junto a 29 secuencias obtenidas del GenBank. Después del



**Figura 10.** Morfotipos de *P. aleophilum* creciendo a 37° C en medio de cultivo MEA. a: morfología del tipo I, b: morfología del tipo II, c: morfología del tipo III.

alineamiento, 274 sitios fueron parsimoniosamente informativos, 88 fueron variables y parsimoniosamente no informativos, y 237 fueron constantes. El árbol consenso (50% majority rule) es presentado en la Figura 11 (TL = 1045; CI = 0.5933; RI = 0.8365; RC = 0.4963; HI = 0.4541). Veintisiete aislamientos se agruparon con *P. aleophilum* (100% bootstrap) y un aislamiento se agrupó con aislamientos de *P. australiense* (100% bootstrap) obtenidos del GenBank, incluyendo las secuencias de las cepas tipo de ambas especies (indicadas con \*). *P. aleophilum* fue aislado en todas las regiones de Uruguay. *P. australiense* se aisló solamente una vez en el departamento de Colonia.

**Botryosphaeriaceae spp.**

Se obtuvieron 90 aislamientos de *Botryosphaeriaceae*. Morfológicamente se describieron e identificaron cuatro especies de anamorfos *Neofusicoccum parvum*, *N. luteum*, *Fusicoccum aesculi* (*B. dothidea*) y *Diplodia seriata*. La identificación morfológica (Figura 12), fue corroborada mediante el análisis de la secuencia ITS del ADN ribosomal de una selección representativa de las distintas especies (Figura 13). Algunos de los aislamientos fueron nombrados inicialmente como *N. parvum/ribis* porque sus características morfológicas tales como tamaño de los conidios se solapan, y el análisis de la secuencia ITS no discrimina dentro de este complejo.

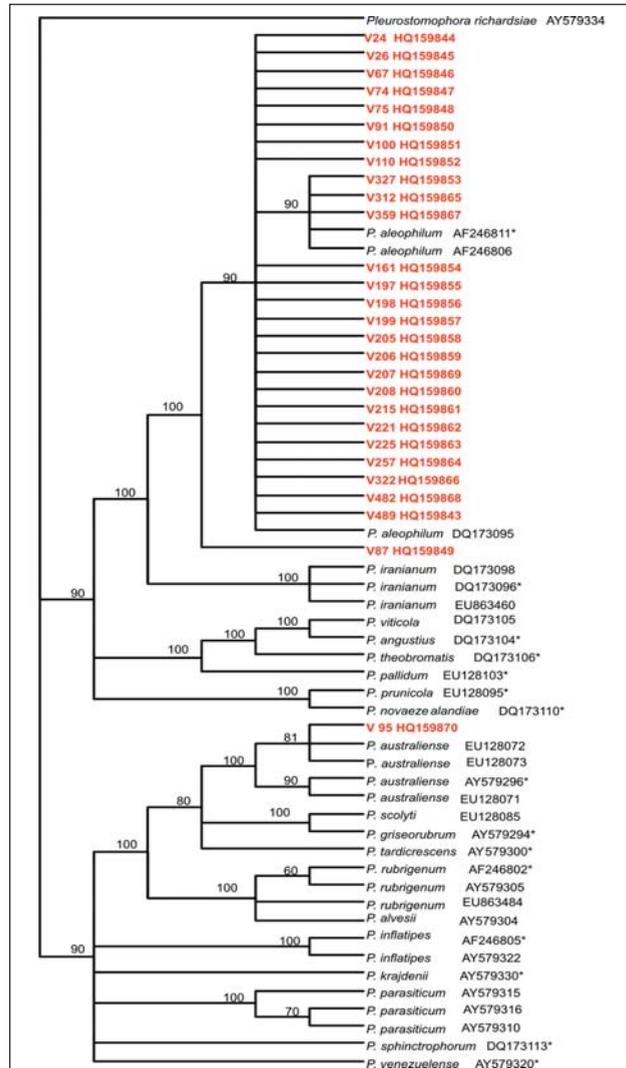


Figura 11. Árbol filogenético a partir de secuencias parciales del gen de la β- tubulina de aislamientos propios de *Phaeoacremonium* spp. (rojo, V) y secuencias del GenBank,

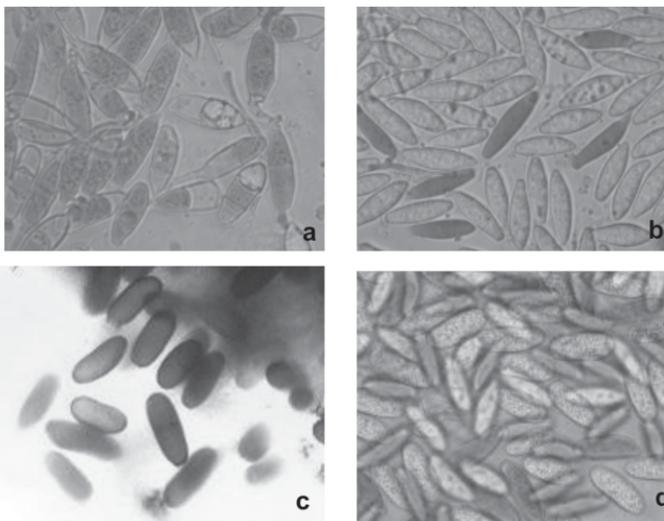
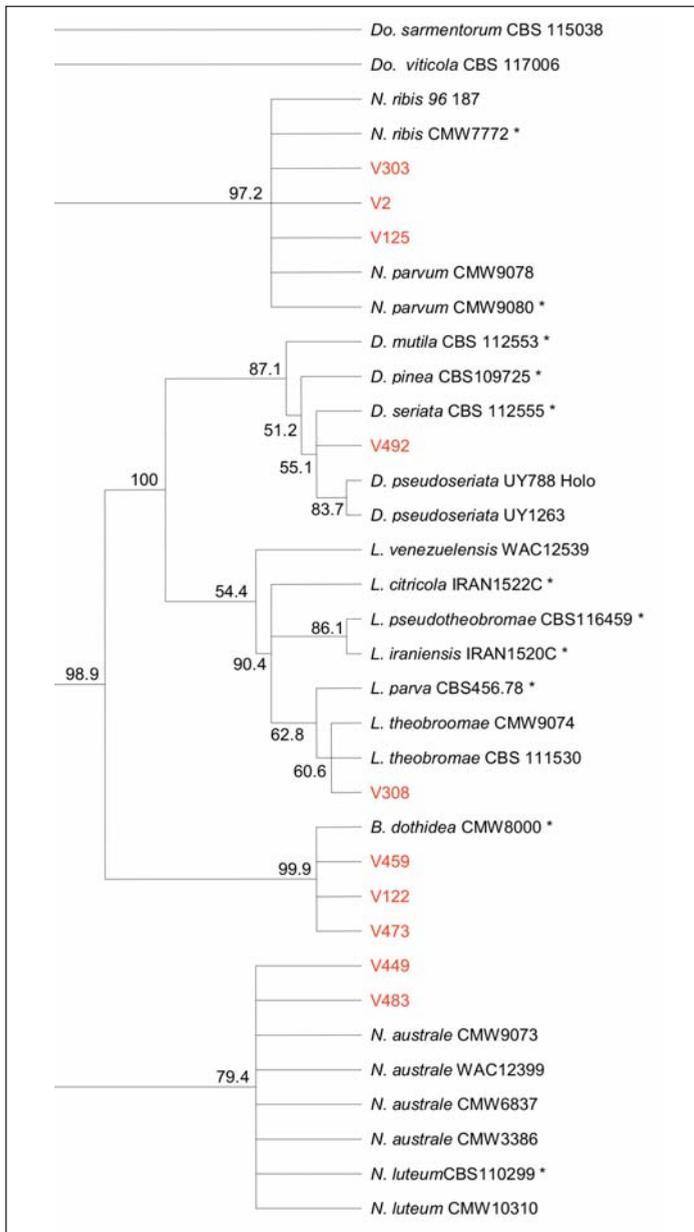


