

2011

PE

DE

CI

BA

COMUNIDAD FÚNGICA ASOCIADA A LAS ENFERMEDADES DEL TRONCO DE LA VID EN URUGUAY

COMPOSICIÓN,
DIAGNÓSTICO MOLECULAR
Y PATOGENICIDAD

Ing. Agr. Eduardo Abreo

Doctorado PEDECIBA

Ciencias Biológicas

Universidad de la República



Universidad de la República

**Comunidad fúngica asociada a las
enfermedades del tronco de la vid en Uruguay:
composición, diagnóstico molecular y patogenicidad**

Ing. Agr. Eduardo Abreo Giménez

Doctorado PEDECIBA en Ciencias Biológicas

Laboratorio de Micología

Facultad de Ciencias - Ingeniería

Tutor: Dra. Lina Bettucci

Co-tutor: Dra. Sandra Lupo

Montevideo, 2011

Índice	<i>i</i>
Resumen	<i>ii</i>
Summary	<i>iii</i>
Agradecimientos	<i>iv</i>
<u>Capítulo 1 Introducción General</u>	1
1.1 El cultivo de la vid	1
1.1.1 Origen, domesticación y dispersión de la especie <i>Vitis vinifera</i>	1
1.1.2 Estructura y reproducción de la planta de vid	3
1.1.3 El sistema vascular de la vid	4
1.2 Podredumbres de la madera	6
1.3 Enfermedades del tronco de la vid	8
1.3.1 Traqueomicosis: enfermedad de Petri y esca	9
1.3.1.1 Organismos causales	11
1.3.1.2 Infección	12
1.3.2 Brazo muerto de la vid	16
1.3.2.1 Eutipiosis	16
1.3.2.1.1 Organismos causales	17
1.3.2.1.2 Infección	18
1.3.2.2 Brazo negro muerto	19
1.3.2.2.1 Organismos causales	19
1.3.2.2.2 Infección	20
1.3.3 Pie Negro	21
1.3.3.1 Organismos causales	21
1.3.3.2 Infección	22
1.4 Hipótesis	23
1.5 Objetivos	23
<u>Capítulo 2 Comunidad fúngica asociada a las enfermedades del tronco de la vid</u>	25
2.1 Introducción	25
2.2 Objetivos	26
2.3 Materiales y Métodos	27
2.3.1 Reconocimiento de síntomas	27
2.3.2 Cuantificación de síntomas externos	28
2.3.3 Obtención de muestras de material vegetal	29
2.3.4 Obtención de aislamientos fúngicos	30
2.3.5 Identificación de especies	30
2.3.5.1 Identificación morfológica	30
2.3.5.2 Identificación filogenética	31

2.3.6 Análisis de datos	33
2.4 Resultados	34
2.4.1 Identificación morfológica y filogenética de especies patógenas	34
2.4.1.1 <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	34
2.4.1.2 <i>Phaeoacremonium</i> spp.	35
2.4.1.3 <i>Botryosphaeria</i> spp.	38
2.4.1.4 <i>Cylindrocarpon</i> spp. y <i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	40
2.4.1.5 <i>Greeneria uvicola</i>	43
2.4.1.6 <i>Cadophora luteo-olivacea</i> y <i>Cadophora melinii</i>	44
2.4.1.7 <i>Phomopsis viticola</i>	45
2.4.1.8 <i>Eutypella vitis</i>	46
2.4.1.9 <i>Inocutis jamaicensis</i>	46
2.4.2 Relación entre síntomas, cultivares, regiones y géneros de hongos	47
2.4.2.1 Caracterización de síntomas según géneros	47
2.4.2.2 Caracterización se cultivares según géneros	48
2.4.2.3 Caracterización de regiones según géneros	49
2.4.2.4 Caracterización de cultivares según síntomas externos	51
2.5 Discusión	52
<u>Capítulo 3 Detección molecular de las principales especies patógenas en material asintomático</u>	55
3.1 Introducción	55
3.2 Objetivos	55
3.3 Materiales y Métodos	56
3.3.1 Evaluación de especificidad de cebadores en ADN de cultivos puros	56
3.3.2 Evaluación de especificidad de cebadores en ADN total de madera enferma	57
3.3.3 Detección molecular de <i>Pa. chlamydospora</i> y <i>P. aleophilum</i> en plantas asintomáticas	57
3.4 Resultados	58
3.4.1 Especificidad de cebadores en ADN de cultivos puros	58
3.4.2 Especificidad de cebadores en ADN total obtenido de madera enferma	59
3.4.3 Detección molecular de <i>Pa. chlamydospora</i> y <i>P. aleophilum</i> en plantas asintomáticas	60
3.5 Discusión	62
<u>Capítulo 4 Patogenicidad de especies con acción poco conocida</u>	65
4.1 Introducción	65
4.2 Objetivos	65
4.3 Materiales y Métodos	66
4.3.1 Patogenicidad y virulencia de <i>Botryosphaeria</i> spp.	66
4.3.2 Patogenicidad y virulencia de <i>Greeneria uvicola</i> y <i>Cadophora luteo-olivacea</i>	66
4.3.3 Evaluación de síntomas y número de reaislamientos	67

4.3.4 Análisis de datos	67
4.4 Resultados	68
4.4.1 Patogenicidad y virulencia de <i>Botryosphaeria</i> spp.	68
4.4.2 Patogenicidad y virulencia de <i>Greeneria uvicola</i>	69
4.4.3 Patogenicidad y virulencia de <i>Cadophora luteo-olivacea</i>	72
4.5 Discusión	73
<u>Capítulo 5 Discusión general</u>	77
<u>Capítulo 6 Conclusiones</u>	81
<u>Bibliografía</u>	83
<u>Anexos</u>	97

Resumen

El presente estudio abarcó los síntomas que en su conjunto son conocidos como enfermedades del tronco de la planta de vid y las especies fúngicas relacionadas.

Phaeomoniella chlamydospora y *Phaeoacremonium aleophilum* fueron las especies que se encontraron asociadas a la enfermedad de Petri y esca, pero también se encontraron presentes en muestras con síntomas de brazo muerto. *Inocutis jamaicensis* fue aislado de la podredumbre blanca de la esca, y también del brazo muerto. *Cadophora luteo-olivacea*, fue frecuentemente aislada de tejidos sintomáticos, pero no resultó virulenta en estudios de patogenicidad realizados en plantines en macetas. Se seleccionaron los cebadores específicos Pmo1f/Pmo2r y F2bt/R1bt para *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum*, que permitieron su detección temprana en material vegetal asintomático, confirmándose que estos hongos se encuentran presentes en los tejidos internos de sarmientos usados para la injertación y por lo tanto los plantines constituyen una fuente inicial de dispersión. Las especies fúngicas asociadas al brazo muerto fueron principalmente del género *Botryosphaeria*, y en el sur del país en baja proporción también *Eutypella vitis*, por lo cual de acuerdo a nuestros resultados el síntoma mayormente observado en Uruguay es el brazo negro muerto y no Eutipiosis. Estas especies constituyeron un continuo entre estas tres enfermedades. El análisis de las secuencias reveló que el complejo *Neofusicoccum parvum/ribis* comprende mayoritariamente especies de *N. parvum*. Ensayos de patogenicidad en laboratorio demostraron que *N. parvum* y *N. luteum* son las de mayor potencial patogénico dentro de este género. Aislamientos de *Greeneria uvicola*, un Deuteromycete, resultaron virulentos al ser inoculados en plantines de vid, causando necrosis en los vasos del xilema, y por lo tanto esta especie puede ser considerada como un potencial agente causal del brazo negro muerto. *Phomopsis viticola* fue aislada también a partir de plantas con síntoma de brazo muerto y esca. En la actualidad, se descarta su participación en el desarrollo del brazo negro muerto.

Asociado al pie negro de la vid, se aislaron e identificaron por primera vez en Uruguay seis especies de hongos, entre ellas *Cylindrocarpon liriodendri*, *Cylindrocarpon macrodidymum* y *Campylocarpon pseudofasciculare* las cuales son consideradas como principales especies responsables de esta enfermedad. También se aislaron por primera vez en Uruguay *Cylindrocarpon pauciseptatum* y *Cylindrocarpon olidum*. Un sexto aislamiento fue provisoriamente identificado como *Cylindrocarpon destructans*.

Los resultados de esta tesis componen tres publicaciones arbitradas y parcialmente una cuarta publicación.

E. Abreo, S. Martinez, L. Bettucci and S. Lupo (2010) Morphological and molecular characterization of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot disease of grapevines in Uruguay.

Australasian Plant Pathology 39, 446–452

E. Abreo, S. Martinez, L. Bettucci and S. Lupo (2011) *Pa. chlamydospora* and *P. aleophilum* associated with grapevines trunk diseases from Uruguay.

Phytopathologia Mediterranea (en prensa)

F. Navarrete, E. Abreo, S. Martínez, L. Bettucci, S. Lupo (2011) Pathogenicity and molecular detection of Uruguayan isolates of *Greeneria uvicola* and *Cadophora luteo-olivacea* associated with grapevine trunk diseases.

Phytopathologia Mediterranea (en prensa)

E. Abreo, S. Lupo, L. Bettucci

Fungal community in grapevines suffering from trunk diseases: a continuum of species? (en preparación)

Summary

This study comprised all symptoms known as grapevine trunk diseases, and the fungi associated with them.

Phaeomoniella chlamydospora and *Phaeoacremonium aleophilum* were the species associated with Petri disease and esca, but also with the dead-arm disease.

Inocutis jamaicensis is the Basidiomycete that causes the esca white rot in Uruguay, but it was also present in the dead-arms of grapevines. *Cadophora luteo-olivacea* was frequently isolated from diseased tissues but it was not pathogenic. Specific primers Pmo1f/Pmo2r y F2bt/R1bt for *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* were validated, and their use allowed for the early detection of these fungi in asymptomatic plant material used for the vegetative reproduction of vines. Therefore, plantlets constitute a source of dissemination for these fungi.

Fungal species associated with the dead-arm symptom were mostly members of *Botryosphaeria*, and also *Eutypella vitis* but in minor proportion in the south of the country. Therefore, the dead arm symptom observed in Uruguay corresponded to black dead-arm or Bot canker, and not *Eutypa* die-back. All these species are distributed as a continuum among symptoms. Sequence analysis identified the species *Neofusicoccum parvum* within the *N. parvum/ribis* complex. Pathogenicity tests showed that *N. parvum* and *N. luteum* were the most pathogenic. Isolates of *Greeneria uvicola*, a Deuteromycete, produced necrosis in inoculated plantlets and were considered pathogenic too. *Phomopsis viticola* was also isolated from esca and dead-arm affected grapevines. However, this species is no longer considered a pathogen associated with neither of these diseases.

Six fungal species were associated with black- foot in Uruguay, three of which are considered causal agents of the disease: *Cylindrocarpon liriodendri*, *Cylindrocarpon macrodidymum* and *Campylocarpon pseudofasciculare*. *Cylindrocarpon pauciseptatum* and *Cylindrocarpon olidum* were also identified. One isolate was tentatively identified as *Cylindrocarpon destructans*.

Agradecimientos

Presento aquí los resultados de varios años de esfuerzo personal, que rindieron sus frutos gracias al conocimiento y a la experiencia aportados por el equipo de investigadores que integran el laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias-Ingeniería.

Es por lo tanto menester agradecer a mi directora de tesis Dra. Lina Bettucci por su generosidad y por el aporte de su rica experiencia al desarrollo de mi trabajo. De igual manera, agradezco a la Dra. Sandra Lupo, co-tutora y compañera de trabajo, por su presencia continua a lo largo de las distintas etapas de esta investigación.

Otras personas que participaron en distintos momentos del proyecto de las enfermedades del tronco de la vid fueron también parte de este esfuerzo, y a ellos va mi reconocimiento: Ing. Agr. Sebastián Martínez, Lic. Fernando Navarrete, Dr. Guillermo Pérez, Ing. Agr. Virginia Marroni e Ing. Agr. Enrique Mirazo.

Quiero expresar también mi agradecimiento a todos los docentes y pasantes del laboratorio quienes me brindaron su ayuda, cordialidad y confianza.

Por último, quiero agradecer las revisiones críticas hechas por los integrantes del tribunal Dra. Alicia Arias, Dra. Magela Laviña y Dr. Pablo Zunino que enriquecieron este trabajo.

En memoria de mi padre Sergio Abreo, de mi abuela Alba García, y de mi pequeña amiga Lucia que se alejaron en estos pocos años.

Dedicado a mis padres.

“No hay que creer en lo que uno piensa”

*“...y entre penumbras, recuperar el designio de quien tuvo un sueño
y el empeño por llevarlo a cabo”*

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 El cultivo de la vid

1.1.1 Origen, domesticación y dispersión de *Vitis vinifera*

La vid euroasiática *Vitis vinifera* L. es la especie frutal más ampliamente cultivada y la más importante del mundo desde el punto de vista económico (Vivier & Pretorius, 2002), con conexiones históricas en relación al desarrollo de la cultura humana (This *et al.*, 2006). Se piensa que la vid cultivada *V. vinifera* spp. *sativa* fue domesticada a partir de poblaciones salvajes de *V. vinifera* spp. *sylvestris* (Levadoux, 1956). Estas vides salvajes son plantas dioicas que aún existen en pequeñas poblaciones aisladas a lo largo de la floresta ribereña desde la costa atlántica de Europa hasta Tajikistan y el Himalaya occidental (Zohary & Hopf, 2000). Sin embargo, esta separación histórica en subespecies podría no ser válida ya que se basó en diferencias morfológicas (Zohary, 1995) que son probablemente el resultado del proceso de domesticación por el hombre y no del aislamiento geográfico.

Si bien la explotación por el hombre de la fruta de las vides salvajes en el periodo paleolítico está bien documentada (Zoharí, 1996), hasta el periodo Neolítico (8500 – 4000 años AC) no habría ocurrido la domesticación de la vid destinada a la producción de vino. El proceso de domesticación de la vid puede ser descrito como un proceso de selección de genotipos apropiados, que luego fueron multiplicados en forma vegetativa, durante siglos y en diferentes lugares (Europa y Asia). La variación genética podría haberse incrementado durante ese tiempo como resultado de variaciones somáticas y la ocasional generación y propagación de híbridos espontáneos derivados de cruas entre plantas cultivadas, o entre plantas cultivadas y plantas de *V. vinifera* spp. *sylvestris*, aunque esta última posibilidad se considera poco probable (This *et al.*, 2006). Durante la domesticación, la biología de las vides sufrió varios cambios de manera de asegurar mayor contenido de azúcar fermentable en los frutos maduros, con mayores rendimientos y producción más regular. De tal forma, los racimos y las bayas aumentaron su tamaño, y se seleccionaron plantas hermafroditas y no dioicas (This *et al.*, 2006).

La dispersión desde el sitio principal de domesticación, en el cercano oriente, ocurrió gradualmente hacia las regiones de Egipto y baja mesopotamia (3500-3000 AC) y la dispersión posterior alrededor del mar Mediterráneo se dio asociada a las principales civilizaciones (sirios, griegos, romanos).

Bajo la influencia de los romanos, *V. vinifera* se expandió hacia el interior del continente europeo y alcanzó varias regiones templadas incluso tan al norte como Alemania. Hacia el fin del imperio romano, la vid era un cultivo común en la mayoría de los sitios donde actualmente se la cultiva, y ya se la nombraba según distintos cultivares. En la edad media, la iglesia Católica llevó el cultivo de la vid a nuevas regiones mientras que la expansión del Islam hacia el norte de África, España y el cercano oriente también tuvo un efecto sobre la dispersión de la vid, en particular de los cultivares de uva de mesa. Durante esta época aparecieron los nombre de algunos cultivares que aun hoy se utilizan. Luego del renacimiento, en el siglo XVI, *V. vinifera* se extendió a regiones donde no era originaria. Los misioneros la introdujeron a América primero como semilla y luego como estacas desde sus países de origen. Más tarde en el siglo XIX, fueron llevadas a Australia, Nueva Zelanda y África. A fines del siglo XIX, después de varios milenios de expansión geográfica, agentes fitopatógenos de América alcanzaron Europa (Filoxera, Mildiu) destruyendo muchos viñedos europeos y modificando drásticamente la diversidad de esta especie. Como resultado, ocurrió probablemente una reducción de la diversidad tanto de las vides cultivadas como de las silvestres. La viticultura europea fue salvada gracias a la introducción de especies americanas de *Vitis* distintas de *V. vinifera*, que fueron usadas como portainjertos, y a programas de cruzamiento para la obtención de híbridos inter-específicos resistentes a las enfermedades y plagas provenientes de América. Estos híbridos fueron muy utilizados a mediados del siglo XX, pero en la actualidad son poco cultivados y usados para la producción de vinos. En los últimos 50 años, la vid cultivada sufrió otra reducción en su diversidad, en este caso debido a la globalización de los mercados y de las compañías productoras de vinos que ha resultado en la permanencia de pocos cultivares que son usados en todas las regiones vitícolas del mundo, tales como Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Syrah (Shiraz), Merlot, y la desaparición de cultivares locales. La selección sanitaria de clones libre de enfermedades ha inducido a su vez una reducción en la diversidad clonal de estos importantes cultivares (This *et al.*, 2006).

1.1.2 Estructura y reproducción de la planta de vid

La vid es una planta leñosa considerada una liana por su hábito de crecimiento. Cuando crece a partir de semilla, la nueva planta tiene una etapa de juvenilidad que dura entre 2 y 5 años, caracterizada por hojas de formas variables con disposición helicoidal a lo largo del tallo y durante la cual no produce flores. El cambio de fase está marcado por cambios en la forma de las hojas y en su disposición, que pasa de helicoidal a alterna, y por la capacidad de producir zarcillos y flores (Carmona *et al.*, 2008). En la reproducción a través de órganos vegetativos comúnmente usada para la producción comercial de plantas, la etapa de juvenilidad se ve suprimida y las nuevas plantas siguen el patrón de desarrollo de la planta adulta, por lo cual tienen la capacidad de producir flores y frutos en los primeros años de vida. En la actualidad, la reproducción vegetativa de la vid se logra principalmente mediante la producción de plantas injertadas (Figura 1a). El procedimiento implica la cosecha de sarmientos de plantas madre del cultivar fructífero (*V. vinifera*) por una parte y del cultivar usado como portainjerto (*Vitis* spp. de origen americano) que son unidos mediante el proceso de injertación. De este injerto resulta una nueva planta en la que el cultivar de *V. vinifera* producirá el desarrollo de brotes, flores y frutos, mientras que el portainjerto (*Vitis* spp.) producirá la raíces (Figura 1b).