Figura 12. Conidios de las distintas especies de *Botryosphaeriaceae* encontradas en vid.  
 a: *N. parvum/ribis*  
 b: *B. dothidea*  
 c: *Diplodia seriata*  
 d: *N. luteum*



**Figura 13.** Árbol filogenético a partir de secuencias de región ITS de aislamientos propios de *Botryosphaeriaceae* (V rojo) y secuencias del GenBank incluyendo ex-tipo (\*).

### *Cylindrocarpon* spp. y *Campylocarpon pseudofasciculare*

Los aislamientos pertenecientes a los géneros *Campylocarpon* y *Cylindrocarpon* presentaron características micro y macromorfológicas muy variables en cultivo (Figura 14) por lo cual se construyó un árbol filogenético con la secuencia de la región ITS (Figura 15). El alineamiento

se construyó con 57 aislamientos y tres especies de *Fusarium* usadas como taxa externos. De los 537 sitios incluyendo gaps, 217 fueron parsimoniosamente informativos, 76 fueron variables y parsimoniosamente no informativos y 244 fueron constantes. El análisis produjo 260 árboles igualmente parsimoniosos con TL=794, CI=0,616, RI=0,867, HI=0,384. Se muestra el árbol consenso (50% majority rule). Las especies encontradas en portainjertos en Uruguay se agrupan en seis grupos con secuencias del GenBank incluyendo secuencias tipo de cada grupo, a excepción de GU198181 y GU198182 que se agrupan con *C. destructans* var. *crassum* EF607079 que no es la secuencia tipo.

Las especies identificadas fueron *Ca. pseudofasciculare*, *C. liriodendri*, *C. macrodidymum*, *C. olidum* var. *crassum* y *C. pauciseptatum*. Los aislamientos tentativamente identificados como *Cylindrocarpon destructans* podrían en realidad ser otra especie cercana pero diferente de *C. destructans* var. *crassum*.

### *Phomopsis viticola*

En plantas sintomáticas se aisló *P. viticola*, que produjo micelio blanco con picnidios negros (Figura 16 a) y en los cuales sólo se observó la producción de  $\alpha$  conidios (Figura 16 b) típicos de la especie. A partir de material vegetal asintomático, principalmente en viveros, se aislaron otras especies de *Phomopsis*.

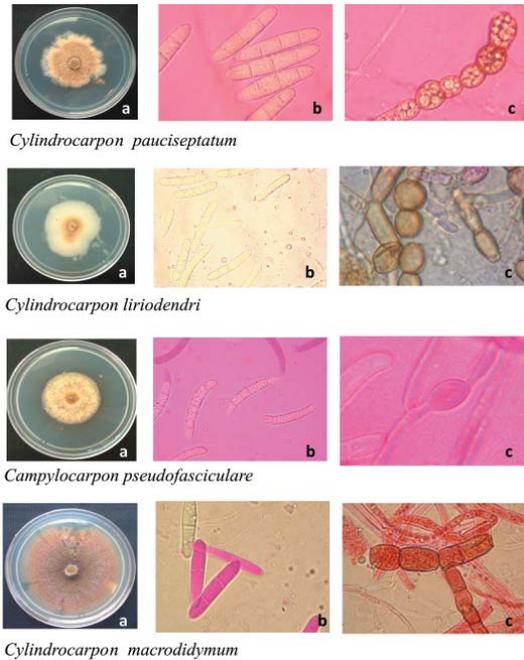
### *Greeneria uvicola*

Se aisló *G. uvicola* asociada al síntoma de brazo muerto. Las colonias inicialmente grises formaban abundantes picnidios (Figura 17 a). Los conidios fueron de color castaño claro y exhibían cicatrices en ambos extremos (Figura 17 b). El análisis filogenético de las secuencias de la región LSU de los aislamientos obtenidos en Uruguay corroboró la identificación morfológica.

### *Cadophora luteo-olivacea* y *C. melinii*

Los aislamientos correspondientes al género *Cadophora* presentaron colonias blancas y gris verdosas (Figura 18 a), con conidióforos ramificados con fiáldes

**Figura 14.** Aspecto de la colonia y micromorfología de las especies de *Cylindrocarpon* y *Campylocarpon*. a: colonia, b: macroconidios, c: clamidosporas.



y collarete visible (Figura 18 b). El análisis filogenético de la region ITS del ADN ribosomal permitió la identificación de las especies *C. luteo-olivacea* y *C. melinii*.

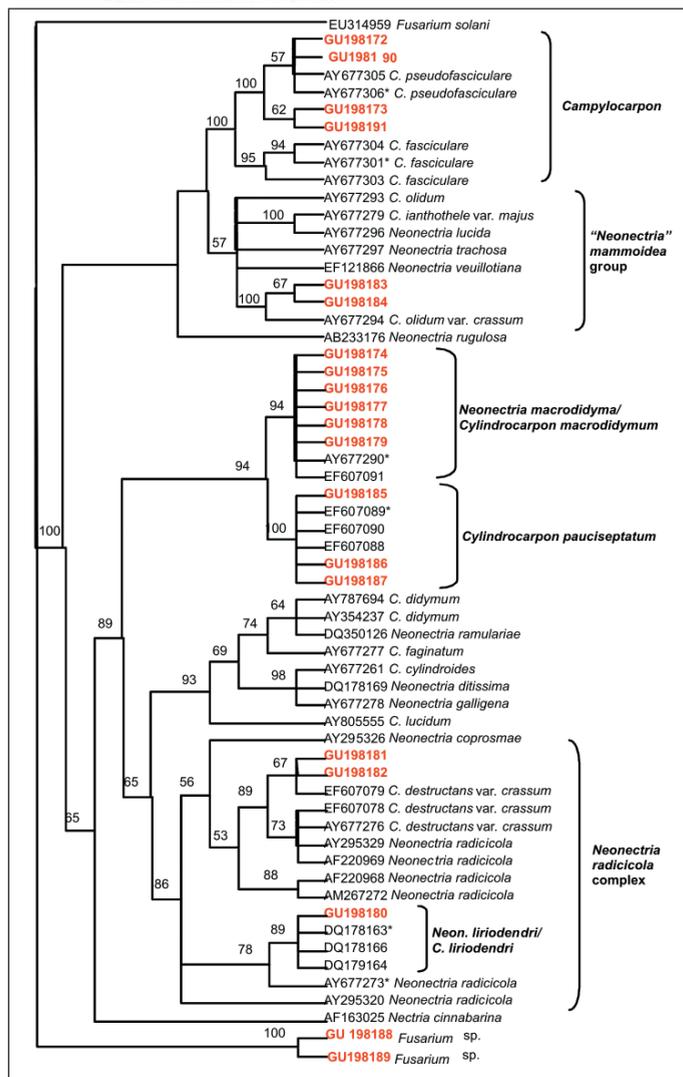
**Eutypella vitis**

Se encontraron sólo dos aislamientos de esta especie asociados al síntoma de brazo muerto en el cv. Cabernet Sauvignon. Las colonias eran inicialmente blancas y se oscurecieron progresivamente formando primero manchones negros aislados que luego se unían cubriendo toda la superficie (Figura 19 a). Se observó la producción de  $\alpha$  y  $\beta$  conidios (Figura 19 b). Las secuencias obtenidas de la región ITS de estos dos aislamientos fueron utilizadas en una búsqueda por homología en la base de datos de nucleótidos del GenBank mediante el algoritmo Blast que permitió confirmar la identificación de los aislamientos.

**I. jamaicensis**

Fue aislado de troncos con podredumbre blanca que caracteriza a la esca completa y también de podredumbres sectoriales en forma de V. Las colonias de color marrón (Figura 20 a) luego de varias semanas produjeron carpóforos (Figura 20 b). Las secuencias de la región ITS permitieron confirmar la identidad de la especie.

**Figura 15.** Árbol filogenético a partir de secuencias de la región ITS de aislamientos de *Cylindrocarpon* y *Campylocarpon* propios (rojo) y secuencias del GenBank incluyendo secuencias ex-tipo (\*).



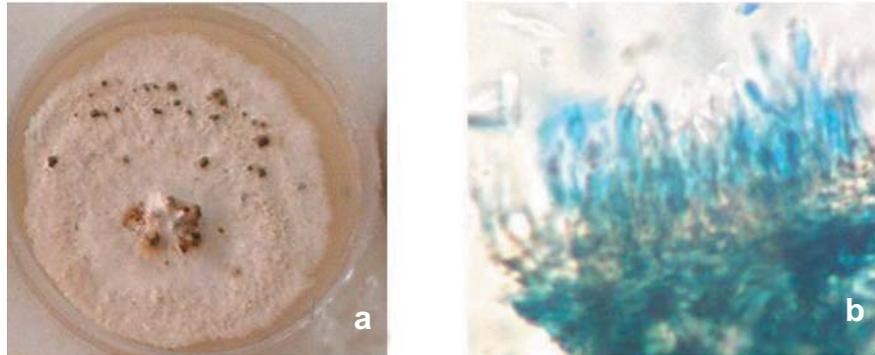


Figura 16. a: colonia y b: conidiogénesis de *P. viticola*.

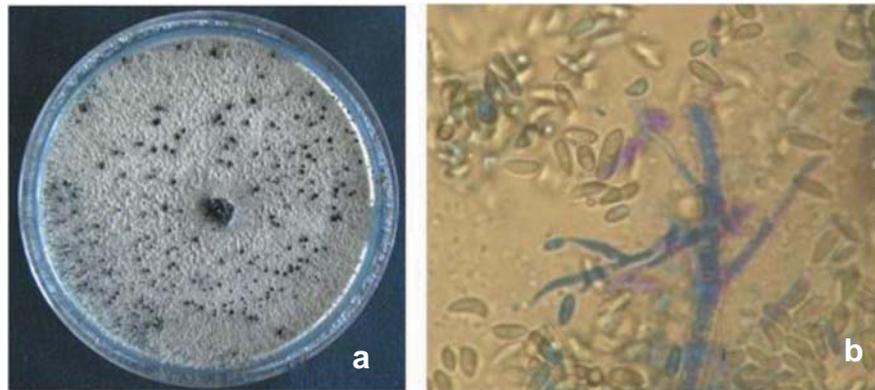


Figura 17. a: Colonia, b: conidiogénesis de *G. uvicola*.

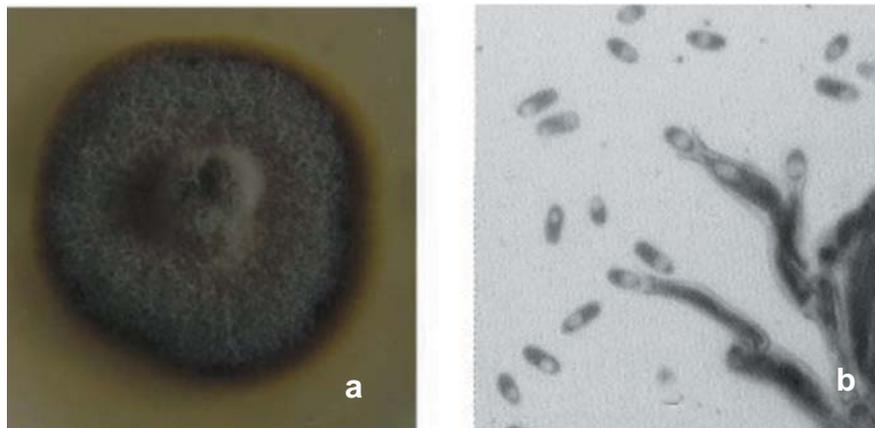


Figura 18. a: colonia; b: conidiogénesis de *C. luteo-olivacea*.

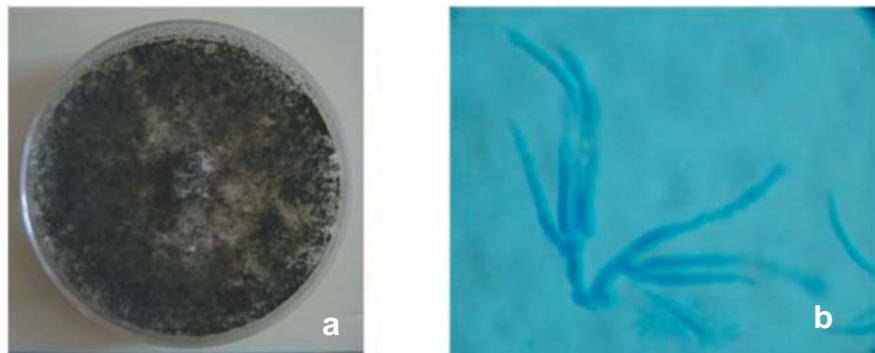


Figura 19. a: Colonia, b: conidiogénesis con formación de  $\beta$ -conidios. *E. vitis*.