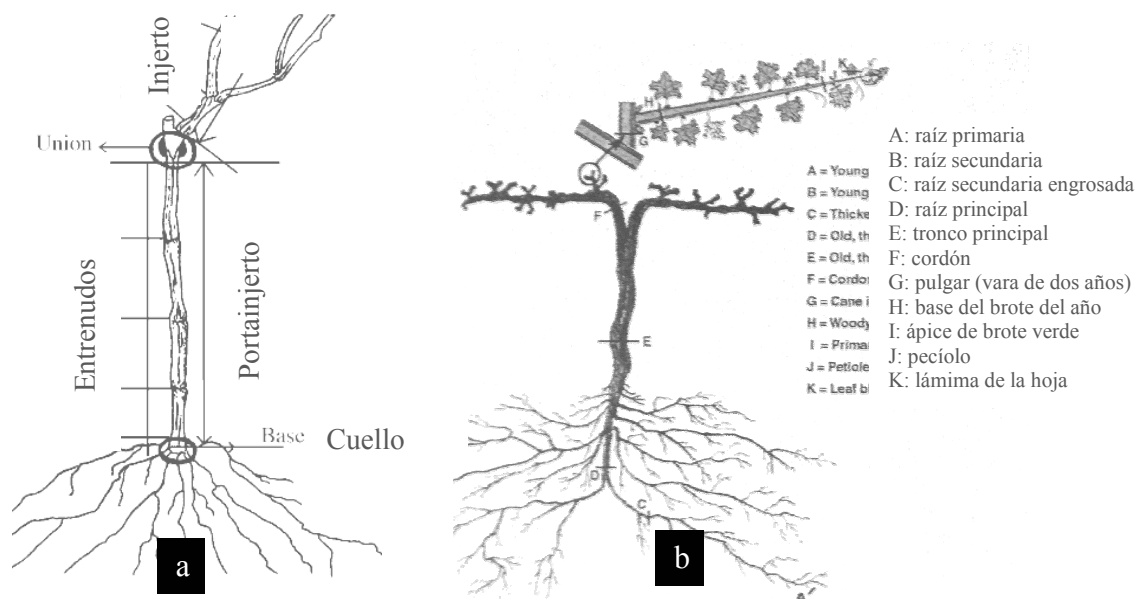


Figura 1.

a: estructura del plantín obtenido mediante injertación. Tomado de Morton, 2000

b: planta de vid adulta en invierno conducida en cordón bilateral. Tomado de Goffinet, 1999.

1.1.3 El sistema vascular de la vid

En las plantas, el sistema vascular (xilema y floema) conecta estructural y fisiológicamente los nutrientes inorgánicos del suelo con el follaje en donde ocurre la fijación del carbono a través de la fotosíntesis. Los reguladores del crecimiento también se mueven por el sistema vascular y estimulan cambios en el desarrollo de tejidos y órganos. En la vid, al igual que en las especies arbóreas, el xilema es usualmente más conspicuo que el floema, especialmente en las plantas más viejas y leñosas en donde se lignifica y forma anillos anuales similares a los anillos de crecimiento de los tallos de los árboles. El xilema está constituido por distintos tipos celulares con diferentes funciones: los vasos son conductos constituidos por células muy diferenciadas vacías por donde fluyen el agua y minerales; las fibras que son células con la pared gruesa que dan rigidez al tejido y células parenquimáticas vivas, que almacenan carbohidratos y metabolitos. El floema se ubica por fuera del xilema, y está compuesto por células que forman los tubos cribosos, las células acompañantes y fibras. Entre el xilema y el floema se ubica el cambium, cuyas células se multiplican durante la estación de crecimiento para formar nuevas células de xilema y floema, incluyendo el parénquima radial que los comunica, y en el que tienen lugar el movimiento lateral de compuestos orgánicos y el almacenamiento de almidón. El parénquima radial en las raíces de la vid almacena gran cantidad de este carbohidrato principalmente durante el otoño, que luego es transformado en azúcares simples que son transportados hacia la parte aérea de la planta nutriendo la nueva brotación en primavera. En el momento de la floración, los tallos ya se han elongado y han producido varias hojas. La producción y expansión de las hojas estimulan la activación del cambium vascular que genera xilema y floema secundarios en una onda que se transmite hacia abajo, desde la zona de crecimiento de los brotes hasta la raíz (Goffinet, 1999).

Con la diferenciación del cambium, la epidermis del tallo, la corteza y mas internamente el floema primario son empujados hacia fuera, mientras que el xilema primario formado el año anterior queda en la parte central del tallo, rodeando a la médula (Goffinet, 1999). El felógeno, llamado también cambium suberoso, se desarrolla a partir del parénquima del floema secundario no funcional a intervalos de un año o más. El felógeno produce felodermis hacia adentro y súber hacia hacia afuera, colectivamente llamados peridermis. El felógeno al continuar su actividad anualmente hace que se desprenda el ritidoma constituido por el floema viejo y la peridermis (Pratt, 1974).

El xilema por su parte retiene todos sus anillos anuales, pero los más externos y jóvenes son los funcionales mientras que muchos de los vasos más internos se ocluyen debido a la invaginación, a través de las puntuaciones, de las células que los rodean (tilosis) bloqueándose así el transporte de agua. Los vasos del xilema se inactivan parcialmente a los dos o tres años de producidos, y se inactivan totalmente a los seis o siete años (Pratt, 1974). Esto, sumado a cambios en la composición química, crea una madera dura y lignificada que es muy resistente a las podredumbres y provee a la vid de una fuerte resistencia mecánica (Goffinet, 1999). Sin embargo, las lianas aparentemente compensan sus pequeños diámetros de tallos mediante la producción de vasos que poseen diámetros extremadamente grandes (300 μm) y largos -hasta 8 m en *Vitis labrusca* según medición de flujo de volumen de aire y penetración de partículas en el xilema (Zimmerman & Jeje, 1981) - que les permiten tener un muy eficiente transporte por varios años, pero que son considerados menos seguros debido al riesgo de daño mecánico y embolismo (bloqueo por aire) que puede suceder a consecuencia de congelamiento, estrés hídrico y ataque de patógenos (Ewers 1985). El embolismo en un vaso grande tendría un efecto más determinante sobre el transporte de agua que el embolismo de un vaso pequeño, y sería menos reversible. En especies de *Vitis* como *V. vinifera* que crecen en zonas templadas y estacionalmente áridas, los vasos se encuentran llenos de aire en invierno que es desplazado en primavera por la presión radicular antes de la emergencia de las hojas (Scholander *et al.*, 1955).

1.2 Podredumbres de la madera

La madera (resultante del crecimiento secundario) es el producto de cinco pasos principales que incluyen la división y expansión celular, el engrosamiento de la pared, la muerte celular programada y la formación del duramen que constituye la última transformación de las células xilemáticas. En un corte transversal de un árbol adulto se distingue la albura externa, que es la parte funcional del tronco, el duramen ubicado en el centro del tronco, y una zona intermedia. Luego de ser producidas por el cambium, las células del xilema mueren a excepción de las células del parénquima radial y longitudinal que permanecen vivas y funcionales durante varios años hasta que también mueren. En ese momento, cuando las células del parénquima mueren, es que el xilema se denomina duramen (Plomion *et al.*, 2001).

La composición y estructura química de la madera tienen una influencia significativa sobre su degradación por microorganismos y sobre los patrones del decaimiento resultantes. La pared celular de las células de la madera está compuesta por celulosa, lignina y hemicelulosa que se disponen formando la pared celular primaria externa y la secundaria más interna, compuesta por tres capas denominadas S1, S2, S3. Por dentro de ésta, se ubica el lumen. Por fuera de la pared celular primaria, se encuentra la laminilla media, que une a las células adyacentes (Figura 2).

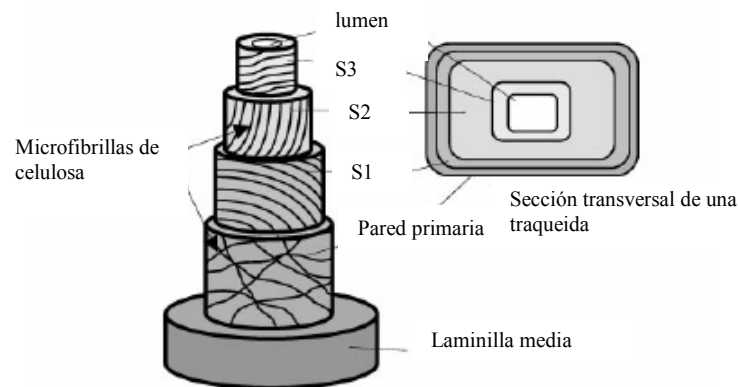


Figura 2. Estructura de la pared celular.
Tomado de Plomion *et al.*, 2001.

La celulosa, un polímero lineal de celobiosa (disacárido de glucosa), es el componente más abundante de la madera formando microfibrillas en la pared celular primaria y secundaria. La lignina es un polímero estructural formado por la unión de unidades de fenilpropano,

derivado de ácidos hidroxycinámicos, y cuya presencia brinda rigidez. La hemicelulosa es un polímero de monosacáridos como glucosa, manosa, xylosa, galactosa y ácido glucurónico. Hemicelulosa y lignina se ubican entre las microfibrillas de celulosa. La pectina es un heteropolisacárido compuesto por ácido poligalacturónico que alterna con regiones ramificadas que contienen ramnosa y arabinosa. Es un polisacárido estructural que integra la laminilla media y pared celular primaria de las células vegetales (Schwarze *et al.*, 2000).

La degradación de la madera ocurre principalmente por la acción de hongos. Se distinguen la podredumbre blanca, castaña y blanda de la madera. Los hongos que producen la podredumbre blanca de la madera atacan tanto la lignina como la celulosa y hemicelulosa de las paredes celulares. Pertenecen en su gran mayoría al grupo de los Basidiomycetes, aunque algunos Ascomycetes (Xylariaceae y Diatripaceae) pueden producir podredumbre blanca en Angiospermas. El ataque puede resultar en la pérdida simultánea de lignina, celulosa y hemicelulosa o en una remoción diferencial de uno o más componentes. Cuando la lignina es preferentemente removida de la pared celular y de la laminilla media, se genera un ablandamiento celular y las células se separan unas de otras. La hemicelulosa se pierde junto con la lignina debido a la cercana relación espacial entre ambas, mientras que la celulosa, de color blanco, permanece incambiada; posteriormente, ésta puede ser también atacada.

Los hongos que producen la podredumbre castaña son también Basidiomycetes, pero son menos abundantes. Esta podredumbre se caracteriza por una extensa degradación de la celulosa y hemicelulosa y una muy limitada degradación de la lignina, por lo cual la madera permanece de color oscuro.

Los hongos que producen la podredumbre blanda son Ascomycetes o Deuteromycetes que crean cavidades en la capa S2 de la pared celular y eventualmente de todas las capas de la pared celular secundaria. En angiospermas, la celulosa y hemicelulosa son degradadas antes que la lignina, que además sería digerida sólo en la proximidad de las cavidades de la pared secundaria (Eriksson *et al.*, 1990).

1.3 Enfermedades del tronco de la vid

Las enfermedades del tronco de la vid constituyen un grupo caracterizado por varias sintomatologías causadas por hongos, que afectan la madera de los distintos órganos permanentes de la vid: raíces, tronco, brazos. Las dolencias se denominan enfermedad de Petri, esca, brazo muerto, pie negro, y tienen como consecuencia la pérdida de vigor vegetativo, disminución de la capacidad fotosintética, reducción de la cantidad y calidad de la uva, y eventualmente la muerte de parte o de la totalidad de la planta de vid. Los daños pueden ocurrir tanto en las etapas tempranas de instalación como en la fase de producción provocando pérdidas económicas debido a una disminución del número de plantas. Varios hongos fitopatógenos han sido considerados como responsables de los síntomas típicos de cada enfermedad: *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Gams y *Phaeoacremonium* spp. en la enfermedad de Petri y esca (Mugnai *et al.*, 1999., Morton, 1999., Crous & Gams, 2000); *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. y *Eutypella* spp. en la eutipiosis (Moller & Kasimatis, 1978; Jordan & Schilder, 2005; Úrbez Torres *et al.*, 2009b), especies de *Botryosphaeria* en brazo negro muerto (Lehoczky, 1974; Van Niekerk *et al.*, 2006) y especies de *Cylindrocarpon* y *Campylocarpon* en el pie negro (Grasso *et al.*, 1975; Sweetingham 1983; Maluta & Larignon, 1991; Halleen *et al.*, 2004). Sin embargo, más allá de la certeza de que algunas especies y géneros de hongos son agentes causales de cada enfermedad, persisten dudas acerca de la patogenicidad de algunas especies menos conocidas que se encuentran asociadas a los síntomas y que podrían participar en el desarrollo de los mismos. En forma similar, existen dudas sobre los límites entre una enfermedad y otra debido a que algunas especies han sido aisladas de tejidos con síntomas diversos y característicos de más de una enfermedad. Además, el amplio rango de climas, suelos y técnicas agronómicas que afectan el cultivo de la vid agregan variabilidad al desarrollo de estas enfermedades.

Desde el punto de vista epidemiológico, estas enfermedades podrían ser consideradas como monocíclicas y poliéticas, es decir, con un único ciclo infectivo por año, pero con una tasa de crecimiento del número de plantas afectadas que crece a medida que pasan los años.

En Sudamérica, el conocimiento sobre estas enfermedades es escaso. En Uruguay, más allá de la observación de síntomas y el registro de pérdida de plantas, no se ha realizado un estudio a nivel nacional que permita entender la epidemiología de estas enfermedades.

1.3.1 Traqueomicosis: enfermedad de Petri y esca

Se denomina traqueomicosis o “phaeotraqueomicosis” al conjunto de síntomas de la planta de vid causado por la acción de los hongos *Phaeoconiella chlamydospora* y especies del género *Phaeoacremonium*, principalmente *P. aleophilum*, creciendo en el xilema de la vid. Cuando la traqueomicosis se manifiesta en plantas jóvenes, de menos de 5 años, se la denomina enfermedad de Petri; cuando ocurre en plantas adultas acompañada de la presencia de hojas atigradas pero sin podredumbre de la madera, se la denomina esca joven; cuando a estos síntomas se le suma la podredumbre blanca de la madera por actividad de hongos Basidiomycetes, se denomina esca completa o simplemente esca (Surico, 2009). La esca, así definida, sería un complejo de enfermedades de la planta adulta, en que la acción iniciadora de los hongos *Pa. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. es sucedida por la actividad de Basidiomycetes responsables de la podredumbre blanca de la madera.

Enfermedad de Petri

Se manifiesta en plantas jóvenes de vid por la reducción en el diámetro del tronco, entrenudos cortos, hojas pequeñas, follaje reducido y puntos o estrías marrones o negros en los vasos del xilema (Figura 3). Finalmente, las plantas mueren (Adalat *et al.*, 2000). En corte transversal del tronco, luego de unos minutos, se puede observar la aparición de una sustancia gomosa negra, mientras que en corte longitudinal, se observan los vasos con estrías discretas de color negro o marrón. Estas coloraciones corresponden a la producción y acumulación de polifenoles de la planta en respuesta a la presencia de estos hongos.



Figura 3. Corte transversal de una planta joven de vid con vasos necrosados y producción de una goma negra (“black goo”). Tomado de Del Rio *et al.*, 2004.

Esca joven

La traqueomicosis en la esca joven muestra los mismos síntomas descritos para la enfermedad de Petri, a los que debe agregarse la presencia de hojas atigradas que son el resultado de la producción y traslocación de metabolitos que afectan las hojas (Mugnai *et al.*, 1999) (Figura 4 a, b). Sin embargo, aunque históricamente estos síntomas son considerados típicos de la esca, su manifestación es variable y dependería de la participación de otros factores como, por ejemplo, la ocurrencia de lluvias que aumenten la disponibilidad de agua en la planta (Marchi *et al.*, 2006).



Figura 4. a y b: Síntoma de hojas atigradas. Tomado de Surico, 2009.

Esca

Los síntomas de la Esca aparecen en plantas de vid establecidas de más de 7 años de edad. Presenta una manifestación crónica, en que las plantas exhiben poco crecimiento, hojas atigradas, menor producción de fotosintatos, y una manifestación aguda en que la planta colapsa, usualmente en verano (apoplejía), produciéndose la muerte de la parte aérea. Se producen luego rebrotes en las zonas donde aun existe circulación de savia. Internamente, en un corte transversal, se observa podredumbre del xilema con distintas zonas y coloraciones que se corresponden con la acción de las diferentes especies fúngicas responsables de la traqueomicosis y de la podredumbre blanca que participan de la enfermedad (Figura 5 a, b, c).

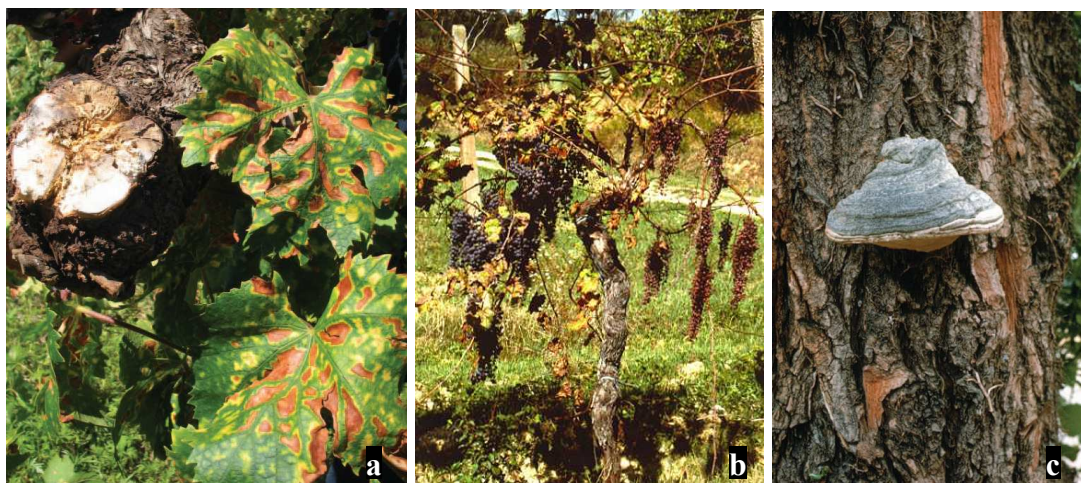


Figura 5. Síntomas de esca y signo del hongo.

- a: manifestación crónica con típicas hojas atigradas y podredumbre blanca de la madera,
 b: manifestación aguda de esca o apoplejía. Tomado de Mugnai *et al.*, 1999,
 c: carpóforo de *Fomes fomentarius* en un tronco de haya. Tomado de Graniti, 2006.

1.3.1.1 Organismos causales

Los hongos precursores de la enfermedad de Petri y esca son *Pa. chlamydospora* (sin teleomorfo conocido) y varias especies del género *Phaeoacremonium* (teleomorfo *Togninia*), principalmente *P. aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai, pero también otras especies *P. angustius* W. Gams, Crous & M.J. Wingf., *P. viticola* J. Dupont, *P. globosum* A.B. Graham, P.R. Johnst. & B. Weir, *P. australiense* L. Mostert, Summerb. & Crous y más de diez especies del mismo género cuya frecuencia de aparición es menor. Basidiomycetes de los géneros *Fomitiporia* e *Inocutis* desarrollan una acción secundaria, produciendo enzimas conducentes a la podredumbre blanca esponjosa que caracteriza a la esca cuando se ha desarrollado totalmente. Si bien el espectro de hongos precursores de la enfermedad de Petri y esca aparece como bastante uniforme, en los Basidiomycetes causantes de la podredumbre blanca la situación es diferente. *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. es principalmente europea y *Fomitiporia polymorpha* M. Fisch. ha sido citada en Norteamérica; *Inocutis jamaicensis* (Murrill) A.M. Gottlieb, J.E. Wright & Moncalvo y *Fomitiporella vitis* Auger, Aguilera & Esterio ocurren en Sudamérica, *Fomitiporia australiensis* M. Fisch., J. Edwards, Cunningt. & Pascoe y dos taxa desconocidos han sido registrados en Australia, y tres taxa desconocidos ocurren en Sudáfrica (Fischer, 2006).