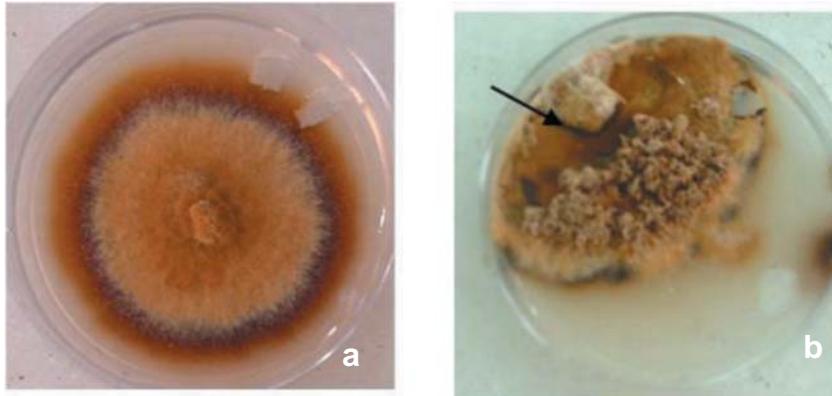


Figura 20. a: Colonia de *I. jamaicensis* de 20 días, b: colonia con formación de carpóforo.

### Relación entre los síntomas, cultivares, regiones vitícolas y los géneros de hongos

#### Caracterización de los síntomas según géneros

El análisis de correspondencia muestra que los dos ejes principales explican respectivamente un 73 % y un 16 % de las diferencias observadas entre síntomas. El primer eje separa claramente el síntoma del pie negro, caracterizado por la presen-

cia de *Cylindrocarpon sensu lato*, del brazo muerto, esca y Petri. El segundo eje establece un gradiente entre estos tres síntomas, ubicando a la esca en una posición intermedia entre el brazo muerto y la enfermedad de Petri (Figura 21). Dentro de ese gradiente, *Eutypella*, *Botryosphaeria* e *Inocutis* caracterizan al brazo muerto, mientras que *P. chlamyospora*, *Phaeoacremonium* y *C. luteo-olivacea* caracterizan a la enfermedad de Petri. *Greeneria*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Acremonium* caracterizan a la esca, que se ubica en una posición intermedia del gradiente.

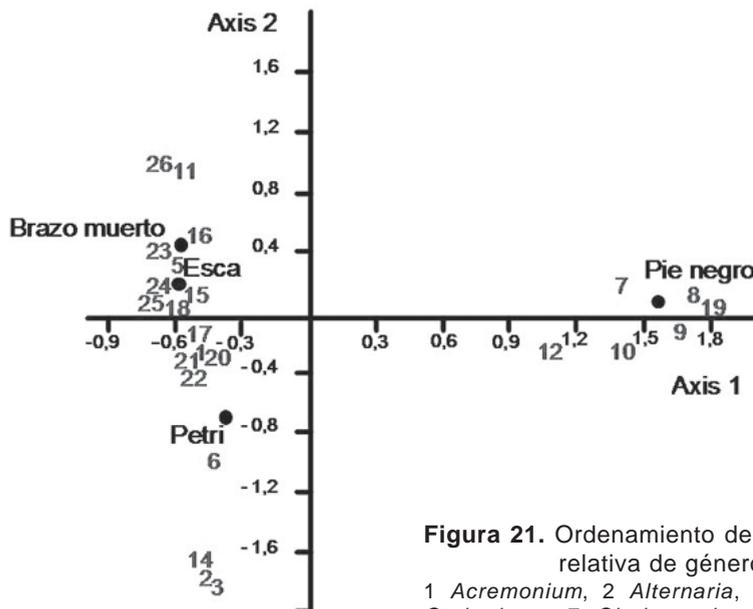
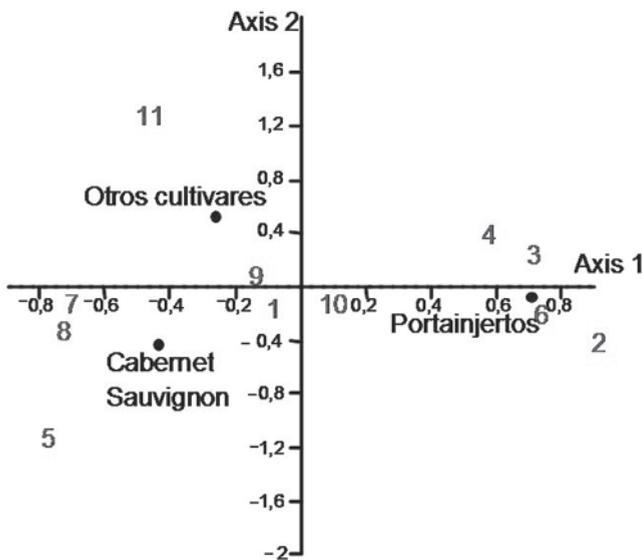


Figura 21. Ordenamiento de síntomas de acuerdo a la frecuencia relativa de géneros.

1 *Acremonium*, 2 *Alternaria*, 3 *Aureobasidium*, 5 *Botryosphaeria*, 6 *Cadophora*, 7 *Cladosporium*, 8 *Crinipellis*, 9 *Cylindrocarpon*, 10 *Eupenicillium*, 11 *Eutypella*, 12 *Fusarium*, 14 *Gliocladium*, 15 *Greeneria*, 16 *Inocutis*, 17 *Microphaeropsis*, 18 *Penicillium*, 19 *Periconia*, 20 *Pestalotiopsis*, 21 *Phaeoacremonium*, 22 *Phaeomoniella*, 23 *Phoma*, 24 *Phomopsis*, 25 *Trichoderma*, 26 *Verticillium*.

**Caracterización de cultivares según géneros que contienen especies patógenas**

El cultivar Cabernet Sauvignon fue objeto de un muestreo más intenso debido a que se encuentra plantado en todas las regiones vitícolas del país y a la alta frecuencia de síntomas observados. El primer eje explica un 62% de la variación y separa a los portainjertos de «otros cultivares» y del Cabernet Sauvignon (Figura 22). El segundo eje explica un 37 % de la variación, casi la totalidad de la variación restante, y separa al Cabernet Sauvignon de «otros cultivares».