1.3.1.2 Infección

En estudios histológicos sobre el modelo de infección de *Phaeoacremonium aleophilum* en plántulas en laboratorio, se ha visto que las esporas germinan en 24 horas sobre la superficie de raíces, y forman conidióforos y esporas antes de las 48 horas. Las esporas germinan y los tubos germinativos crecen sobre la superficie sin penetrarla, excepto cuando ocurre la formación de numerosos apresorios. En hojas, los tubos germinativos crecen sin un patrón definido, algunas veces pasando sobre los estomas, a través de los cuales nunca ocurre penetración. Cuando se inoculan esporas sobre una herida abierta en tallos, se observa como único síntoma la producción de necrosis que penetra desde el punto de inoculación extendiéndose por 5 mm. En el punto de inoculación, se registra un extenso crecimiento de las hifas en las células y espacios intercelulares de los tejidos, particularmente en la corteza y médula. En secciones de tallo alejadas del punto de inoculación, se observa que el crecimiento del hongo ocurre inicialmente a través de los espacios intercelulares de la epidermis, corteza, y medula, con formación de conidióforos y conidios. La Figura 6 muestra los conidióforos y las esporas de *P. inflatipes* W. Gams, Crous & M.J. Wingf. en el espacio intercelular de la médula (Feliciano & Gubler, 2001).

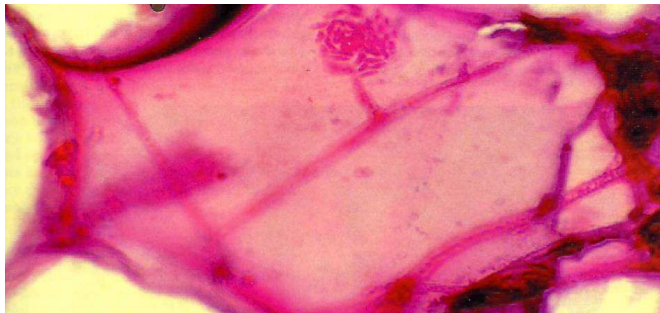


Figura 6. Corte transversal de un sarmiento infectado. Tomado de Feliciano & Gubler, 2001.

El floema y el xilema también son invadidos. Algunas células se llenan de gomas y masas de micelio generándose tilosis. Se observan numerosas hifas extendiéndose intracelularmente en los vasos del xilema (Figura 7) que pueden producir esporas, y pueden estar acompañadas o no de distintas cantidades de goma y tilosis (Feliciano & Gubler, 2001). La formación de tilosis en raíces infectadas por *Phaeoacremonium* spp. y *Pa. chlamydospora* ocurre por crecimiento o expansión de células del parénquima xilemático,

que invaden los vasos del xilema, obstruyéndolo (Del Río *et al.*, 2001). La presencia de grandes vacuolas indica que el crecimiento de las células del parénquima se debe a la entrada de agua (Figuras 8 y 9).

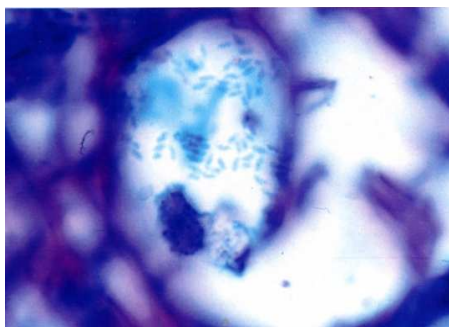


Figura 7. Corte transversal de sarmiento mostrando esporas de *P. aleophilum* en xilema. Tomado de Feliciano & Gubler, 2001.

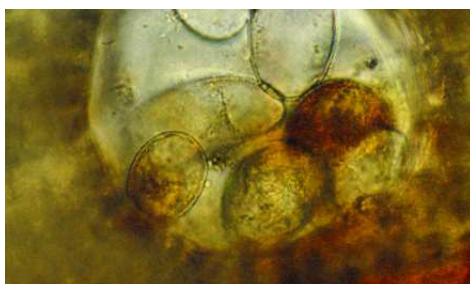


Figura 8. Corte transversal mostrando tilosis en xilema.

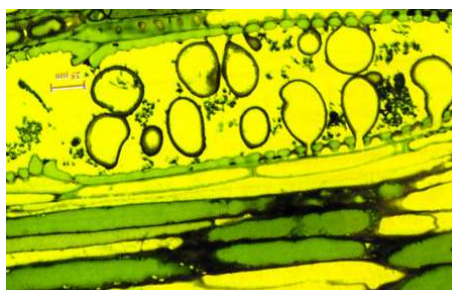


Figura 9. Corte longitudinal de raíz con tilosis. Tomado de Del Río *et al.*, 2001.

Inicialmente, la tilosis tiene una pared similar a la de una célula meristemática, pero su estructura cambia con el paso del tiempo, incluyendo modificaciones en la estructura de la pared celular y la aparición de estructuras cristalinas. La invasión del lumen del xilema por células del parénquima vecino está facilitada por un ablandamiento de las paredes celulares del xilema que no pueden resistir la presión de las células parenquimatosas con mayor

potencial hídrico. El ablandamiento de la pared del xilema, que es rica en lignina, puede ser explicado por la producción de enzimas lignolíticas por *Pa. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. (Del Río *et al.*, 2004).

También se registran cambios en los compuestos fenólicos, que se vuelven más abundantes en los vasos con tilosis, pasando de 12 g de ácido gálico/100 g peso fresco en raíces sin síntomas, a 34 g ácido gálico/ 100 g peso fresco en raíces con gran porcentaje de vasos con tilosis. En raíces muy infectadas, los taninos constituyen un 90% de los fenoles totales mientras que en raíces sanas, los taninos constituyen sólo un 41 % de los fenoles totales. El contenido de resveratrol también se triplica en raíces infectadas con respecto a raíces sanas. El aumento de los fenoles totales y de los taninos es una respuesta de la planta a la presencia de estos hongos, y extractos de raíces enfermas son capaces de inhibir el crecimiento in vitro de los mismos (Del Río *et al.*, 2001). Es sabido que la concentración de taninos condensados sube en plantas que son atacadas por microorganismos, ya sea por la nueva producción o removilización hacia la zona de presencia de los patógenos, para inhibir enzimas fúngicas (Byrde, 1963), para reforzar los componentes estructurales de la pared celular (Bell, 1981) o para formar una barrera química a las infecciones (Dai *et al.*, 1995). Cuando los taninos condensados son oxidados por las polifenoloxidasas, las quinonas producidas resultan muy tóxicas para los patógenos de plantas (Vidhyasekaran, 1988). Existe una gran variabilidad en el contenido de fenoles de los distintos cultivares de *V. vinifera*. Por ejemplo, se ha constatado que plantas del cv. “Aragonez” contienen la menor cantidad de fenoles constitutivos, y éstas parecen ser las más susceptibles a la colonización por *Pa. chlamydospora*. Por otra parte, aislamientos de esta especie pueden crecer en presencia de resveratrol y ácido tánico como única fuente de carbono en un medio con mínimos nutrientes, lo que sugiere que podría ser capaz de convertir enzimáticamente estos fenoles en derivados menos tóxicos (Martin *et al.*, 2009). La acumulación neta de fenoles dentro de los tejidos vegetales infectados por patógenos es probablemente controlado por el balance que puede resultar de la capacidad del hospedero de producirlos y de la capacidad del patógeno para metabolizarlo o detoxificarlo (Bruno & Sparapano, 2006). En ensayos de cocultivo entre callus de vid y aislamientos de *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum*, se observó que el callus del cultivar susceptible “Italia” contenía menos fenoles totales que el cv. “Matilde”, medianamente resistente a estos hongos. Por otra parte, el nivel de resveratrol fue igualmente reducido en ambos durante el cocultivo en comparación con el callus que crecía sin presencia de los patógenos. Esto confirmaría que

el resveratrol, una fitoalexina activa contra *Botrytis cinerea* Pers. , es fácilmente degradado por los hongos de la esca, y por lo tanto no constituiría una barrera eficaz contra estos hongos (Bruno *et al.*, 2006).

Producción de enzimas y fitotoxinas

P. chlamydospora y *P. aleophilum* producen metabolitos fitotóxicos, que junto a sustancias de defensa producidas por la planta (fenoles) y esporas de los patógenos pueden ser traslocados por la savia desde los tejidos leñosos enfermos hasta las partes aéreas. En bioensayos de fitotoxicidad, se observó el desarrollo de síntomas en hojas nutridas con savia obtenida de plantas infectadas con *Pa. chlamydospora*, *P. aleophilum* y *Fomitiporia mediterránea* M. Fisch., mientras que hojas nutridas con savia proveniente de plantas sin síntomas no produjeron síntomas visibles. Estos síntomas resultaron muy parecidos a los de esca: manchas cloróticas y necróticas, amarronamiento y enrojecimiento de grandes áreas y el colapso de tejidos entre las nervaduras. Los metabolitos fitotóxicos producidos por estos hongos son scytalona e isoclerona (compuestos pentacetónicos) y α - glucanos (exopolisacáridos), que son producidos y acumulados en tejidos vegetales infectados en cantidades suficientes para explicar los síntomas de toxicidad. La concentración más alta de scytalona en hojas con síntoma en plantas enfermas ha sido registrada a mitad del verano, cuando las típicas hojas atigradas aparecen en las vides afectadas por esca.

La presencia de fenoles como el ácido gálico en la savia y en las hojas fue mayor en el cv. “Matilde” que en el cv. “Italia”. Esto podría también ayudar a explicar la menor susceptibilidad del cv. “Matilde” a los hongos asociados a la esca (Bruno *et al.*, 2006).

Además de fitotoxinas, muchos hongos fitopatógenos producen enzimas extracelulares que son capaces de degradar componentes de la pared de la célula vegetal, como por ejemplo xilanasas, celulasas y pectinasas. Por otra parte, la relativa actividad de una o más de estas enzimas en cada aislamiento puede determinar su grado de virulencia. No se constató la producción de quitinasa, ni actividad lignino-peroxidasa por parte de especies de *Phaeoacremonium* y *Pa. chlamydospora*. Sin embargo, las especies de *Phaeoacremonium* (*P. aleophilum*, *P. angustius*, *P. viticola*) produjeron lacasa, una polifenoloxidasa involucrada en la degradación de la lignina. Todos los aislamientos produjeron proteasas, lipasas, amilasas, celulasa, xilanasas, pectinasa (poligalacturonasa), y ureasas. Especies de *Phaeoacremonium* mostraron mayor actividad xilanasas y celulasas que *Pa. chlamydospora*,

lo que podría representar una mayor capacidad de degradar la pared celular de tejidos leñosos. Con respecto a la pectina, *Phaeoacremonium* mostró actividad pectatoliasa y poligalacturonasa, mientras que *Pa. chlamydospora* sólo mostró actividad poligalacturonasa. Las especies de *Phaeoacremonium* resultaron más homogéneas en la actividad de estas enzimas mientras que aislamientos de *Pa. chlamydospora* presentaron mayor variabilidad (Santos *et al.*, 2006).

1.3.2 Brazo muerto de la vid

El brazo muerto de la vid comprende varias patologías similares causadas por hongos de diferentes especies. Debido a esto, el síntoma suele ser nombrado asociado al género de hongos indicado como responsable en cada caso: Eutipiosis o *Eutypa dieback* y Brazo negro muerto también llamado *Botryosphaeria canker*. En la actualidad *Phomopsis* no es considerada responsable del síntoma de brazo muerto, mientras que *Eutypa lata* y especies de *Botryosphaeria* lo son pero con algunas variaciones en los síntomas externos que se producen en la planta afectada. *E. lata* se ve favorecida por climas más fríos y húmedos en comparación con ciertas especies de *Botryosphaeria* que son dominantes en regiones más calidas y secas, mientras que las distribuciones de ambas pueden sobreponerse como ocurre en extensas áreas del norte y centro de California (Úrbez-Torres *et al.*, 2006a). Se desconoce la preeminencia de uno u otro género en otras regiones vitícolas del mundo. Se la considera una enfermedad de la planta adulta, ya que la aparición de síntomas ocurre varios años después de ocurrida la infección de los tejidos.

1.3.2.1 Eutipiosis

Los síntomas se pueden observar al comienzo de la estación de crecimiento. Incluyen brotes achaparrados con hojas pequeñas, cloróticas y en forma de copa (Figura 10 a, b) que pueden deberse a la acción de fitotoxinas producidas por *Eutypa lata* y traslocadas desde la madera más vieja (Mauro *et al.*, 1988). En un corte transversal de la madera vieja afectada, puede observarse la presencia de necrosis con coloración oscura, en forma de V y consistencia firme (Figura 10 c). Esta podredumbre, más allá de tener una textura firme, se clasifica como podredumbre blanda por resultar de la acción de Ascomycetes y Deuteromycetes (Rolshausen, 2007). Los síntomas internos y externos aparecen en la

planta varios años después de ocurrida la infección (Moller & Kasimatis, 1978). La muerte del cordón, o de la planta entera, puede ocurrir varios años después de la aparición de los síntomas (Rudelle *et al.* 2005). Luego de la pérdida del ritidoma en la zona donde se produjo el cancro, *E. lata* produce estromas de color negro conteniendo numerosos peritecios con ascosporas (Carter, 1996).



Figura 10. Síntomas de Eutipiosis.

a y b: síntomas foliares producidos por *E. lata* con hojas en forma de copa,
c: necrosis sectorial producida por *E. lata*. Tomado de Sosnowski & Loschiavo, 2010.

1.3.2.1.1 Organismos causales

El síntoma descrito como eutipiosis ha sido atribuido a la acción del hongo *Eutypa lata* (sinónimo *E. armeniacae*; anamorfo *Libertella blepharis*) (Moller & Kasimatis, 1978). Esta especie había sido previamente citada como endófito en Australia en 1957 (Carter, 1957) y California en 1968 (Moller, 1968). La disparidad en la producción de metabolitos secundarios entre aislamientos de *E. lata* podría explicar parcialmente su variación en virulencia y podría deberse al hecho de ser *E. lata* una especie que se reproduce sexualmente, lo que afectaría ésta y otras características fenotípicas. *Eutypella vitis* (Schwein.) Ellis & Everh. (sinónimo *E. aequilinearis*) ha sido aislada de canchros de los que también se aisló *E. lata* (Catal *et al.*, 2007). Estas especies tienen similares características en cultivo por lo cual la diferenciación entre ambas se basa en el análisis de regiones de su ADN. La patogenicidad potencial de esta especie ha sido demostrada en estacas de vid (Jordan & Schilder, 2005).

1.3.2.1.2 Infección

E. lata infecta plantas principalmente a través de heridas de poda, y luego invade el sistema vascular de brotes y troncos produciendo la típica necrosis en forma de V que es visible en el corte transversal de los tejidos leñosos. El tipo de podredumbre causado por *E. lata* en la madera es clasificada como una podredumbre blanda. Los síntomas en las partes aéreas aparecen luego de un periodo de incubación de tres a cuatro años.

Producción de enzimas y fitotoxinas

El análisis de madera infectada revela que glúcidos no estructurales como el almidón y estructurales como la hemicelulosa son los sustratos de *E. lata*. La actividad enzimática degradadora del almidón sugiere que está destinado a satisfacer las demandas de energía del hongo. Si bien *E. lata* también mostró producción de enzimas con actividad lignolítica y polifenoloxidasas, se ha visto que tejidos infectados suelen mostrar mayor proporción de lignina. Esto podría deberse a la deposición de nueva lignina formada como respuesta del hospedero a la presencia del patógeno, o debido a que la degradación de la lignina resulta más lenta que la de hemicelulosa y otros compuestos más fácilmente degradados (Rolshausen *et al.*, 2006). La eutypina y otros péptidos tales como eulatachromeno, eulatinol, eutypinol, metileutypinol y sicayna (Rolshausen *et al.*, 2006) secretados por *E. lata* en la madera afectada son transportados por el xilema hacia las hojas en las que afectan la estructura y función de las membranas plasmática, mitocondriales, y plastidiales (Deswarte *et al.*, 1994). Se observó hinchazón de los cloroplastos con dilatación de los tilacoides e inhibición de la fotosíntesis, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en mitocondrias, y alteraciones del flujo de protones en la membrana plasmática de células de la hoja en vid. Así, parte de los efectos de las toxinas se debe a una reducción progresiva de la energía de las células que podría llevar a una situación de privación metabólica (Rolshausen *et al.*, 2006).

1.3.2.2 Brazo negro muerto o *Botryosphaeria* Canker

Cuando las especies de *Botryosphaeria* son los agentes causales del brazo muerto, en corte transversal del tronco no es posible distinguir la podredumbre (Figura 11 b, c) de aquella provocada por *E. lata* (Figura 10 c). Sin embargo, la manifestación externa es diferente, pudiendo también incluir fallas en la brotación, defoliación y brotes de menor porte (Figura 11 a). Las especies de *Botryosphaeria* raramente forman el teleomorfo en campo (Van Niekerk *et al.*, 2006).



Figura 11. Brazo negro muerto.

a: fallas en la brotación de pulgares, b: necrosis sectorial vista en corte transversal, c: puntos castaños y negros difusos sin producción de goma vista en corte transversal del tronco. Tomado de Van Niekerk *et al.*, 2006.

1.3.2.2.1 Organismos causales

Especies del género *Botryosphaeria* (teleomorfo) han sido aisladas con gran frecuencia de tejidos necróticos similares a los producidos por *E. lata*. Es conocido que especies de este género pueden ser patógenas, saprofitas o endófitas de angiospermas y gimnospermas (Denman *et al.*, 2000). Si bien la morfología de los teleomorfos difiere poco entre especies, un amplio rango de morfologías puede ser observado entre los anamorfos y es por lo tanto a partir de ellos que es posible la distinción de especies. Los anamorfos de las especies de *Botryosphaeria* son actualmente atribuidos a los géneros *Fusicoccum* Corda, *Neofusicoccum* Crous, Slippers y Everh., *Diplodia* Fr., *Lasiodiplodia* Ellis y Everh. y *Dothiorella* Sacc. (Crous & Palm 1999, Denman *et al.*, 2000, Phillips *et al.*, 2005). *Diplodia* y *Lasiodiplodia* están caracterizados por la producción de conidios con paredes gruesas y pigmentadas, *Fusicoccum* y *Neofusicoccum* producen en general conidios de paredes delgadas y hialinos, y en el caso de *Neofusicoccum parvum* forman septos

transversales y se pigmentan con el tiempo (Crous *et al.*, 2006). *Dothiorella* se caracteriza por la producción de conidios similares a los de *Diplodia* y ascosporas septadas (Phillips *et al.*, 2005). *Botryosphaeria australis* Slippers, Crous & M.J. Wingf., *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not., *Botryosphaeria lutea* A.J.L. Phillips, *Botryosphaeria obtusa* (Schwein.) Shoemaker, *Botryosphaeria parva* Pennycook & Samuels, *Botryosphaeria rhodina* (Berk. & M.A. Curtis) Arx 1970, *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker 1964, *Botryosphaeria iberica* A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves 2005 y *Botryosphaeria viticola* A.J.L. Phillips & J. Luque 2006 fueron aisladas de canchros en plantas de vid en California (Úrbez Torres *et al.*, 2006a). En España, las especies *B. obtusa*, *B. dothidea* y *B. parva* han sido citadas asociadas a síntomas similares, (Úrbez-Torres *et al.*, 2006b). Más recientemente, se ha demostrado la patogenicidad de aislamientos de todas estas especies, aunque la virulencia fue variable (Úrbez-Torres & Gubler, 2009). Estos autores encontraron que *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. fue la especie más virulenta, seguida por *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, y *Neofusicoccum australe* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, todas categorizadas como altamente virulentas. *B. dothidea* fue considerada medianamente virulenta, y *Diplodia mutila* (Fr.) Mont., *Diplodia seriata* De Not., *Dothiorella ibérica* A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves, y *Dothiorella viticola* A.J.L. Phillips & J. Luque, fueron evaluadas como débilmente virulentas.

1.3.2.2.2 Infección

Producción de fitotoxinas

Especies de este género producen sustancias que resultaron fitotóxicas para hojas de vid *in vitro*. *N. luteum*, *D. viticola*, *Diplodia seriata* y *Fusicoccum aesculi* Sacc. producen compuestos hidrofílicos de alto peso molecular, probablemente exopolisacáridos. *N. luteum* y *N. parvum*, cuyos extractos han demostrado la fitotoxicidad mayor, contienen además fitotoxinas lipofílicas de bajo peso molecular (Martos *et al.*, 2008). *B. dothidea* (*F. aesculi*) produce melleina e hidroximelleina, fitotoxinas producidas por varios hongos como *Aspergillus ochraceus* y *Cercospora taiwanensis* (Moore *et al.*, 1972, Camarda *et al.*, 1976). En aislamientos de esta especie, también se ha comprobado la producción de lacasa, responsable de la oxidación del resveratrol en madera infectada (Djoukeng *et al.*, 2009).

1.3.3 Pie negro

El pie negro de la vid es una enfermedad que afecta las raíces y cuello de la planta de vid de menos de diez años en la mayoría de las regiones vitícolas. Existen descripciones desde el año 1961 (Larignon, 1991; Grasso & Magnano di San Lio, 1975) cuando se lo asoció a especies de hongos del género *Cylindrocarpon*. Los síntomas internos son estrías negras en la base del tronco de la planta (Figura 12 a) e inclusiones de goma en los vasos del xilema. Se observó una decoloración castaña oscura que subía 15 cm desde el suelo y que también era visible en la porción del tronco por debajo de éste, la que se adentraba en las raíces más grandes (Sweetingham, 1983). Los síntomas externos incluyen retrasos en la brotación de yemas en la primavera (Figura 12 b), brotes pequeños de entrenudos cortos con hojas que presentan clorosis y necrosis internerval (Halleen *et al.*, 2004, 2006a).



Figura 12. Pie negro.

a: necrosis ascendente desde la base del tronco. Tomado de Alaniz, 2008,

b: síntomas foliares: yemas que no brotan y brotes débiles. Tomado de Halleen *et al.*, 2006a.

1.3.3.1 Organismos causales

Cylindrocarpon Wollenw. y *Campylocarpon* Halleen, Schroers & Crous son anamorfos descritos como “*Cylindrocarpon*” y de cuyas especies se reconocen actualmente teleomorfos pertenecientes a varios géneros. Entre las especies de anamorfos que se encuentran en vid se distinguen como patógenos a *Cylindrocarpon liriodendri* J.D. MacDon. & E.E. Butler (teleomorfo *Ilyonectria* ex *Neonectria*), *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten var. *destructans*, Netherl., ex *C. radícolica*, (teleomorfo *Ilyonectria radícolica*, ex *Neonectria* y *Nectria*), *Cylindrocarpon macrodidymum* Schroers, Halleen & Crous (teleomorfo *Ilyonectria macrodidyma*, ex *Neonectria*), *Cylindrocarpon olidum* var. *olidum* (Wollenw.) Wollenw., (teleomorfo *Thelonectria olida*), *Campylocarpon*

fasciculare Schroers, Halleen & Crous y *Campylocarpon pseudofasciculare* Halleen, Schroers & Crous sin teleomorfo conocido (Halleen *et al.*, 2004, 2006a, Chaverri *et al.*, 2011). *C. pauciseptatum* Schroers & Crous posiblemente sea también patógeno de la vid (Cabral *et al.*, 2009). En la vid, *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* han sido encontrados en las raíces, en la madera del portainjerto, principalmente desde la base, y en la zona del injerto y son considerados agentes causales principales de la enfermedad (Rego *et al.*, 2000; Petit & Gubler; 2005, Alaniz, 2008).

1.3.3.2 Infección

C. liriodendri y *C. macrodidymum* infectan a la vid por las raíces, pero también pueden ingresar a la planta por la herida del injerto (Alaniz *et al.*, 2008). En Tasmania, la incidencia del pie negro se ha asociado a problemas de drenaje en el suelo. Las plantas de vid enfermas mueren como resultado de la oclusión de los vasos del xilema por tilosis. En el corte transversal, se observa que la mayoría de los vasos están bloqueados con tilosis, y los elementos del floema funcional también contienen sustancias gomosas. Las hifas del hongo están presentes en el parénquima radial del floema y del xilema joven, que es rico en almidón. Las hifas no son visibles dentro de los vasos, y raramente en los elementos del floema (Sweetingham, 1983).

Producción de enzimas y fitotoxinas

En Australia, aislamientos de *Cylindrocarpon* spp. mostraron producción *in vitro* de Brefeldina A, un compuesto con acción fitotóxica y antifúngica. Este compuesto podría inhibir a otros hongos y favorecer el establecimiento de *Cylindrocarpon* en la rizósfera (Sweetingham, 1983). Se ha visto que esta fitotoxina tiene la capacidad de inhibir la mitosis en la punta de raíces de *Vicia faba* (Betina & Murin, 1964) y esto sería consistente con el daño producido en otras especies vegetales. Sin embargo, este compuesto no pudo ser detectado en raíces enfermas de plantas de vid (Sweetingham, 1983). Aislamientos de estas especies también producen poligalacturonasas, pectinliasas y amilasas *in vitro* (Sweetingham, 1983). Por otra parte a partir de filtrados de cultivos de *Nectria radicola* Gerlach & Nilsson se identificó una fracción peptídica "radicolin" y una sustancia fenólica radicol, igual a otra descrita anteriormente y denominada monorden (Mirrington *et al.*, 1966).

1.4 Hipótesis

Las enfermedades del tronco de la vid en Uruguay se encuentran asociadas a especies de hongos patógenos que integran una comunidad cuya composición varía según los síntomas presentes en las plantas de vid, los cultivares y las regiones agroclimáticas donde se realiza el cultivo de la vid.

La dispersión de los hongos puede ocurrir a través de los plantines obtenidos mediante reproducción vegetativa a partir de plantas madres contaminadas pero asintomáticas.

Existen diferencias en la patogenicidad y virulencia entre los aislamientos fúngicos locales de especies patógenas poco conocidas.

1.5 Objetivos

Objetivo general

Analizar la comunidad de hongos fitopatógenos asociados a las enfermedades del tronco de la vid en Uruguay

Objetivos específicos

Identificar las especies de hongos patógenos asociados a síntomas de las enfermedades del tronco de la vid en los principales cultivares implantados en todas las regiones vitícolas de Uruguay.

Establecer la relación entre síntomas, cultivares y regiones con las especies patógenas identificadas.

Detectar tempranamente la presencia de las principales especies patógenas en plantas de vid asintomáticas usadas para la multiplicación vegetativa.

Determinar la patogenicidad y virulencia en vid de los aislamientos obtenidos de especies patógenas poco conocidas.

CAPÍTULO 2

COMUNIDAD FÚNGICA ASOCIADA A LAS ENFERMEDADES

DEL TRONCO DE LA VID

2.1 Introducción

Se estima que existen más de 1,5 millones especies de hongos de las que sólo se han identificado entre un 5 y un 10 % (Hawksworth, 2001). En la actualidad, se acepta que el criterio para el reconocimiento de las especies fúngicas puede ser morfológico, biológico y filogenético. El análisis filogenético de secuencias de ADN se acerca más al concepto evolutivo de especie que las definiciones morfológica y biológica. El reconocimiento filogenético de especies resulta más ajustado porque una vez que la progenie de especies evolutivas se ha formado a partir de un ancestro, los cambios en la secuencia de nucleótidos pueden ser reconocidos antes que sucedan cambios en el patrón de apareamiento (especie biológica) o en la morfología (especie morfológica) (Taylor, 2000). La región ITS del ADN ribosomal ha sido propuesta como código de barras para la identificación de especies de hongos, siempre que sea mayor de 500 pb. En especies en que los amplicones son menores, la variación de la región ITS es insuficiente para la identificación inequívoca de especies y en estos casos la subunidad grande del ADN ribosomal (LSU) u otros genes podrían ser utilizados para la identificación de especies (Seifert, 2009).

En ecología, los métodos basados en la morfología son la manera clásica de identificar especies y evaluar la diversidad *in situ* (Smith *et al.*, 2002). Uno de los resultados más útiles de un estudio clásico es una lista de las especies encontradas, que permite comparar datos a través de diversos sitios, estudios, y diferentes grupos taxonómicos o ecológicos. La combinación de distintas listas de especies de múltiples estudios permite disponer de información básica acerca de las especies individuales tales como rango geográfico, relaciones con el hospedero y distribución ecológica. Las comunidades fúngicas de áreas diferentes pueden ser comparadas para determinar patrones de diversidad de especies. Finalmente, datos de distintos estudios se pueden combinar para detectar los factores biológicos y ambientales que influyen en la estructura de las comunidades fúngicas a una escala mayor (Schmit & Lodge, 2005).

Por otra parte, los métodos de detección de la presencia de microorganismos en un sustrato pueden estar basados en la detección de su ADN. La disciplina de la ecología molecular surgió en 1990 con el desarrollo de la técnica de PCR. En pocos años se progresó en el desarrollo de cebadores para hongos (White *et al.*, 1990) y en la aplicación de PCR en muestras ambientales para el análisis de la comunidad sin necesidad de cultivo. Si bien esta técnica puede usarse en cualquier gen, el ADN ribosomal ha sido el más utilizado en hongos porque se encuentra en múltiples copias en todos los organismos y comprende dominios muy conservados (Bidartondo & Gardes, 2005).

En comparación con los métodos moleculares, los métodos clásicos presentan algunas limitaciones. Algunas especies pueden no crecer en cultivo, y por lo tanto no podrán ser identificadas a través de los métodos clásicos, o bien pueden crecer pero no producir fructificaciones en cultivo sobre las que se basa su clasificación tradicional. Estas desventajas pueden causar una identificación incompleta de las especies que componen una comunidad determinada generando una distorsión en los resultados. Existen variaciones de este método que se adaptan a las distintas manifestaciones de los hongos: colecta oportunista de cuerpos fructíferos, colecta basada en sustratos discontinuos, colecta en transectas para hongos que varían de acuerdo a un gradiente, cámara húmeda y cultivo para hongos que no fructifican pero se encuentran presentes y pueden manifestarse en condiciones de cultivo. Los datos que se generan pueden ser analizados estadísticamente en estudios de diversidad a través de curvas de acumulación de especies y métodos multivariados. Los más frecuentes son el análisis de *cluster* y los métodos de ordenación, que permiten agrupar u ordenar un número de sitios en base a las similitudes determinadas a través del análisis de un número de variables. En un estudio exploratorio no hay una hipótesis específica para probar, y es de interés agrupar sitios u hospederos en base a la similitud entre comunidades fúngicas (Schmit & Lodge, 2005).

2.2 Objetivos

Identificar las especies de hongos patógenos asociados a síntomas de las enfermedades del tronco de la vid en todas las regiones vitícolas de Uruguay.

Establecer la relación entre síntomas, cultivares y regiones con las especies patógenas identificadas.

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Reconocimiento de síntomas

En el caso de la enfermedad de Petri, las plantas sintomáticas fueron identificadas dentro de cuadros de vid recientemente implantados e integrados por plantines mayoritariamente sanos con abundante desarrollo vegetativo (Figura 13 a). Entre éstos, se constató la presencia de plantines con escaso desarrollo foliar (Figura 13 b), con puntos oscuros en el corte transversal del tronco, característicos de la enfermedad de Petri (Figura 13 c).



Figura 13. 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.

Las plantas de vid con esca crónica se identificaron en cuadros en producción. Estas eran plantas adultas con escaso desarrollo foliar (Figura 14 a), en las que el corte transversal del tronco permitió observar una podredumbre con coloraciones blancas, amarillas y pardas, de textura blanda y límites irregulares (Figura 14 b). Las vides con esca aguda se identificaron por el colapso del follaje y la ocurrencia de rebrotes tardíos en las partes sanas del tronco (Figura 14 c). En algunos casos, se observó la presencia, sobre el tronco afectado, de basidiocarpos producidos por hongos Basidiomycetes (14 d).



Figura 14. Síntomas externos y signo de la esca. a: esca crónica, b: podredumbre blanca, c: apoplejía, d: basidiocarpo de *Inocutis jamaicensis* (signo) en tronco viejo de vid.

Las vides con brazo muerto fueron identificadas por la presencia de pulgares con yemas que no brotaron (Figura 15 a), que internamente presentaban tejidos necrosados (Figura 15 b). En el corte transversal de los brazos y tronco principal, se observó la podredumbre sectorial de color oscuro y consistencia firme en forma de V (Figura 15 c).

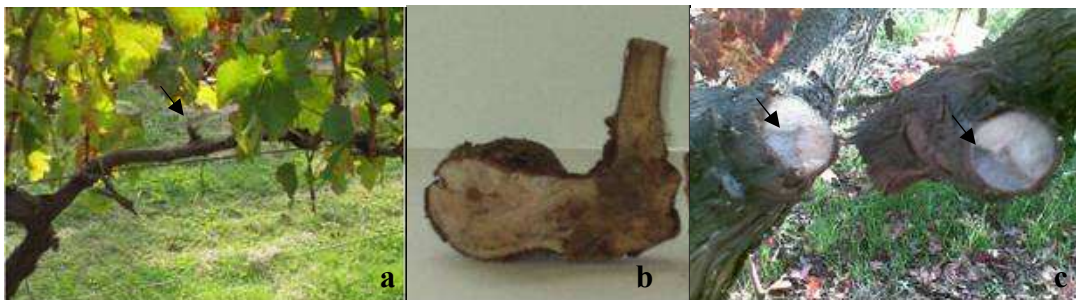


Figura 15. Síntomas de brazo muerto. a: pulgar con yemas que no brotan, b: pulgar con tejidos internos necrosado c: necrosis en “V” descendente

Las vides con pie negro fueron identificadas por el retraso observado en la brotación de las yemas al inicio de la primavera (Figura 16 a), y la presencia de raíces oscurecidas por debajo de la corteza (Figura 16 b).



Figura 16. Síntomas de pie negro. a: retraso y fallas de brotación, b: raíces oscurecidas

2.3.2 Cuantificación de síntomas externos

Se realizó un relevamiento de vides con los síntomas de brazo muerto, esca y enfermedad de Petri en las regiones vitícolas de Artigas, Salto, Paysandú, Rivera, Tacuarembó, Durazno y Canelones. Las variedades seleccionadas fueron Tannat, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc y Sauvignon Blanc debido a que son cultivadas en todas las regiones vitícolas del país e importantes comercialmente en la elaboración de vinos. Los cultivares Marcelan y Merlot fueron relevados en dos viñedos debido a que éstos ocupan un área menor en relación a los otros y a que no se encuentran en todas las regiones del país. Los síntomas de

pie negro, que externamente pueden ser confundidos con cualquiera de los anteriores, no fueron considerados. Consecuentemente, algunos de los registros de estos síntomas pueden incluir plantas que en realidad padeciesen de pie negro. Se contaron entre 300 y 600 plantas de cada cultivar (Anexo 6A) ubicadas en filas elegidas al azar en cada punto de observación.

2.3.3 Obtención de muestras de material vegetal

Se realizó el muestreo de plantas de vid con síntomas externos de las enfermedades del tronco de la vid en todas las regiones vitícolas del Uruguay comprendidas en los departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, Rivera, Tacuarembó, Durazno, Colonia, San José, Canelones, Montevideo y Maldonado (Figura 17). 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, en que los síntomas externos no son fácilmente diferenciables, el muestreo fue menor, y 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.

Las muestras fueron etiquetadas y transportadas al laboratorio para su inmediato procesamiento.



Figura 17. Sitios de muestreo

2.3.4 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%, 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 temperatura ambiente durante cuatro semanas para permitir la emergencia de los hongos buscados. Los segmentos que inicialmente 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. Todos los aislamientos obtenidos fueron repicados a dos placas de cultivo conteniendo medio PDA destinadas una para extracción de ADN y otra para observación y descripción macro y microscópica.

2.3.5 Identificación de especies

2.3.5.1 Identificación morfológica

Cultivo y observación microscópica

El cultivo de los hongos para la identificación de géneros y especies se realizó en medio PDA (Samson *et al.*, 1995).

En el caso de algunos géneros, se llevó a cabo el cultivo en medios y condiciones de cultivo diferenciales para permitir el desarrollo de caracteres fenotípicos que pudiesen ser usados para la identificación de las especies. Los aislamientos de *Phaeoacremonium* fueron cultivados en placas conteniendo extracto de Malta-Agar 2% (MEA) a 25° y 37° C. Los aislamientos de *Botryosphaeria* fueron cultivados en agar agua con acículas de pinos con el fin de facilitar la producción de conidios (Samson *et al.*, 1995).

Se observó y registró la producción de pigmentos y estructuras reproductivas.

2.3.5.2 Identificación filogenética

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 & 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 ITS 5 que amplifican la totalidad de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal (ITS1 y ITS2) y la subunidad ribosomal 5.8S, e incluyen el extremo 3' de la subunidad pequeña del ADNr (SSU) y el extremo 5' de la subunidad grande del ADNr (LSU) (White *et al.*, 1990). En especies en que la región ITS no resultó informativa, se amplificaron y secuenciaron otras regiones del genoma. En aislamientos del género *Phaeoacremonium* se amplificó parte del gen que codifica para la β -tubulina con los cebadores T1 y β t2b (O' Donnell & Cigelnik, 1997; Glass & Donalson, 1995). En aislamientos del género *Greeneria* se amplificó una parte de la región LSU del ADN ribosomal con los cebadores LR0R y LR7 (Vilgalys & Hester, 1990). En el caso de algunos aislamientos del género *Botryosphaeria*, se amplificó una sección del gen que codifica para la subunidad de la ARN polimerasa II con cebadores RPB2bot6F y RPB2botR (Sakalidis, 2004). (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de los cebadores y tamaño esperado de los productos de amplificación

Cebadores	Secuencia	Tamaño en pb
ITS 4/ ITS 5	5'-tcctccgcttattgatatgc-3'/5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3'	600
T1 / β t2b	5'-aacatgcgtgagattgtaagt-3'/5'-accctcagtgtagtacccttggc-3'	600
LR0R / LR7	5'-accgcgtgaacttaagc-3'/5'-tactaccaccaagatct-3'	1300
RPB2bot6F/ RPB2botR	5'- ggtagcgacgtcactccc-3'/5'-ggatggatctcgcaatgcg-3'	500

Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio en luz ultravioleta y secuenciados por Macrogen, Seul, Corea.