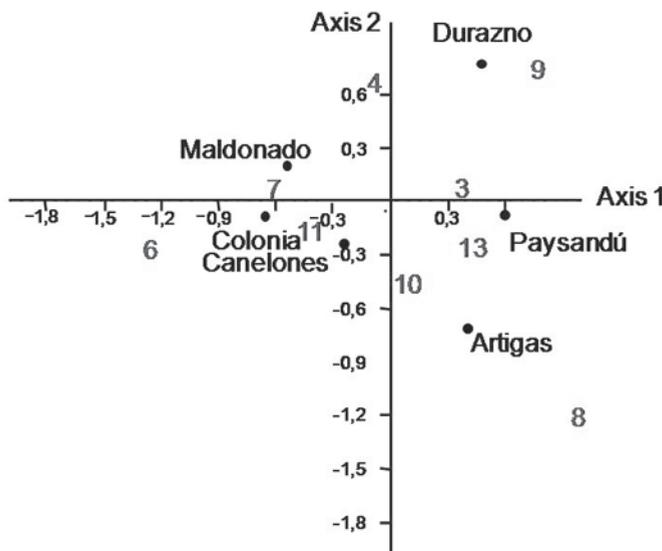


**Caracterización de regiones según géneros de hongos que contienen especies patógenas**

El análisis de correspondencia indica que los dos primeros ejes explican el 64% de la variación. El primer eje (36%) establece un gradiente que separa a Maldonado, Colonia y Montevideo de los departamentos del centro y norte del país (Figura 23). El segundo eje (28%), establece un segundo gradiente que separa a Artigas, Paysandú y Durazno, ocupando Paysandú una posición intermedia.

**Figura 22.** Ordenamiento de cultivares de acuerdo a la frecuencia relativa de géneros que contienen especies patógenas.

- 1 *Botryosphaeria*, 2 *Cadophora*,
- 3 *Cylindrocarpon*, 4 *Eupenicillium*,
- 5 *Eutypella*, 6 *Fusarium*, 7 *Greeneria*,
- 8 *Inocutis*, 9 *Phaeoacremonium*,
- 10 *Phaeomoniella*, 11 *Phomopsis*.



**Figura 23.** Ordenamiento de los sitios de muestreo excluyendo departamentos y géneros submuestreados, de acuerdo a frecuencia relativa de géneros que contienen especies patógenas.

- 3 *Botryosphaeria*, 4 *Cadophora*, 6 *Eutypella*,
- 7 *Fusarium*, 8 *Greeneria*, 9 *Inocutis*,
- 10 *Phaeoacremonium*, 11 *Phaeomoniella*,
- 13 *Phomopsis*

### Hongos asociados a material de vivero

#### Endófitos en varas

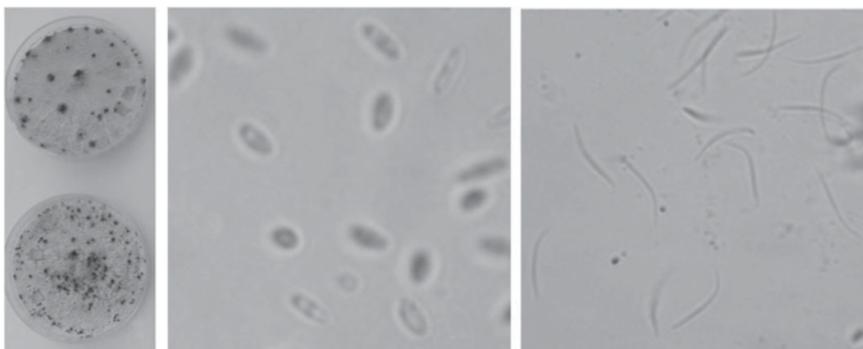
Las especies más frecuentes aisladas como endófitos en varas asintomáticas fueron *Phomopsis* spp. (Figura 24) incluyendo *Phomopsis viticola*, varias especies de *Botryosphaeriaceae* y *Greeneria uvicola* (Cuadro 4). Las especies de *Botryosphaeriaceae* fueron *F. aesculi* (*B. dothidea*), *N. parvum*, *D. seriata*, *N. luteum*.

### Hongos aislados de plantines

*Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum*, fueron aisladas en el 2,7 y 16,2 % de los plantines estudiados respectivamente. *Pa. chlamydospora* fue aislada en la parte basal del portainjerto (SO4) que presentaba estrías negras mientras *P. aleophilum* fue aislado de la zona de unión del injerto tanto en el pie como en la variedad (Cuadro 5).

**Cuadro 4.** Número de aislamientos de las distintas especies de hongos endófitos en varas

	S. Blanc	Moscatel	Tannat	SO4	Paulsen
<i>Acremonium</i> sp.	3	0	0	0	0
<i>Alternaria alternata</i>	16	1	3	4	11
<i>Botryosphaeriaceae</i>	17	22	4	2	2
<i>Colletotrichum acutatum</i>	1	0	0	5	12
<i>Epicoccum purpurascens</i>	4	0	0	3	0
<i>Glomerella cingulata</i>	0	0	1	0	0
<i>Micelio estéril</i>	1	4	0	0	0
<i>Nigrospora sacchari</i>	0	0	0	1	1
<i>Pestalotiopsis guepini</i>	0	0	5	4	0
<i>Phomopsis viticola</i>	0	11	15	5	28
<i>Phomopsis</i> sp. 1	1	3	5	5	13
<i>Phomopsis</i> sp. 2	6	4	0	2	6
<i>Greeneria uvicola</i>	0	2	0	2	11
<i>Podospora</i> sp.	0	0	0	0	1
<i>Sordaria fimicola</i>	0	0	0	0	2



**Figura 24.** *Phomopsis* sp. a: colonias en PDA b:  $\alpha$  conidios c:  $\beta$  conidios

*Cadophora luteo-olivacea* fue aislada en el 38 % de los plantines (Cuadro 5). Esta especie ha sido reportada como patógena con una importancia secundaria, respecto a *Phaeoconiella* y *Phaeoacremonium*, pero capaz de producir necrosis de los vasos en plantines.

Varias especies de *Botryosphaeria*-*ceae*. fueron aisladas en el 51% de los plantines. Estas fueron, *B. dothidea*, *N. parvum*, *N. luteum* y *D. seriata* (Cuadro 5). La mayoría de estas especies fueron las mismas que se encontraron en campo en plantas con síntoma excepto *N.*

*luteum* que fue aislada solo de plantines. Otro patógeno de importancia aislado de plantines fue *Cylindrocarpon* spp. (8%). Este hongo causa pie negro y es el responsable de la muerte de plantines al poco tiempo de transplantados. Las especies de *Alternaria* sp., *Acremonium* sp., *Epicoccum* sp., *Gliocladium roseum*, *Neosartorya* sp. y *Pseudogymnoascus* sp. no son consideradas patógenas. Algunas especies de *Fusarium* son importantes patógenos en otras especies vegetales, sin embargo, se desconoce su importancia en vides en Uruguay.