La reacción de amplificación se realizó en 25 µl de volumen final, con un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 min, 35 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 94°C), hibridación (30 segundos a 50 °C) y extensión (1 min a 72°C). Se secuenciaron las dos hebras de ADN con los mismos cebadores y ambas secuencias fueron alineadas con el programa CLUSTAL W y corregidas manualmente utilizando el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) antes de ser comparadas mediante el algoritmo Blast con las secuencias registradas en el GenBank (www.ncbi.nlm.gov). Se usó una selección de secuencias para lograr el reconocimiento de las especies mediante su análisis filogenético. Las secuencias propias usadas para este análisis fueron suministradas al GenBank y sus códigos de identificación se encuentran indicados en los árboles filogenéticos producidos.

Análisis filogenético

El análisis filogenético fue realizado mediante el programa PAUP 4-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.

2.3.6 Análisis de datos

Se generaron listas de las especies encontradas asociadas a los distintos síntomas, cultivares y regiones. Se contabilizó un aislamiento de cada especie patógena o potencialmente patógena identificada por planta sintomática. Las especies se agruparon por géneros. (Anexo 1). Se generaron matrices de la abundancia de los géneros en relación con los síntomas, cultivares y regiones, del tipo sitio-especie (Anexos 2A, 3A, 4A). A partir de éstas, se formularon matrices con la densidad relativa de cada género (Anexos 2B, 3B, 4B) 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) que muestra los sitios ordenados en un espacio determinado por dos ejes que resumen el efecto de las variables, generándose tablas de Eigenvalue, Score y Relay index (Anexos 2 C, D, E; 3 C, D, E; 4 C, D, E).

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 dos matrices diferentes. La matriz géneros-regiones (Anexo 4 A) contiene la totalidad de los registros obtenidos en todas las regiones muestreadas y fue usada para generar una tabla de densidad relativa y análisis de correspondencia como ya fue descrito. A partir de ésta, se generó una matriz de géneros-regiones que excluyó las regiones y géneros submuestreados. Se generó la respectiva matriz de densidad relativa y el correspondiente análisis de correspondencia (Anexo 5 A, B, C, D, E, F)

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 (Anexo 6 A), se crearon tablas en base 100 (Anexo 6 B), a partir de la cual se generó la matriz de frecuencia relativa de síntomas externos que se analizó mediante análisis de correspondencia (6 C). Se generaron tablas de Eigenvalue, Score y Relay Index (Anexo 6 D, E, F).

2.4 Resultados

2.4.1 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: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Cadophora luteo-olivacea* (J.F.H. Beyma) T.C. Harr. & McNew, *Campylocarpon pseudofasciculare*, *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodidymum*, *C. olidum* var. *olidum*, *C. pauciseptatum*, *Eutypella vitis*, *Neofusicoccum parvum* (B. parva), *N. luteum* (B. lutea), *Fusicoccum aesculi* (B. dothidea), *Diplodia seriata* (B. obtusa), *Greeneria uvicola* (Berk. & M.A. Curtis) Punith., *Inocutis jamaicensis*, *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc.

2.4.1.1 *Phaeomoniella 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 18 c, d). A nivel microscópico, se observaron las células apicales hialinas sobre células basales de pared engrosada, e hifas con abultamientos similares a clamidosporas (18 a, b). Los aislamientos fueron muy semejantes morfológicamente y tuvieron una alta homología (99 %) en las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal (ver Anexo 7 A,B).

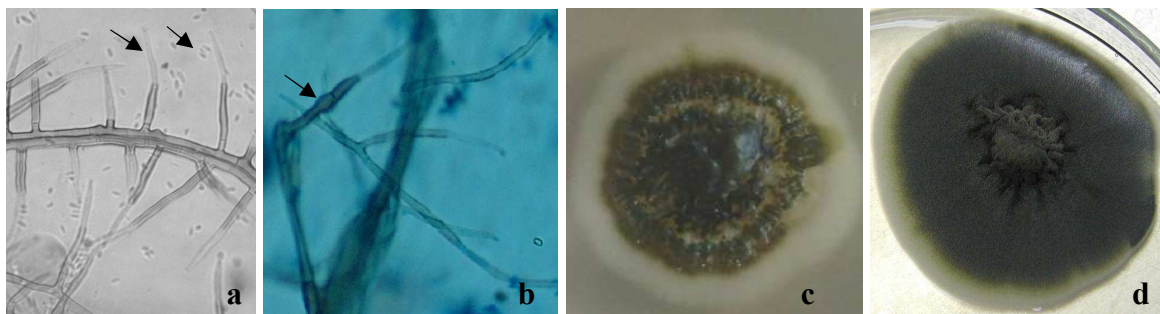


Figura 18. Micromorfología y aspecto de la colonia de *Phaeomoniella chlamydospora*.

a : fiálides con células apicales hialinas y conidios, b: abultamiento de las hifas
c,d: colonia color verde oliva de 2 y 4 semanas de crecimiento respectivamente.

2.4.1.2 *Phaeocremonium* spp.

Se obtuvieron 33 aislamientos de *Phaeocremonium* spp.

Mediante el crecimiento a 25° y a 37° se establecieron distintos grupos morfo-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 19). 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 crecimiento 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); otras cepas no crecieron a 37°C. La morfología tipo (I) fue obtenida de muestras provenientes de los departamentos de Colonia y Rivera solamente (Figura 20).

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 *Phaeocremonium* representativos de todos los morfotipos, fue usada en un análisis filogenético basado en la secuencia parcial del gen que codifica para la β -tubulina junto a 29 secuencias obtenidas del Genbank. Después del 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 21 (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. Si bien la mayoría de los aislamientos pertenecieron a *P. aleophilum*, las diferencias observadas en su crecimiento a 37° C son indicativas de diferencias fisiológicas entre ellos.

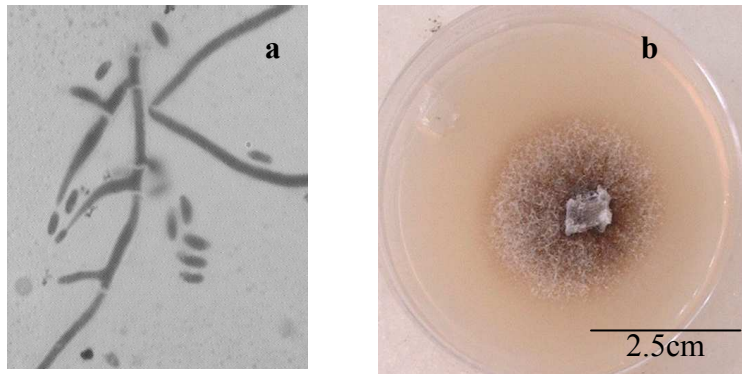


Figura 19. Micromorfología y aspecto de la colonia de *P. aleophilum* en PDA a 25° C.
a: conidiogénesis y conidios, b: colonia castaña de 20 días de crecimiento.

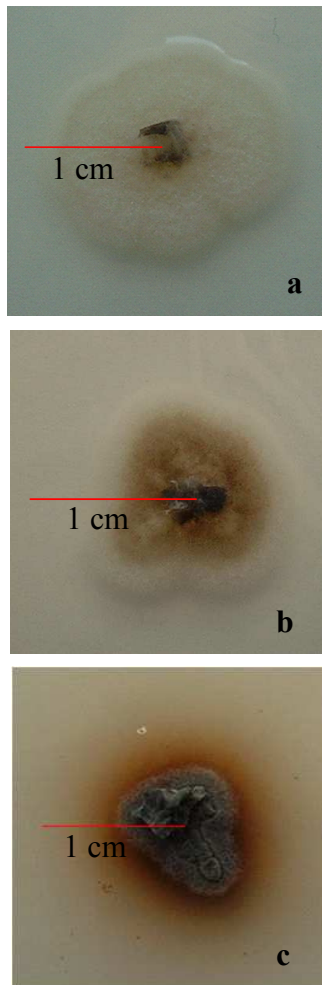


Figura 20. Morfotipos de *P. aleophilum* creciendo a 37° C en medio de cultivo MEA.
a: morfología del tipo I, b: morfología del tipo II, c: morfología del tipo III

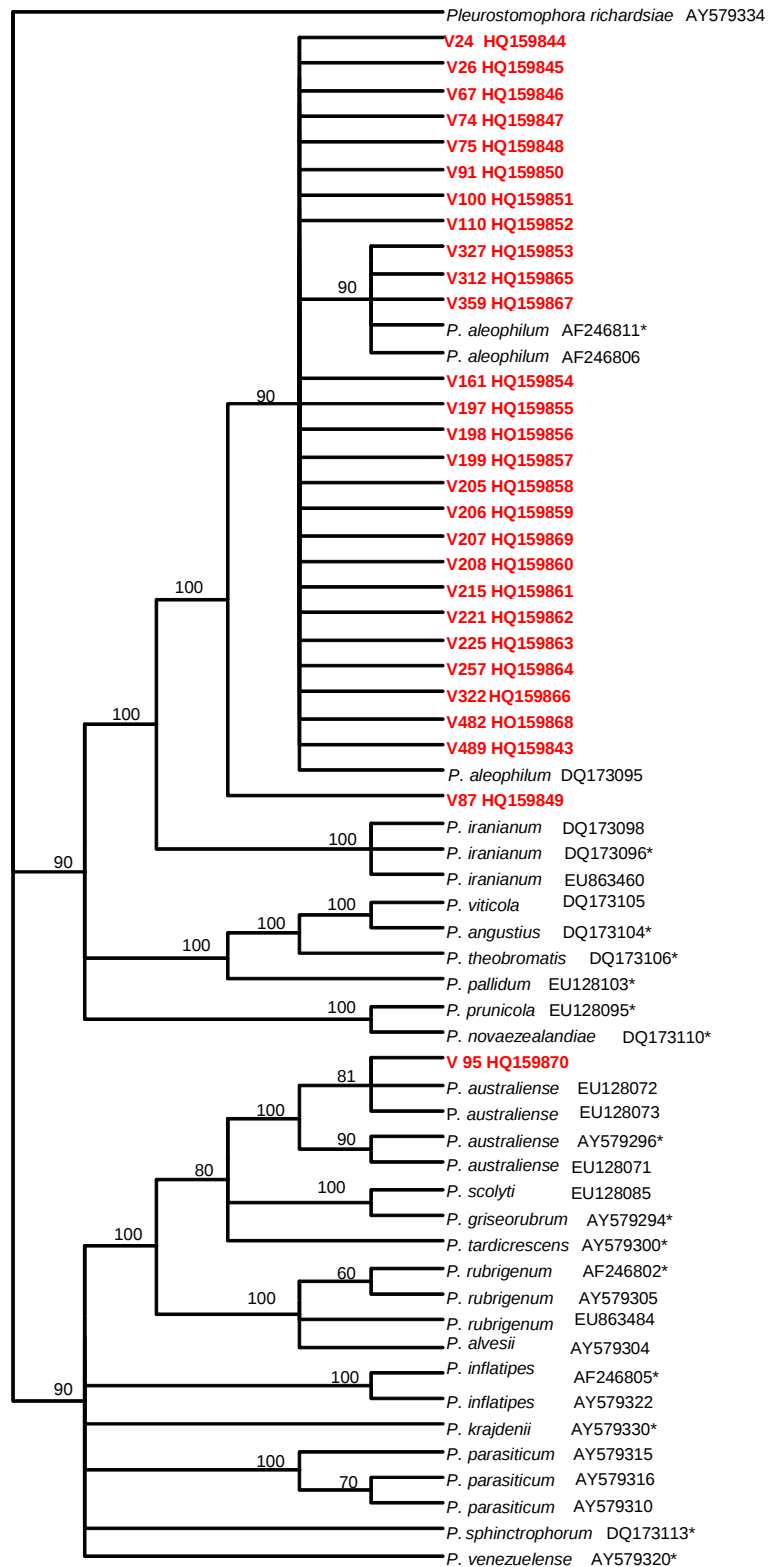


Figura 21. Árbol filogenético a partir de secuencias parciales del gen de la β - tubulina de aislamientos propios de *Phaeoacremonium* spp. (rojo, V) y secuencias del GenBank, incluyendo secuencias ex-tipo (*)

2.4.1.3 *Botryosphaeria* spp.

Se obtuvieron 90 aislamientos de *Botryosphaeria* spp. (teleomorfo). Morfológicamente se describieron e identificaron cuatro especies de anamorfos *Neofusicoccum parvum* (*B. parva*), *N. luteum* (*B. lutea*), *Fusicoccum aesculi* (*B. dothidea*) y *Diplodia seriata* (*B. obtusa*). La identificación morfológica (Figura 22), fue corroborada mediante el análisis de la secuencia ITS del ADN ribosomal de una selección representativa de las distintas especies (Figura 23). 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 los discrimina. Aislamientos representativos de este complejo fueron posteriormente caracterizados mediante amplificación del gen que codifica para la subunidad II de la ARN polimerasa y fueron confirmados como pertenecientes a *N. parvum* (ver Anexos 8 A, B). Recientemente dentro del grupo *N. parvum/ribis* se han identificado 5 grupos considerados especies filogenéticas por análisis de filogenia múltiple combinando varias regiones del genoma (ITS, β -tubulina, Actina, ARNpII). Esta última resulta de utilidad para la separación de *N. parvum* de *N. ribis* (Pavlic *et al.*, 2009).

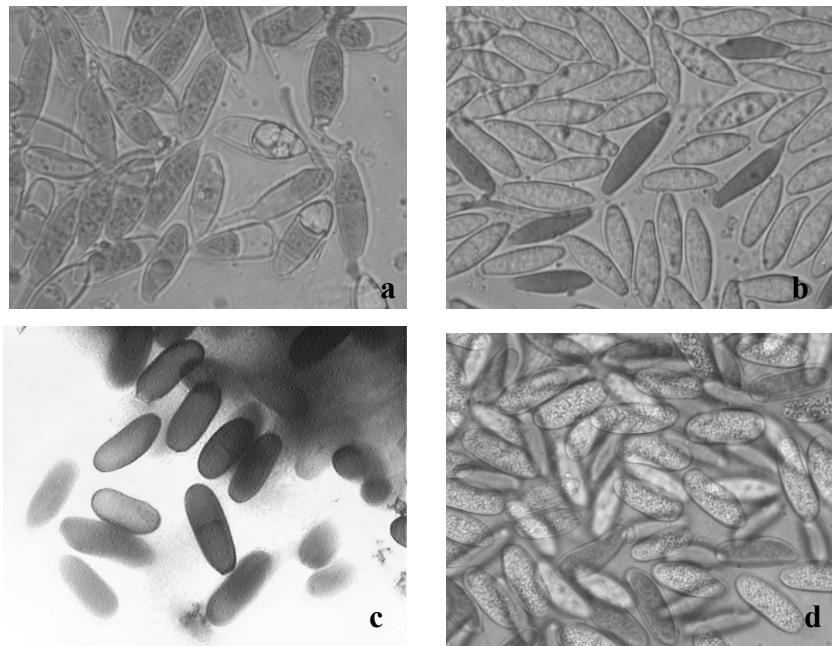


Figura 22. Conidios de las distintas especies de *Botryosphaeria* encontradas en vid.

a: *B. parva*/*Neofusicoccum parvum*, b: *B. dothidea*/*Fusicoccum aesculi*,
c: *B. obtusa*/*Diplodia seriata*, d: *B. lutea*/*Neofusicoccum luteum*.

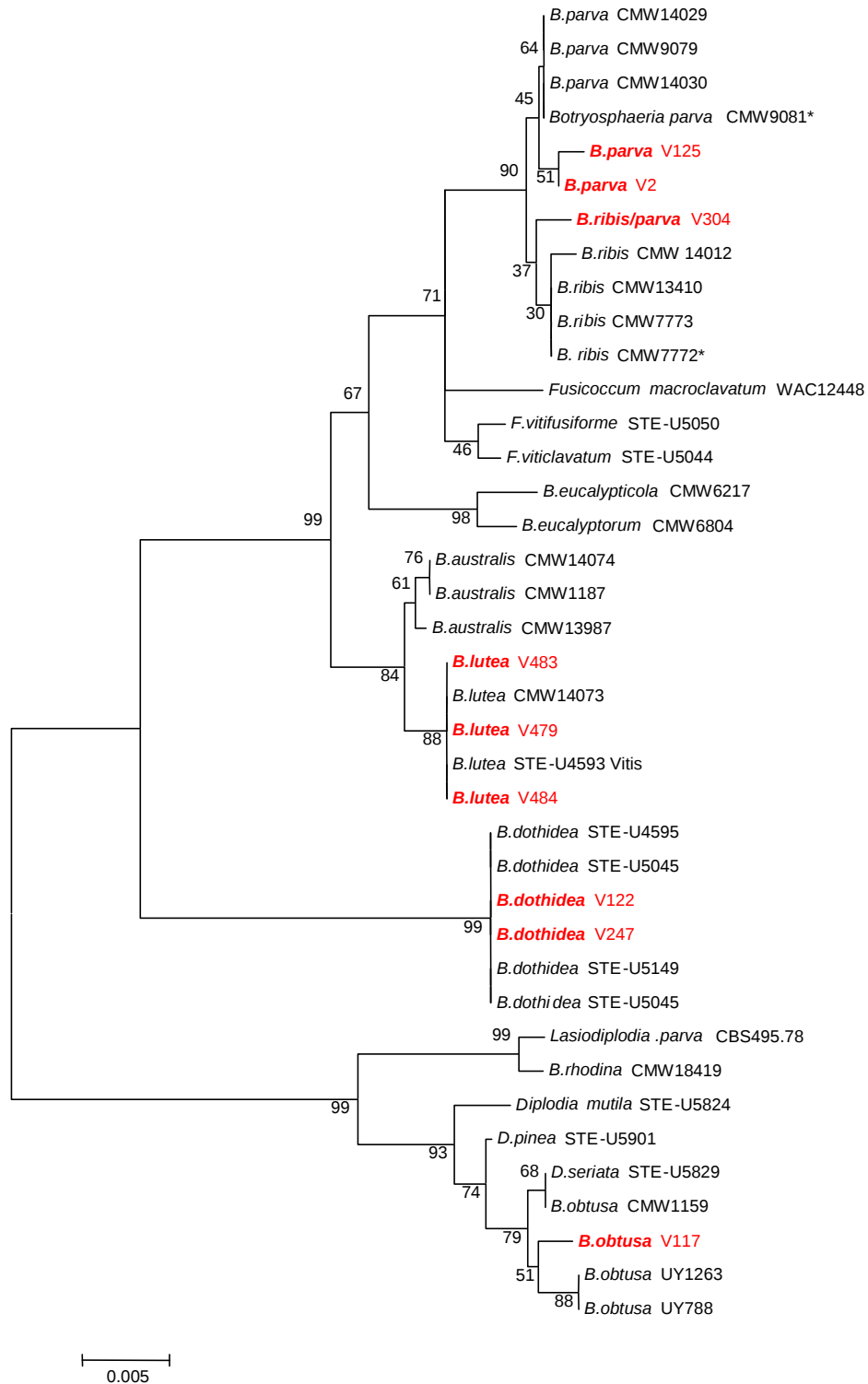


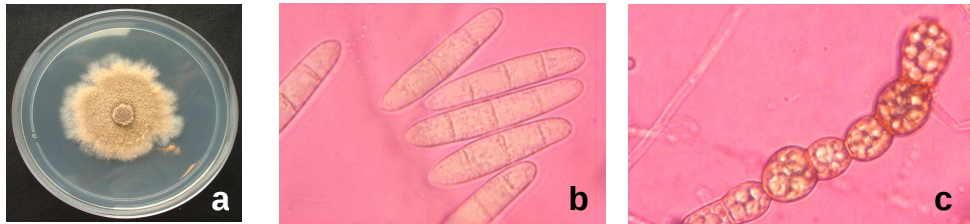
Figura 23. Árbol filogenético a partir de secuencias de región ITS de aislamientos propios de *Botryosphaeria* spp. (V rojo) y secuencias del GenBank.

2.4.1.4 *Cylindrocarpon* spp. y *Campylocarpon pseudofasciculare*

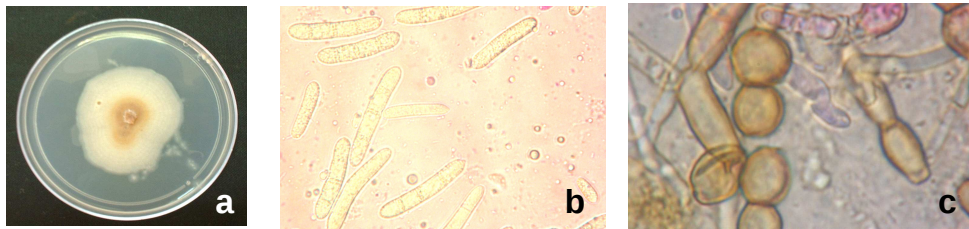
Los 18 aislamientos pertenecientes a los géneros *Campylocarpon* y *Cylindrocarpon* aislados de raíces oscurecidas de plantas con síntomas externos presentaron características micro y macromorfológicas muy variables en cultivo (Figura 24) por lo cual se construyó un árbol filogenético con la secuencia de la región ITS (Figura 25). El alineamiento se construyó con 57 aislamientos pertenecientes a estos taxa 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 *clusters* con secuencias del GenBank incluyendo secuencias tipo de cada grupo, a excepción de GU198181 y GU 198182 que se agrupan con *C. destructans* var. *crassum* EF607079 que no es la secuencia tipo.

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

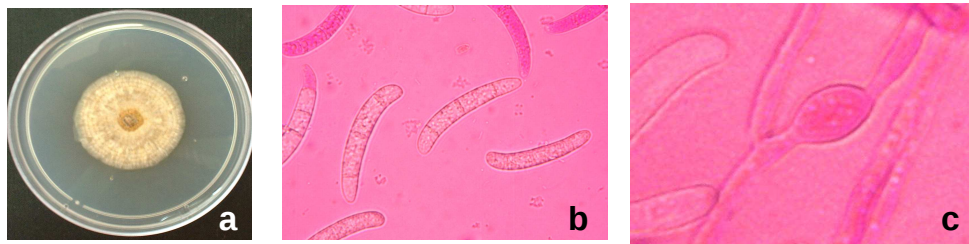
C. macrodidymum es la especie más frecuentemente aislada en EEUU, España y Chile (Petit & Gubler, 2005; Alaniz *et al.*, 2007). A pesar del pequeño tamaño de la muestra, esta especie también parece ser la más frecuente en Uruguay. *C. liriodendri*, frecuentemente aislada en Francia, Sudafrica y España (Halleen *et al.*, 2006b; Alaniz *et al.*, 2007, 2009) fue aislada sólo una vez. *Ca. pseudofasciculare* ha sido recientemente descrita junto a la especie tipo del género *Campylocarpon fasciculare* como una nueva especie en un nuevo género anamorfo sin teleomorfo conocido. Originalmente asociado a raíces asintomáticas de vid en Sudáfrica, se comprobó que su inoculación en raíces sanas producía una reducción en el crecimiento de raíces y brotes (Hallen *et al.*, 2004). Su aislamiento en Uruguay a partir de plantas sintomáticas es su primer registro fuera de aquel país (Chaverri *et al.*, 2011). *C. pauciseptatum*, cuya patogenicidad es aún discutida (Cabral *et al.*, 2009), fue anteriormente registrado en Eslovenia y Nueva Zelanda (Schroers *et al.*, 2008).



Cy lindrocarpon pauciseptatum



Cy lindrocarpon liriodendri



Campylocarpon pseudofasciculare



Cy lindrocarpon macrodidymum

Figura 24. Aspecto de la colonia y micromorfología de las especies de *Cy lindrocarpon* y *Campylocarpon* a: colonia, b: macroconidios, c: clamidosporas.

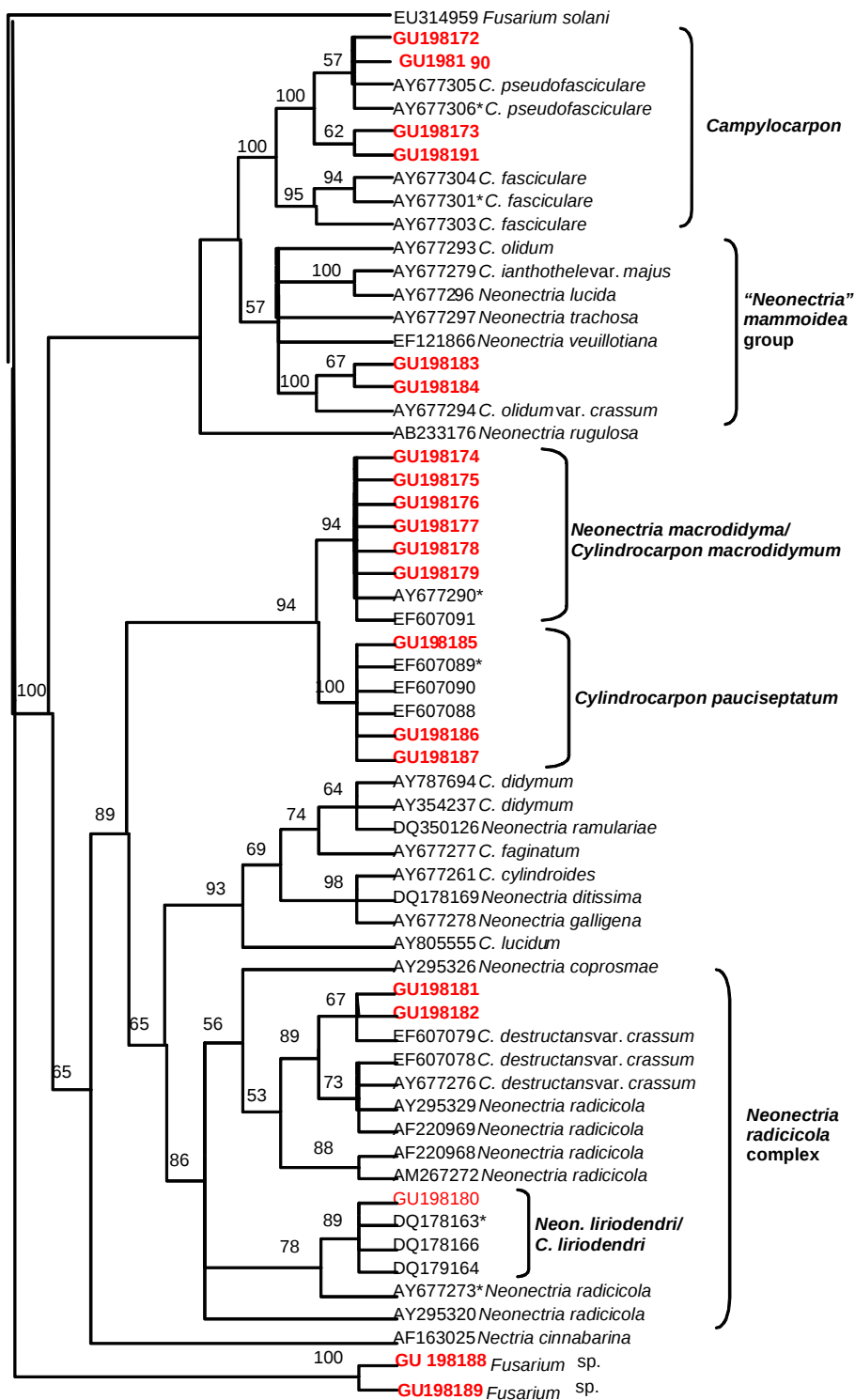


Figura 25. Árbol filogenético a partir de secuencias de la región ITS de aislamientos de *Cylindrocarpon* y *Campylocarpon* propios (V, rojo) y secuencias del GenBank incluyendo secuencias ex-tipo (*).

2.4.1.5 *Greeneria uvicola*

Se obtuvieron 14 aislamientos de *G. uvicola*. Las colonias inicialmente grises luego se oscurecían por la formación de abundantes picnidios elevados (Figura 26 a). Los conidios eran de color castaño claro y exhibían cicatrices en ambos extremos (Figura 26 b). El análisis filogenético de las secuencias de la región LSU de los aislamientos obtenidos en Uruguay corroboró la identificación morfológica (Figura 27).

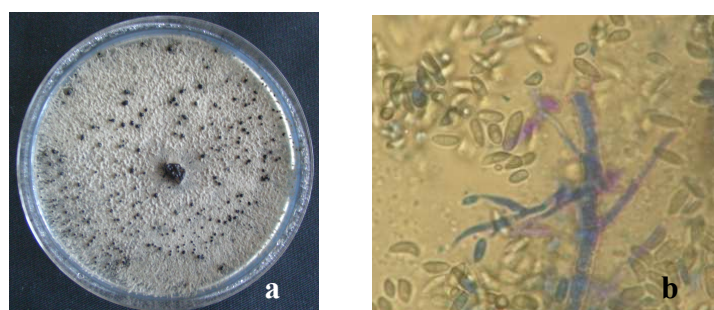


Figura 26. Colonia y conidiogénesis de *G. uvicola*.

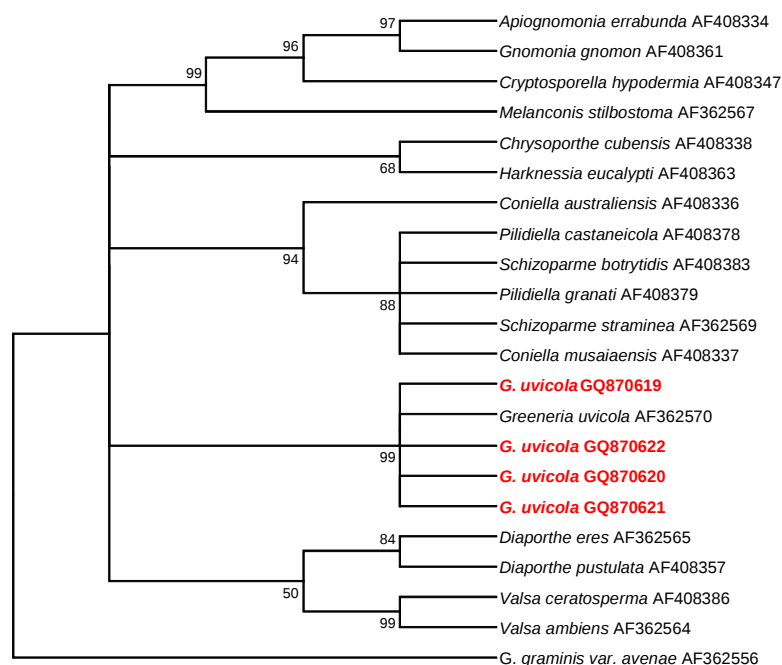


Figura 27. Árbol filogenético a partir de secuencias de LSU de ADN_r de aislamientos propios de *G. uvicola* (rojo) y especies relacionadas obtenidas del GenBank.

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

Los 9 aislamientos correspondientes al género *Cadophora* presentaron colonias blancas y gris verdosas (Figura 28 a), con conidióforos ramificados con fiálides y collarete visible (28 b). El análisis filogenético de la región ITS del ADN ribosomal permitió la identificación de las especies *C. luteo-olivacea* y *C. melinii* (Figura 29).

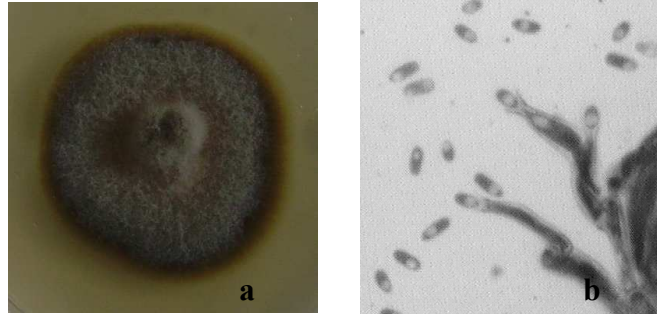


Figura 28 a: colonia; b: conidiogénesis de *C. luteo-olivacea*.

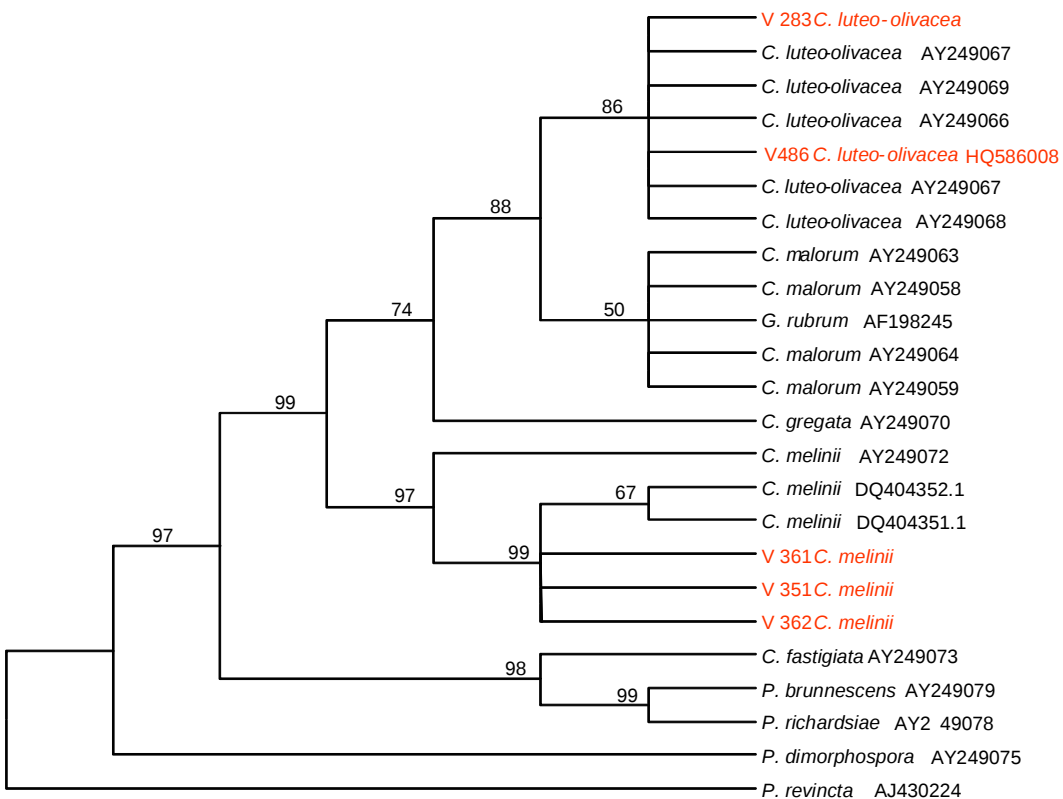


Figura 29. Árbol filogenético a partir de secuencias de la región ITS de aislamientos propios de *C. luteo-olivacea* y *C. melinii* (V, rojo) y especies relacionadas obtenidas del GenBank.

2.4.1.7 *Phomopsis viticola*

En plantas sintomáticas, se obtuvieron 13 aislamientos de *P. viticola*. Las colonias eran de micelio blanco con picnidios negros (Figura 30 a), en los cuales sólo se observó producción de α conidios (Figura 30 b) sin β conidios típicos de la especie. A partir de material vegetal asintomático, se aislaron otras especies de *Phomopsis* (* en Figura 31). Tres aislamientos se agruparon en un *cluster* que no se asoció con ninguna especie.

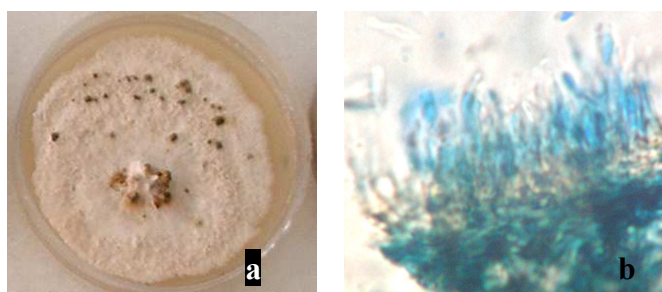


Figura 30 a: colonia y b: conidiogénesis de *P. viticola*.

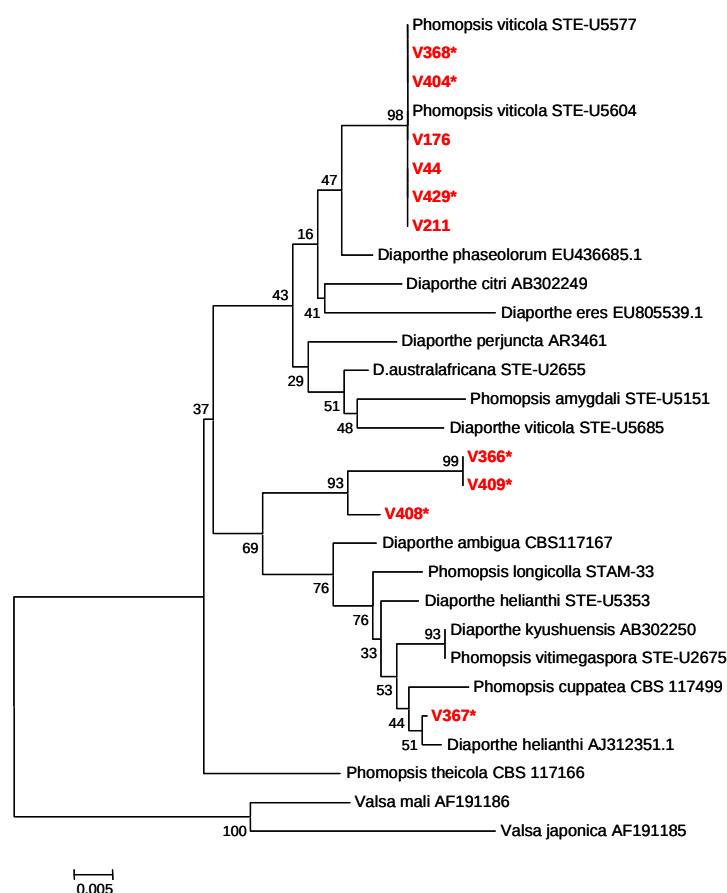


Figura 31. Árbol filogenético a partir de secuencias de la región ITS de aislamientos propios de *Phomopsis* spp. (V, rojo) y secuencias del GenBank.