**Cuadro 5.** Frecuencia de aislamientos de las distintas especies en plantines asintomáticos

ESPECIES	Nº plantas	% de plantas
<i>Acremonium ochraceum</i>	1	2,7
<i>Acremonium</i> spp.	16	43,2
<i>Alternaria</i> spp.	23	62,2
<i>Basidiomycete</i> con fíbulas sp.1	1	2,7
<i>Basidiomycete</i> con fíbulas sp.2	1	2,7
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	6	16,2
<i>Botryosphaeria lutea</i>	4	10,8
<i>Botryosphaeria parva/ribis</i>	2	5,4
<i>Botrytis cinérea</i>	1	2,7
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	13	38
<i>Colletotrichum acutatum</i>	7	18,9
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	5	13,5
<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>	1	2,7
<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>	2	5,4
<i>Diplodia seriata</i>	7	18,9
<i>Epicoccum purpurascens</i>	1	2,7
<i>Fusarium</i> spp.	6	16,2
<i>Gliocladium roseum</i>	7	18,9
<i>Pseudoconythyrium brasiliense</i>	5	13,5
<i>Neosartorya</i> sp.	3	8,1
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	6	16,2
<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	1	2,7
<i>Phomopsis viticola</i>	1	2,7
<i>Phomopsis</i> spp.	2	5,4
<i>Pseudogymnoascus roseus</i>	2	5,4

## Especificidad de cebadores

### Especificidad de cebadores en ADN de cultivos puros

Los cebadores Pac1f/Pac2r y F2bt/R1bt para *P. aleophilum*, Pmo1f/Pmo2r para *Pa. chlamydospora* e INO1/INO7 para *Inocutis jamaicensis* resultaron específicos y produjeron los productos de amplificación esperados cuando fueron usados para amplificar de ADN de cultivos puros (Cuadro 6).

PalN1/Pal2 resultó inespecífico en las condiciones especificadas de PCR y sólo produjo productos de amplificación a temperaturas de hibridación inferiores a las indicadas por sus autores. Pch1/Pch2 resultó inespecífico para *Pa. chlamydospora* en las condiciones especificadas de PCR.

### Especificidad de cebadores en ADN total de madera

Pac1f/Pac2r produjo amplicones de tamaños muy próximos a los esperados, pero las secuencias en algunos casos no pertenecieron al género *Phaeoacremonium* (90% de homología con secuencia de *Chaetosphaeria tulasneorum*

AF178547 y 89% de homología con *Phomopsis viticola* GQ250215), y por lo tanto no fue seleccionado. Por su parte, Pmo1f/Pmo2r y F2bt/R1bt resultaron específicos, produciendo productos de amplificación del tamaño esperado y cuyas secuencias pertenecieron a las especies *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum*, por lo que fueron seleccionados para el diagnóstico temprano de estas especies en sarmientos provenientes de plantas de vid asintomáticas.

## DISCUSIÓN

Se aisló e identificó la mayoría de las especies citadas en asociación con las enfermedades del tronco de la vid: *Pa. chlamydospora*, *P. aleophilum*, *P. australiense*, *F. aesculi*, *N. parvum* / *N. ribis*, *N. luteum*, *D. seriata*, *I. jamaicensis*, *C. luteo-olivacea*, *Cylindrocarpon* spp., *Campylocarpon pseudofasciculare* y *P. viticola*.

*Pa. chlamydospora*, *P. aleophilum* son los principales responsables de la enfermedad de Petri y esca de la vid (Mugnai *et al.*, 1999, Morton, 1999). Resulta notorio que excepto un aislamiento

**Cuadro 6.** Amplificación con cebadores específicos de *Phaeoacremonium* spp., *Pa. chlamydospora*, *Inocutis jamaicensis* y control (ITS4/ITS5) en ADN de cultivos puros

Especie	Pac1f/Pac2r	F2Bt/R1Bt	Pmo1f/Pmo2r	INO	ITS
<i>P. aleophilum</i> (34 aislamientos)	+	+	-	-	+
<i>P. australiense</i>	+	-	-	-	+
<i>Pa. chlamydospora</i> (11 aislamientos)	-	-	+	-	+
<i>Inocutis jamaicensis</i>	-	-	-	+	+
<i>Botryosphaeria parva</i>	-	-	-	-	+
<i>Phomopsis viticola</i>	-	-	-	-	+
<i>Phomopsis</i> sp. 1	-	-	-	-	+
<i>Phomopsis</i> sp. 2	-	-	-	-	+
Hymenochaetaceae	-	-	-	-	+
<i>Greeneria uvicola</i>	-	-	-	-	+
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	-	-	+
<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	-	-	-	-	+
<i>Cadophora melinii</i>	-	-	-	-	+
<i>Eutypella vitis</i>	-	-	-	-	+
Otras especies en ADN de madera	+	-	-	-	+

(+) amplificación y (-) no amplificación.

de *P. australiense*, todos los otros aislamientos pertenecieron a la especie *P. aleophilum*, confirmandose la casi exclusividad de *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* en relación a estas enfermedades. Las diferencias morfológicas entre aislamientos de *P. aleophilum* pueden deberse a la mayor variación genética que existe en esta especie (Mostert, 2006), por lo que sería interesante analizar si estas diferencias se corresponden con diferencias en la patogenicidad de los distintos morfotipos. Estas especies se asociaron principalmente a los síntomas de esca y Petri, en coincidencia con la opinión generalmente aceptada que los señala como agentes causales principales de estas dolencias (Surico, 2009). Sin embargo, estas especies fueron encontradas también asociadas al síntoma de brazo muerto, por lo cual se ha sugerido la existencia de un gradiente de especies asociadas a un continuo de síntomas (Abreo *et al.*, 2012)

La relevancia de *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* como agentes causales de las enfermedades del tronco de la vid condujo a la evaluación de cebadores específicos que permitiesen su identificación en material vegetal asintomático. El proceso de prueba de cebadores específicos es fundamental para asegurar la confiabilidad del diagnóstico temprano cuando se los aplica directamente sobre ADN extraído de la madera que contiene una mezcla de ADN. Los cebadores Pac1f/Pac2r amplificaron el ADN puro de las especies objetivo, pero también produjeron un producto de amplificación del tamaño esperado que sin embargo perteneció a especies no relacionadas que se encontraban presentes en la madera cuando se los probó directamente sobre sarmientos. Su uso puede llevar a un diagnóstico equivocado y por lo tanto fueron descartados. Las pruebas a que fueron sometidos los cebadores Pmo1F/Pmo2r y F2bt/R1bt permitieron asegurar la validez de los mismos.

La presencia de estas dos especies fúngicas en sarmientos asintomáticos obtenidos en viveros comerciales pudo ser detectada mediante el uso de los cebadores seleccionados (Abreo *et al.*, 2011).