2.4.1.8 *Eutypella vitis*

Sólo 2 aislamientos fueron encontrados asociados al síntoma de brazo muerto en el cv. Cabernet Sauvignon. Las colonias eran inicialmente blancas y se oscurecían progresivamente formando primero manchones negros aislados que luego se unían cubriendo toda la superficie (Figura 32 a). Se observó la producción de α y β conidios (Figura 32 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 (Anexo 9).

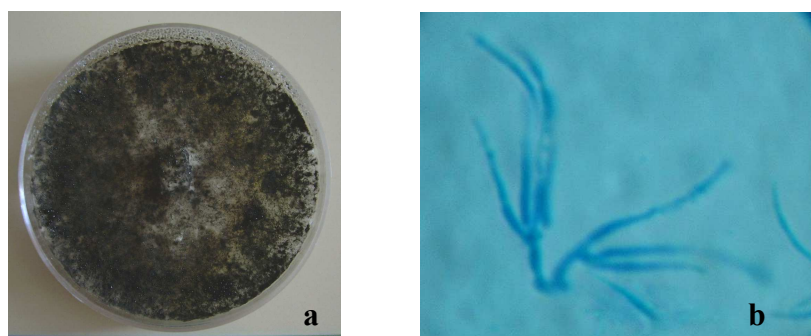


Figura 32. a: Colonia, b: conidiogénesis con formación de β -conidios.

2.4.1.9 *Inocutis jamaicensis*

Se obtuvieron 21 aislamientos de *I. jamaicensis* 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 33 a) luego de varias semanas produjeron carpóforos (Figura 33 b). Las secuencias de la región ITS (ver Anexo 10) permitieron confirmar la identificación de la especie.

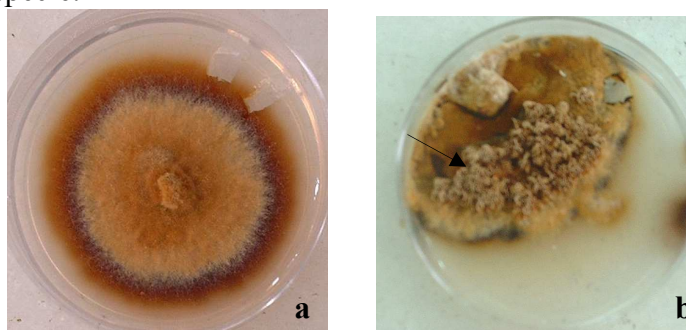


Figura 33 a: Colonia de *I. jamaicensis* de 20 días, b: colonia con formación de carpóforo.

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

2.4.2.1 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 (ver Anexo 2 C). El primer eje separa claramente el síntoma del pie negro, caracterizado por la presencia 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 34). Dentro de ese gradiente, *Eutypella*, *Botryosphaeria* e *Inocutis* caracterizan al brazo muerto, mientras que *Pa. chlamydospora*, *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.

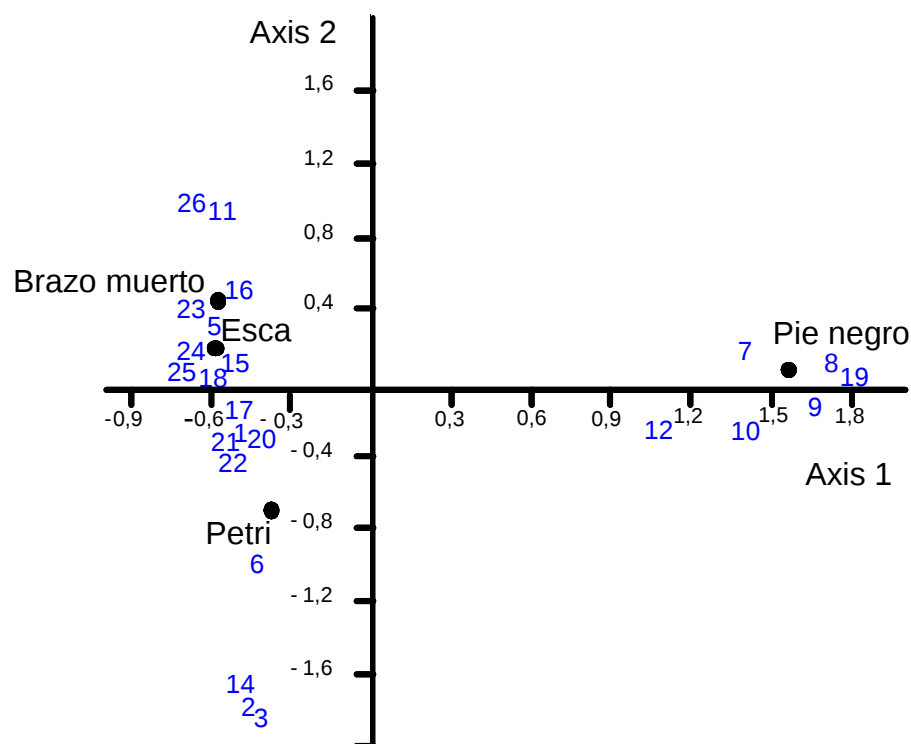


Figura 34. Ordenamiento de síntomas de acuerdo a la densidad relativa de los géneros.

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*

2.4.2.2 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 manifestación de síntomas de enfermedades del tronco. Debido a que la mayor frecuencia del muestreo puede conducir a un mayor número de especies aisladas que en los otros cultivares, se decidió agrupar a todos los otros cultivares en la categoría “otros cultivares”. Los portainjertos, de los cuales en general es muy difícil conocer su identidad, se analizaron todos juntos en la categoría “portainjertos” (Anexo 3C). El primer eje explica un 62% de la variación y separa a los portainjertos de los “otros cultivares” y del Cabernet Sauvignon (Figura 35). El segundo eje explica un 37 % de la variación, casi la totalidad de la variación restante, y separa al Cabernet Sauvignon de “otros cultivares”.

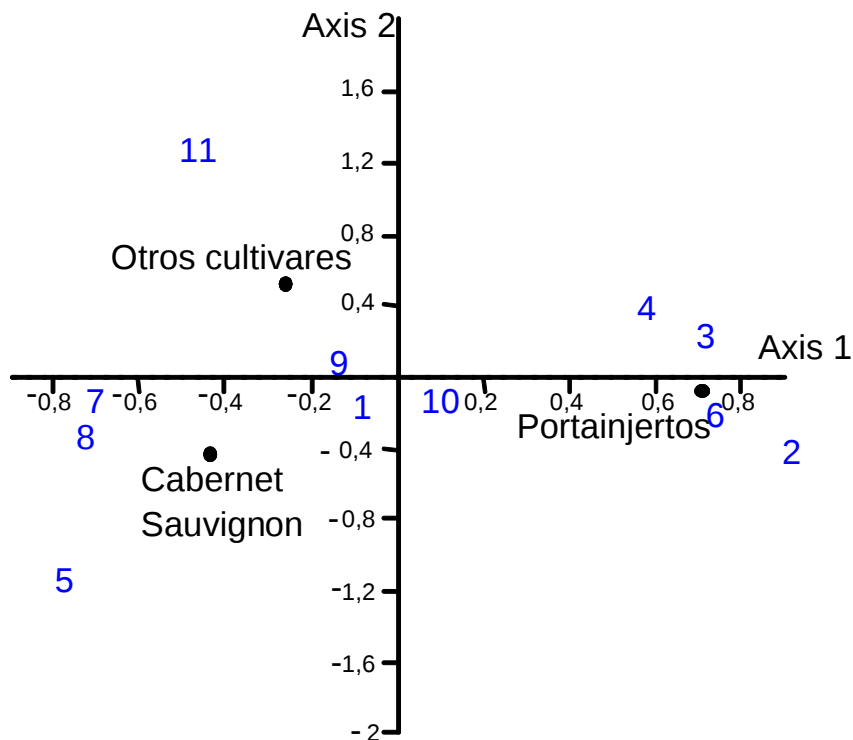


Figura 35. Ordenamiento de cultivares de acuerdo a la densidad relativa de géneros que contienen especies patógenas.

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

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

El análisis de correspondencia muestra el ordenamiento en un plano de todas las regiones vitícolas del país e indica que no existe un patrón de distribución de síntoma-especie asociado a factores geográficos (Figura 36). Los dos principales ejes sumados explican sólo el 55 % de la variabilidad (Anexo 4C).

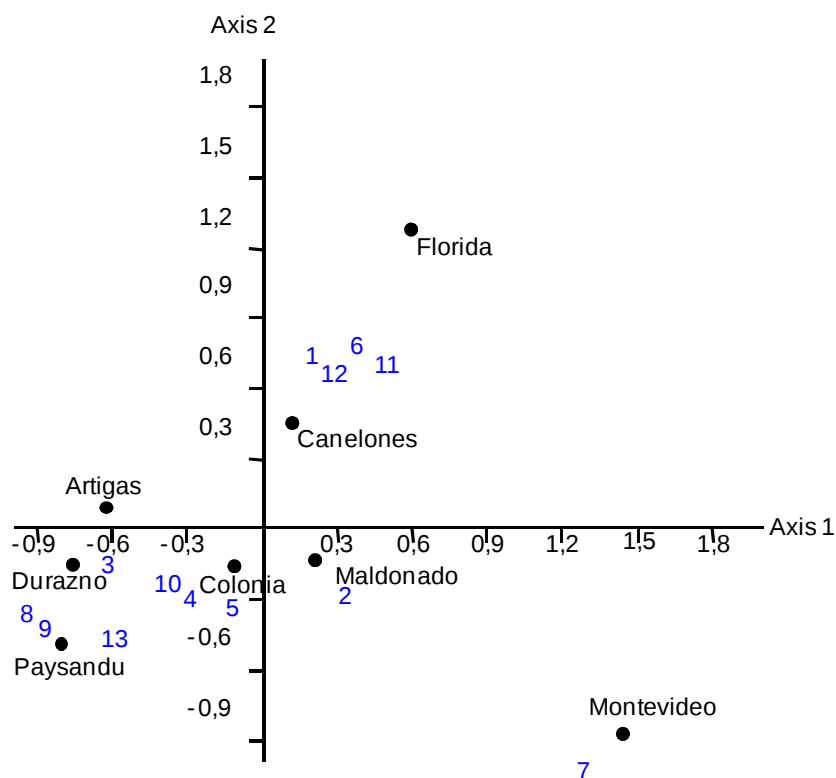


Figura 36. Ordenamiento de sitios de muestreo ordenados según densidad relativa.

de géneros que contienen especies fitopatógenas. 1 *Acremonium*, 2 *Aureobasidium*, 3 *Botryosphaeria*, 4 *Cadophora*, 5 *Eupenicillium*, 6 *Eutypella*, 7 *Fusarium*, 8 *Greeneria*, 9 *Inocutis*, 10 *Phaeoacremonium*, 11 *Phaeomoniella*, 12 *Phoma*, 13 *Phomopsis*

Al excluir del análisis a los departamentos submuestreados, el análisis de correspondencia indica que los dos primeros ejes explican el 64% de la variación (Anexo 5 C). El primer eje (36%) establece un gradiente que separa a Maldonado, Colonia y Montevideo de los departamentos del centro y norte del país (Figura 37). El segundo eje (28%), establece un segundo gradiente que separa a Artigas, Paysandú y Durazno, ocupando Paysandú una posición intermedia.

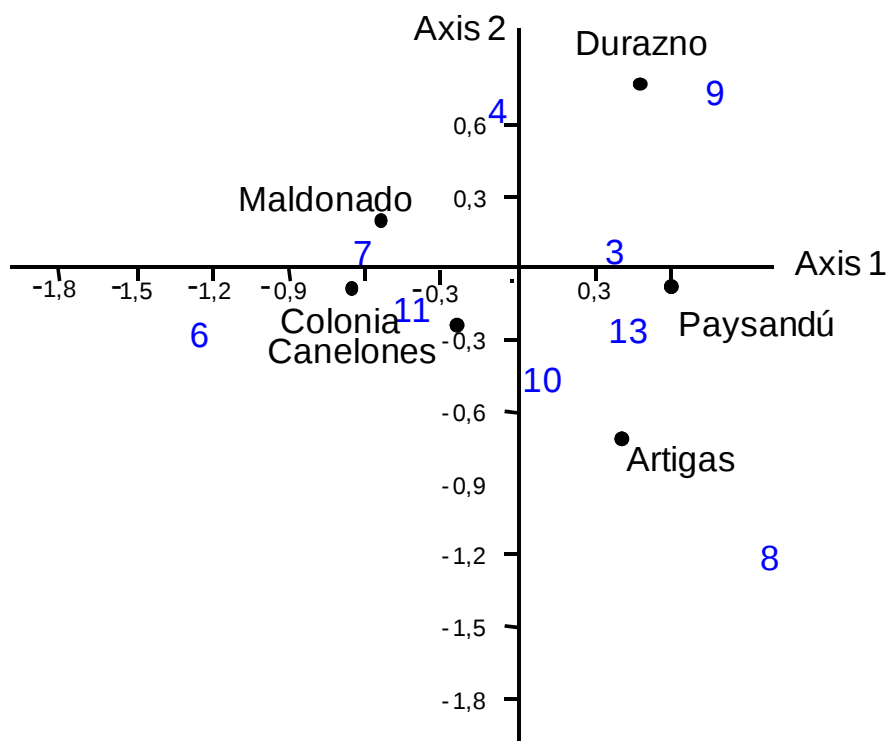


Figura 37. Ordenamiento de los sitios de muestreo excluyendo departamentos y géneros submuestreados, de acuerdo a densidad relativa de géneros que contienen especies patógenas.

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

2.4.2.4 Caracterización de cultivares según síntomas externos

El análisis de correspondencia muestra que el primer eje es responsable de un 91% de la variabilidad total (Anexo 6D), agrupando por un lado a los cultivares Cabernet Franc, Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon y Marselán, genéticamente emparentados, y por otro a los cultivares Merlot y Tannat (Figura 38). 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.

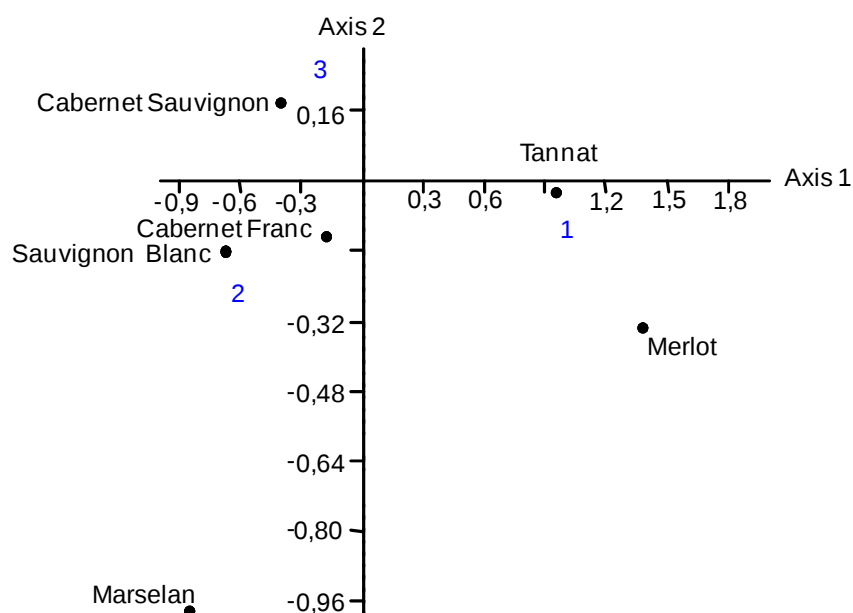


Figura 38. Ordenamiento de cultivares de acuerdo a la frecuencia relativa de síntomas externos: 1 Enfermedad de Petri, 2 Brazo muerto, 3 Esca

2.5 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. austaliense*, *N. parvum*, *N. luteum*, *I. jamaicensis*, *C. luteo-olivacea*, *Cylindrocarpon sensu lato* y *P. viticola*.

Dentro de este contexto, es remarcable el registro de varias especies del grupo *Cylindrocarpon sensu lato*, en particular de especies altamente patógenas como *C. liriodendri* y *C. macrodidymum* 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 Sudafrica (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 al cual se circunscribió el muestreo de pie negro. En el análisis de correspondencia entre géneros y síntomas, se observa que el pie negro estuvo relacionado a este género, junto a otros géneros que son habitantes frecuentes del suelo, como *Fusarium*.

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 de *P. australiense*, todos los otros aislamientos pertenecieron a la especie *P. aleophilum*, confirmándose 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 ocurre en esta especie, en la cual ocurre reproducción sexual en campo (Mostert, 2006). La mayor semejanza fenotípica de los aislamientos de *Pa. chlamydospora* podría deberse a que es una especie que se reproduce asexualmente y con una escasa recombinación (Comont *et al.*, 2010). En el análisis de correspondencia, estas especies se ubican entre los síntomas de esca y Petri, en coincidencia con la opinión generalmente aceptada que los señala como agentes causales principales de estas dolencias. Sin embargo, el índice Relay (Anexo 2 E) muestra que estas especies, si bien tienen una fuerte asociación con estas dos enfermedades, también se encuentran asociadas al síntoma del brazo muerto, aunque con un peso menor. Ambas especies se aislaron tanto de los cultivares de *V. vinifera* como de los distintos portainjertos, y según el análisis de correspondencia, *P. aleophilum* se asoció preferentemente con los cultivares y no con los portainjertos (Anexo 3E). El análisis de correspondencia entre

géneros y regiones geográficas (Departamentos) indica que los departamentos más cálidos del centro y norte se encuentran asociados a una mayor presencia de *I. jamaicensis*, *Botryosphaeria* spp., *Phaeoacremonium* y *G. uvicola*, y se separan de los departamentos del sur del país principalmente asociados a *Pa. chlamydospora*, *E. vitis* y *Fusarium* spp. En California, especies de *Botryosphaeria* han sido consideradas dominantes frente a *Eutypa lata* en su asociación con el brazo muerto de la vid en climas cálidos, mientras que *E. lata* y *Eutypella vitis* serían relativamente más frecuentes en climas fríos (Úrbez Torres & Gubler, 2006; Catal *et al.*, 2007). Las especies de *Botryosphaeria* identificadas (*N. parvum*, *N. luteum*, *F. aesculi* y *D. seriata*) han sido indicadas como patógenas, aunque con variable grado de virulencia hacia *V. vinifera*. *Lasioidiplodia theobromae*, *N. parvum* y *N. luteum* son consideradas las más virulentas, mientras que *F. aesculi* y *D. seriata* son consideradas débilmente virulentas. Una selección de aislamientos de estas especies, junto a aislamientos de *Cadophora luteo-olivacea* y *G. uvicola*, frecuentemente aislados y cuya acción como fitopatógenos es poco conocida, fueron incluidos en subsiguientes ensayos de patogenicidad.