En referencia al pie negro, es remarkable el registro de varias especies del

grupo *Cylindrocarpon sensu lato*, en particular de especies altamente patógenas como *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* (Alaniz *et al.*, 2009) que aún no habían sido citadas en Uruguay asociadas al pie negro de la vid. Asimismo, se destaca el registro de *Ca. pseudofasciculare*, que hasta el momento había sido citado solamente en Sudáfrica (Chaverri *et al.*, 2011). Tal diversidad de especies, cuyos aislamientos provinieron de un tamaño de muestra relativamente pequeño, parece indicar una condición favorable a su desarrollo en los viñedos implantados en el litoral sur del Uruguay, zona a la que se circunscribió el muestreo de pie negro (Abreo *et al.*, 2010). El pie negro estuvo relacionado a este género, junto a otros géneros que son habitantes frecuentes del suelo, como *Fusarium*.

Asociadas al síntoma comúnmente denominado brazo muerto se identificaron las especies *F. aesculi*, *N. parvum/ribis*, *Neofusicoccum luteum/australe*, y *Diplodia seriata*. Los aislamientos representativos del complejo *N. parvum/ribis* y *N. luteum/australe* fueron posteriormente caracterizados mediante amplificación del gen que codifica para la subunidad II de la ARN polimerasa y factor de elongación. Dentro del complejo *N. parvum/ribis* se identificaron *N. parvum* y *N. kwambonambiense*. Dentro del complejo *N. luteum/australe* la mayoría de los aislamientos pertenecieron a *N. luteum* mientras que *N. australe* fue sólo identificado en material vegetal asintomático proveniente de vivero (Abreo *et al.*, 2013). *Lasiodiplodia theobromae*, la especie que ha sido considerada más virulenta en California (Úrbez-Torres y Gubler 2009b), fue identificada sólo en una muestra proveniente de Rivera (Abreo *et al.*, 2013). Por otra parte no se pudo verificar la presencia de la especie *Eutypa lata*, aunque sí se obtuvieron dos aislamientos de *Eutypella vitis*, especie menos virulenta.

En el análisis de las regiones, los departamentos más cálidos del centro y norte se asociaron a una mayor presencia de *I. jamaicensis*, *Botryosphaeria* y *G. uvicola*, y se separaron de los departamentos del sur que estuvieron principalmente asociados a *E. vitis* y *Fusarium* spp. Coincidentemente, en cli-

ma cálidos las especies de *Botryosphaeriaceae* han sido consideradas dominantes frente a *Eutypa lata* y *Eutypella vitis* en su asociación con el brazo muerto de la vid, mientras que éstas fueron relativamente más frecuentes en climas fríos (Úrbez-Torres y Gubler, 2006; Catal *et al.*, 2007).

Por su parte, *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* estuvieron presentes en igual medida en todas las regiones relevadas.

## CONCLUSIONES GENERALES

Las enfermedades del tronco de la vid -enfermedad de Petri, esca y brazo muerto- fueron diagnosticadas en viñedos en todo el territorio nacional, y su incidencia varió según el cultivar.

Cada una de las enfermedades de la parte aérea estuvo asociada principalmente a una o varias de las especies de hongos patógenos; sin embargo, en general estas asociaciones no fueron exclusivas y en realidad se verificó la existencia de un gradiente de especies entre la enfermedad de Petri, esca y brazo muerto.

El pie negro de la vid estuvo asociado a hongos del suelo como *Cylindrocarpon sensu lato*, y se diferenció claramente de las enfermedades de las partes aéreas. Las especies identificadas en este estudio constituyeron los primeros reportes de estos patógenos de la vid en Uruguay, e incluyeron a *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* - considerados como los principales agentes causales de esta enfermedad- y *Ca. pseudofasciculare*, una especie patógena anteriormente detectada sólo en Sudáfrica.

El síntoma de brazo muerto observado en Uruguay se debe principalmente a especies de *Botryosphaeriaceae* y no a *Eutypa lata*. *Eutypa lata* no fue aislada en este relevamiento. *E. vitis* fue aislada sólo de plantas del cultivar Cabernet Sauvignon.

Se detectó la presencia de *Pa. chlamydospora*, *P. aleophilum*, *P. viticola*, y especies de *Botryosphaeriaceae* como endófitos en plantines sanos constituyen una fuente inicial de dispersión de estos patógenos.

De las especies fúngicas menos conocidas, *Greeneria uvicola* estuvo asociada a plantas con brazo muerto y esca, mientras que *Cadophora luteo-olivacea* estuvo asociada a plantines con síntomas de la enfermedad de Petri.

Se determinó que los cebadores Pmo1f/Pmo2r y F2Bt/R1Bt son apropiados para ser usados en la detección temprana de *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* en material vegetal asintomático.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a INIA por el financiamiento de este proyecto y a FUCREA por el acceso a los predios vitícolas para la obtención de muestras.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABREO, E.; MARTÍNEZ, S.; BETTUCCI, L.; LUPO, S.** 2013. Characterization of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 42:241-249.
- ABREO, E.; LUPO, S.; BETTUCCI, L.** 2012. Fungal community of grapevine trunk diseases: a continuum of symptoms? *Sydowia* 64 (1):1-12.
- ABREO, E.; MARTÍNEZ, S.; BETTUCCI, L.; LUPO, S.** 2011. *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. in grapevines from Uruguay. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S 75-S83.
- ABREO, E.; MARTÍNEZ, S.; BETTUCCI, L.; LUPO, S.** 2010. Morphological and molecular characterisation of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 39:446-452.
- ALANIZ, S.; ARMENGOL, J.; LEON, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, C.** 2009. Analysis of genetic and virulence diversity of *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum* associated with black foot disease of grapevine. *Mycological Research* 113:16-23.
- AROCA, A.; RAPOSO, R.; LUNELLO, P.** 2008. A biomarker for the identification of four *Phaeoacremonium* species using the  $\beta$ -tubulin gene as the target sequence.

- Applied Microbiology and Biotechnology 80: 1131-1140.
- CARTER, M.V.** 1988. *Eutypa dieback*. In: Pearson R.C., Goheen A. (eds.). Compendium of grape diseases, pp. 32-34. APS press, St. Paul, MN, USA.
- CATAL, M.; JORDAN, S.A.; BUTTERWORTH, S.C.; SCHILDER, A.M.C.** 2007. Detection of *Eutypa lata* and *Eutypella vitis* in grapevine by nested multiplex polymerase chain reaction. *Phytopathology* 97: 737-747.
- CHAVERRI, P.; SALGADO, C.; HIROOKA, Y.; ROSSMAN, A.Y.; SAMUELS, G.J.** 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (nectriaceae, hypocreales, ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology* 68: 57-78.
- CROUS, P.W.; PALM, M.E.** 1999. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia* 52: 167-175.
- CROUS, P.M.; GAMS, W.** 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 112-118.
- DENMAN, S.; CROUS, P.; TAYLOR, J.E.; KANG, J.C.; PASCOE, I.; WINGFIELD, M.W.** 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45: 129-140.
- FISCHER, M.** 2006. Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S30-S42.
- FOURIE, P.; HALLEN, F.** 2002. Investigation on the occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in canes of rootstocks mother vines. *Australasian Plant Pathology*, 31, 425-426.
- GATICA, M.; DUBOS, B.; LARIGNON, P.** 2000. The «hoja de malvón» grape disease in Argentina. *Phytopathologia Mediterranea* 2000 Vol. 39 No. 1 pp. 41-45.
- GATICA, M.; CÉSARI, C.; MAGNIN, S.; DUPONT, J.** 2001. *Phaeoacremonium* species and *Phaeomoniella chlamydospora* in vines showing «hoja de malvón» and young vine decline symptoms in Argentina. *Phytopathologia Mediterranea* 40, Supplement, S317-S324.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C.** 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.
- GUBLER, W.D.; ROLSHAUSEN, P.E.; TROUILLAS, F.P.; URBEZ, J.R.; VOEGEL, T.** 2005. Grapevine trunk diseases in California. *Practical Winery and Vineyard*, January/February.
- HALLEEN, F.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W.** 2004. Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology* 50: 431-455.
- HALLEEN, F.; FOURIE, P.H.; CROUS, P.W.** 2006a. A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S55 -S67.
- HALLEEN, F.; GROENEWALD, J.Z.; REGO, C.; OLIVEIRA, H.; CROUS, P.W.** 2006b. *Neonectria lirioidendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines. *Studies in Mycology* 55: 227-234.
- HALLEEN, F.; MOSTERT, A.D.L.; CROUS, P.W.** 2007. Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi of grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 36: 277-285.
- HAMMER, Ø, HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D.** 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- JORDAN, S.; SCHILDER, A.** 2005. *Eutypella vitis*, a potential pathogen of grapevines in Michigan. *Phytopathology* 95, 6.
- LARIGNON, P.; DUBOS, B.** 1997. Fungi associated with Esca disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 147-157.
- LEE, S.; TAYLO, R J.** 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, New York, pp. 282-287.
- LUPO, S.; BETTUCCI L.; PÉREZ, A.; MARTINEZ, S.; CÉSARI, C.; ESCORIANZA, G.; GATICA, M.** 2006. Characterization and identification of

- the basydiomycetous fungus associated to «hoja de malvón» grapevine disease in Argentina. *Phytop. Mediterranea* 45, S110-S116.
- MARRONI, V.; ABREO, E.** 2005. *Phaeomoniella chlamydospora* associated with Petri disease in grapevines in Uruguay. The 15 th Bional Australasian Plant Pathology Society Conference Handbook. Deakin University Geelong, 26-29th September, Victoria, Australia.
- MOLLER, W. J.; KASIMATIS, A. N.** 1978. Dieback of grapevines caused by *Eutypa armeniacae*. *Plant. Dis. Rep.* 62, 254-258
- MORTON, L.** 1999. On the trail of black goo. In: Black Goo- occurrence and symptoms of grapevine declines. IAS-ICGTD Proceedings 1998 (L. Morton Ed.) International Ampelography Society, USA.
- MOSTERT, L.; GROENEWALD, Z.; SUMMERBELL, R.C.; GAMS, W.; CROUS, P.W.** 2006. Taxonomy and pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium anamorphs*. *Studies in Mycology* 54: 1-115.
- MUGNAI, L.; GRANITI, A.; SURICO, G.** 1999. Esca (black measles) and brown streaking: two old and elusive diseases of the grapevine. *Plant Disease* 83, 404-418.
- MUNKVOLD, G. P.; DUTHIE, J.A.; MAROIS, J.J.** 1994. Reduction in yield and vegetative growth of grapevines due to *Eutypa* dieback. *Phytopathology* 84, 186-192.
- NAVARRETE, F.; ABREO, E.; MARTÍNEZ, S.; BETTUCCI, L.; LUPO, S.** 2011. Pathogenicity and molecular detection of Uruguayan isolates of *Greeneria uvicola* and *Cadophora luteo-olivacea* associated with grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 50 (Suppl.): S 166-S 175.
- O'DONELL, K.; CIGELNIK, E.** 1997. Two different intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non-orthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7:103-116.
- OVERTON, B.E.; STEWART, E.L.; XINSHUN, Q.U.; WENNER, N.G.; CHRIST, B.J.** 2004. Qualitative real-time PCR SYBR Green detection of Petri disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 403-410.
- Petit AN, Vaillant N, Boulay M, Clément C, Fontaine F (2006) Alteration of photosynthesis in grapevines affected by esca. *Phytopathology* 96, 1060-1066.
- PÉREZ, A.; MARTÍNEZ, S.; LUPO, S.; BETTUCCI, L.** 2003. Identificación temprana de *Inocutis jamaicensis* en madera infectada de *Eucalyptus globulus*. Simposio Iberoamericano del *Eucalyptus globulus*. Montevideo, 30-31 de octubre.
- PHILLIPS, A.; ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J.** 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella anamorphs*. *Mycologia* 97: 513-529.
- RIDGWAY, H.; SLEIGHT, B.; STEWART, A.** 2002. Molecular evidence for the presence of *Phaeomoniella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstocks mother vines using species-specific PCR. *Australasian Plant Pathology*, 31, 267-271.
- RUDELLE, J.; OCTAVE, S.; KAID-HARCHE, M.; ROBLIN, G.; FLEURAT-LESSARD, P.** 2005. Structural modifications induced by *Eutypa lata* in the xylem of trunk and canes of *Vitis vinifera*. *Functional Plant Biology* 32, 537-547.
- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O.** (Eds.). 1995. Introduction to Foodborne Fungi, fourth edition, CBS, Baarn, Netherlands, p. 85-119.
- SAKALIDIS, M.** 2004. Resolving the *Botryosphaeria ribis* – *Botryosphaeria parva* species complex; a molecular and phenotypic investigation. Honors Thesis. School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Western Australia.
- SCHECK, H.J.; VASQUEZ, S.J.; GUBLER, W.D.** 1998. First report of black-foot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporum*, of grapevine in California. *Plant Disease* 82: 448.
- SURICO, G.** 2009. Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 5-10.
- SWOFFORD, D.L.** 2003. PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731–2739
- TEGLI, S.; BERTELLI, E.; SURICO, G.** 2000. Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 134-149.
- ÚRBEZ-TORRES, J.R.; ADAMS, P.; KAMA, J.; GUBLER, W.D.** 2009a. Identification, incidence and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas. *American Journal of Enology and Viticulture* 60: 497–507.
- ÚRBEZ-TORRES, J.R.; GUBLER, W.D.** 2009b. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease* 93:584-592.
- VANNIEKERK, J. M.; CROUS, P.W.; FOURIE, P.H.; HALLEEN, F.** 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96:781:798.
- VILGALYS, R. HESTER, M.** 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- WHITEMAN, S.; JASPERS, M.; STEWART, A.; RIDGWAY, H.** 2002. Detection of *Phaeoconiella chlamydospora* in soil using species-specific PCR. *New Zealand Plant Protection*. 55:139-145.