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.

CAPÍTULO 3

DETECCIÓN MOLECULAR DE LAS PRINCIPALES ESPECIES PATÓGENAS EN MATERIAL ASINTOMÁTICO

3.1 Introducción

La detección de especies por medio de cebadores específicos tiene dos aplicaciones frecuentes: para determinar la presencia de hongos que no son cultivables y por lo tanto escapan a los métodos clásicos usados en estudios de diversidad, y para la detección temprana de patógenos directamente en material vegetal cuando los síntomas de una enfermedad no son aún evidentes. El diagnóstico temprano es importante para el manejo de las enfermedades debido a que la dependencia de la aparición de síntomas puede implicar que la enfermedad haya progresado demasiado para la aplicación de medidas de control efectivas. Esto es particularmente relevante en el caso de enfermedades con largos periodos de incubación, como es en el caso de las enfermedades del tronco de la vid.

Desde el advenimiento de las técnicas de RFLP (polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción) y PCR, las técnicas moleculares se han transformado en una de las herramientas más frecuentes para la detección temprana de patógenos vegetales. Hay una variedad de métodos a través de los cuales marcadores basados en PCR pueden generarse, incluyendo RAPD (polimorfismo de ADN amplificado al azar), AFLP (polimorfismo de fragmentos largos amplificados) y marcadores basados en STS (sitio marcado en la secuencia). Una STS es una secuencia única en un lugar conocido del genoma que puede ser amplificado mediante PCR. Los STS tienen en general 200 a 500 pb de extensión, y se pueden generar cebadores que detecten estos STS, o variaciones dentro de ellos. STSs usados en hongos incluyen a aquellos específicos de la región ITS (internal transcribed spacer) del ADN ribosomal, y marcadores específicos de ciertos genes como los que codifican para la β -tubulina o actina (Hirsch *et al.*, 2000; Weiland & Sundsbak, 2000).

3.2 Objetivo

Determinar la presencia de los principales hongos patógenos en material asintomático usado para la reproducción vegetativa mediante el uso de herramientas moleculares.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Evaluación de especificidad de cebadores en ADN de cultivos puros

Se evaluó la especificidad de cebadores disponibles para *Phaeoacremonium* spp. y *Pa. chlamydospora* 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 tejidos sintomáticos. Se evaluaron los pares de cebadores Pal1N/Pal2 para *P. aleophilum* (Tegli *et al* 2000), Pac1f/Pac2r específicos para *Phaeoacremonium* spp., (Overton *et al* 2004) y el par de cebadores degenerados F2bt/R1bt específico para *P. aleophilum* y otras diez especies pertenecientes al género (Aroca *et al.*, 2008).

Los pares de cebadores evaluados para *Pa. chlamydospora* fueron Pch1/Pch2 (Tegli *et al.*, 2000) y Pmo1f/Pmo2r (Overton *et al.*, 2004). 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 fragmentos amplificados se presenta en la tabla 2.

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

Cebadores	Región del ADN	Secuencia	Tamaño en pb
Pal1N/Pal2	ITS	5'-aggtcgggggccaac-3'/5'-agggtgaaactactgcgc-3'	400
Pac1f/Pac2r	ITS	5'-accctttgtgaacatacctg-3'/5'-tactgcgctcggagtcctg-3'	420
F2bt/R1bt	β -tubulina	5'-vagcttcgacrwccctcgacg-3'/5'-gctacttacrcaytgrccggtctg-3'	115
Pch1/Pch2	ITS	5'-ctccaaccctttgtttatc-3'/5'-tgaaagttgatatggaccc-3'	360
Pmo1f/Pmo2r	ITS	5'-gttacatgtgacgtctgaacg-3'/5'-cagtgtatgcttgattgctcg-3'	320

3.3.2 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 en el capítulo 2, 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 generación de bandas de los tamaños esperados. Se secuenciaron bandas del tamaño esperado con el fin de confirmar mediante el análisis de secuencia que el producto de PCR perteneciese a la especie objetivo.

3.3.3 Detección molecular de *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* en plantas asintomáticas

Los *cebadores* que resultaron específicos fueron evaluados en su capacidad de amplificar el ADN objetivo a partir de una mezcla de ADN obtenida de sarmientos asintomáticos provenientes de plantas madre de vivero. Se muestreó un sarmiento de cada una de cinco plantas de Tannat y del portainjerto 3309C. De cada sarmiento se obtuvieron tres estacas: una basal, una media y una apical (Figura 39). En total se analizaron 30 segmentos. Se removió la corteza de cada segmento previo a realizar una desinfección superficial como se describió en el capítulo 2. Posteriormente, con un bisturí estéril se generaron pequeños fragmentos de xilema a partir de los cuales se obtuvo ADN usando el kit Axyprep. Se realizó una primera amplificación del ADN con los cebadores universales ITS4/ITS5 y T1/Bt2b, y luego una amplificación anidada con los cebadores específicos Pmo1f/Pmo2r para *Pa. chlamydospora* y F2Bt/R1bt for *Phaeoacremonium* spp.

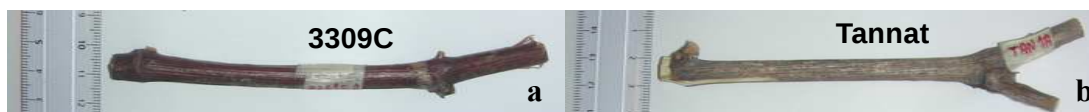


Figura 39. Estacas obtenidas de sarmientos sanos seleccionados para la injertación

3.4 Resultados

3.4.1 Especificidad de cebadores en ADN de cultivos puros

Los cebadores Pac1f/Pac2r y F2bt/R1bt para *P. aleophilum* y Pmo1f/Pmo2r para *Pa. chlamydospora* resultaron específicos y produjeron los productos de amplificación esperados cuando fueron usados para amplificar de ADN de cultivos puros (Figuras 40, 41, 42, Tabla 3).

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 (Figura 43). Pch1/Pch2 resultó inespecífico para *Pa. chlamydospora* en las condiciones especificadas de PCR.

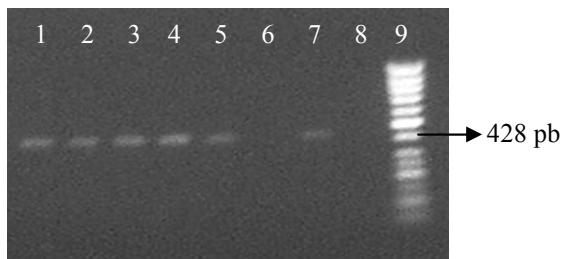


Figura 40. Amplificación con cebadores Pac1f/Pac2r.

Carriles 1,2,3,4,5,7: *P. aleophilum*,
6: *P. chlamydospora*, 8: blanco,
9: marcador molecular

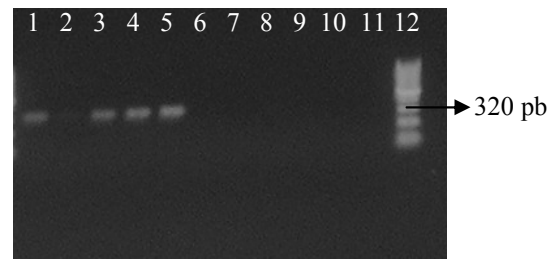


Figura 41. Amplificación con cebadores Pmo1f/Pmo2r.

Carriles 1,2,3,4,5: *Pa. chlamydospora*,
6: *P. australiense*, 7: *P. aleophilum*, 8: *I. jamaicensis*, 9: *G. uvicola*, 10: *Alternaria alternata*,
11: *Ca. pseudofasciculare*, 12: marcador molecular

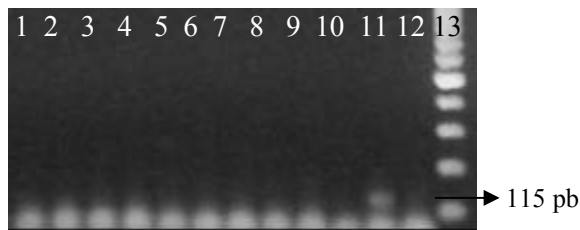


Figura 42. Amplificación con cebadores F2bt/R1bt.

1 y 2: *Pa. chlamydospora*, 3: *N. parvum*, 4: *C. melinii*, 5: *P. viticola*, 6: *Phomopsis* sp, 7: *E. vitis*, 8: *A. alternata*, 9: *G. uvicola*, 10: *I. jamaicensis*, 11: *P. aleophilum*, 12: *P. australiense*, 13: marcador molecular

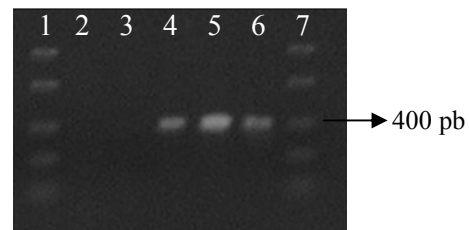


Fig.43 Amplificación de *P. aleophilum* con cebadores PAL1N/PAL2 en gradiente de temperatura.

1 y 7: marcador molecular
2-5: *P. aleophilum* V154

Temperaturas:
2= 64°C, 3= 60,5°C, 4=57°C, 5=53,5°C, 6=50°C

3.4.2 Especificidad de cebadores en ADN total de madera enferma

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* GQ250215.1), y por lo tanto no fue seleccionado (Figura 44, carriles 9 y 14, anexos 11 A,B y 12 A,B).

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 tanto, fueron seleccionados para el diagnóstico temprano de estas especies en sarmientos provenientes de plantas de vid asintomáticas.

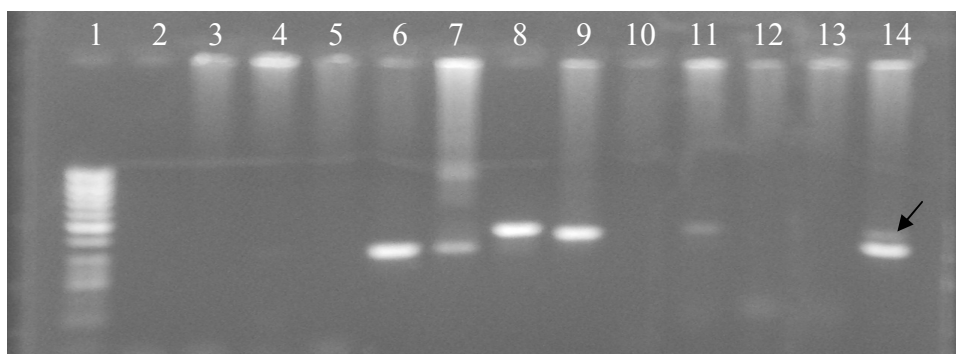


Figura 44. Productos de amplificación de PCR anidado con cebadores específicos Pac1f/Pac2r y Pmo1f/Pmo2r de *Phaeoacremonium* y *Pa. chlamydospora* luego de la amplificación inicial con cebadores ITS4/ITS5.

Carril 1 marcador molecular, Carriles 3 al 7 cebadores Pmo1/2; Carril 8 control positivo de Pac1/2; Carriles 9 al 13 cebadores Pac1/2; Carril 14 cebadores Pac1/2 y Pmo1/2 juntos, incluyendo producto de amplificación inespecífico del tamaño correcto indicado con una flecha.

Tabla 3. Amplificación con cebadores específicos de *Phaeoacremonium* spp., *Pa. chlamydospora*, y con cebadores ITS4/ITS5

Especie	Pac1f/Pac2r	F2Bt/R1Bt	Pmo1f/Pmo2r	ITS
<i>P. aleophilum</i> (34 aislamientos)	+	+	-	+
<i>P. australiense</i>	+	-	-	+
<i>P. 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>Altenaria alternata</i>	-	-	-	+
<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>	-	-	-	+
<i>Cadophora melinii</i>	-	-	-	+
<i>Eutypella vitis</i>	-	-	-	+
Otras especies en ADN de madera	+	-	-	+

(+) amplificación y (-) no amplificación

3.4.3 Detección molecular de *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* en plantas asintomáticas

Los cebadores seleccionados Pmo1f/Pmo2r y F2Bt/R1Bt para *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* respectivamente, produjeron amplicones de los tamaños esperados, al ser usados para amplificar ADN de estacas provenientes de sarmientos sanos (Figuras 45, 46).

Nueve de diez sarmientos y plantas resultaron positivos para al menos uno de los hongos objetivo. Del total de las 30 estacas obtenidas de estos sarmientos, 13 resultaron positivas para *Pa. chlamydospora* y 6 para *Phaeoacremonium* spp. (Tabla 4). El número de estacas infectadas fue superior en las estacas provenientes de la base de los sarmientos, disminuyendo progresivamente hacia la zona apical.

El análisis de la secuencia indicó alta homología con *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* (Anexo 13).

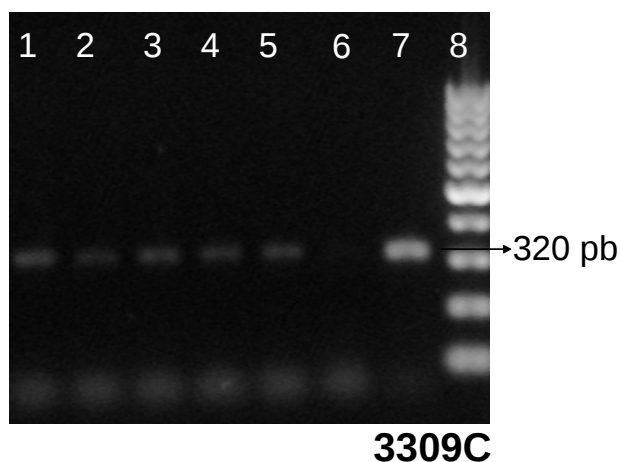


Figura 45. Productos de amplificación con Pmo1F/Pmo2r para *Pa. chlamydospora*
Carriles 1-5: ADN de estacas basales,
6: blanco, 7: control +,
8: 100 pb marcador molecular

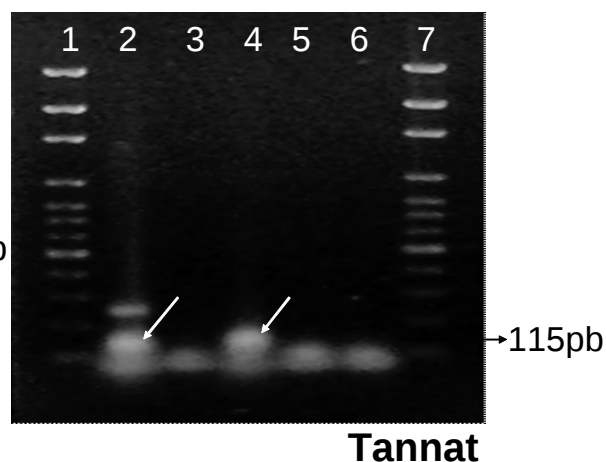


Figura 46. Productos de amplificación con F2bt/R1bt para *Phaeoacremonium* spp.
Carriles 1y 7: 100 pb marcador molecular,
2-5: ADN de estacas basales

Tabla 4. Detección molecular de *Pa. chlamydospora* y *Phaeoacremonium* spp. en estacas obtenidas de la zona basal, media y apical de sarmientos

Tannat	basal	medio	apical
Sarmiento 1	P	P	-
Sarmiento 2	-	Pa	P
Sarmiento 3	P	P	P
Sarmiento 4	Pa	Pa	-
Sarmiento 5	-	-	-
3309 C	basal	medio	apical
Sarmiento 1	Pa	Pa	-
Sarmiento 2	Pa	-	Pa
Sarmiento 3	Pa	-	-
Sarmiento 4	Pa	-	Pa
Sarmiento 5	Pa	Pa	Pa

Pa: *Pa. chlamydospora*

P: *Phaeoacremonium* spp.

-: sin amplificación específica

3.5 Discusión

Los aislamientos de *Pa. chlamydospora* casi duplicaron a los de *Phaeoacremonium* spp. en plantas con síntomas de enfermedad de Petri y esca en campo, y esta diferencia fue también evidente en la detección molecular de estos hongos en sarmientos usados para la injertación en la que se detectaron 13 estacas infectadas con *Phaeomoniella* y 6 estacas infectadas con *Phaeoacremonium*. Zanzotto *et al.* (2007) encontraron que a pesar de que las especies de *Phaeoacremonium* prevalecían en injertos enraizados, su incidencia descendía en vides de cuatro años de edad, mientras que la presencia de *Phaeomoniella* lentamente aumentaba. Según Larignon & Dubos (2000) las esporas de *Pa. chlamydospora* producidas en condiciones de campo infectan los troncos de la vid a través de las heridas de poda en invierno, pero lo mismo no es observado en el caso de *Phaeoacremonium* debido a la baja producción de esporas de esta especie en invierno. Estos resultados parecen indicar que el material de propagación contaminado podría ser el principal medio de dispersión de *Phaeoacremonium* spp., mientras que la dispersión y prevalencia de *Pa. chlamydospora* en campo podría deberse no solo a su presencia en material de propagación contaminado, sino también a su dispersión en campo.

Las estacas obtenidas de la base de los sarmientos estuvieron proporcionalmente más infectadas que las estacas obtenidas de la zona media y apical de los mismos. En forma similar, Troccoli *et al.* (2001) encontraron que la colonización de tejidos por *Pa. chlamydospora* inoculada en raíces era más elevada a nivel del cuello, para volverse menos frecuente en la base de los tallos y desaparecer totalmente por encima de los entrenudos 7 y 8, deduciendo que la contaminación interna era lenta debido a mecanismos de defensa existentes en la planta.

La confiabilidad de los resultados del diagnóstico temprano depende de la sensibilidad y especificidad de los cebadores, y de que la reacción de PCR no sea inhibida por compuestos de la madera. La especificidad de los cebadores depende de la calidad de la información contenida en las secuencias usadas como base para su diseño, y de las pruebas de especificidad, en que los cebadores son evaluados en ADN de las especies objetivo, y otras que puedan aparecer asociadas. 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 de

diferentes organismos que puede incluir o no al ADN de la especie objetivo, además de sustancias inhibidoras de reacción de PCR como los fenoles de la madera. En esta investigación, los cebadores Pal1N/Pal2R no amplificaron el ADN obtenido de aislamientos puros de *Phaeoacremonium* y por lo tanto fueron descartados de evaluaciones posteriores en madera asintomática. Sin embargo, Romanazzi *et al.* (2009) usaron estos mismos cebadores para evaluar material de propagación e informaron que no había presencia de *P. aleophilum* en los mismos.

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 permiten asegurar que los resultados del diagnóstico temprano en sarmientos de plantas asintomáticas son confiables.

La presencia de *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* en sarmientos sanos usados para la propagación vegetativa, y la disponibilidad de los cebadores específicos seleccionados sugiere que el diagnóstico molecular debe ser regularmente usado para evaluar el estado sanitario de las plantas madres usadas como proveedoras de sarmientos para la injertación. A su vez, los cebadores deben ser evaluados periódicamente a través de la secuenciación de los productos obtenidos como forma de verificar el mantenimiento de la especificidad.

CAPÍTULO 4

PATOGENICIDAD DE ESPECIES CON ACCIÓN POCO CONOCIDA

4.1 Introducción

Se ha definido a la enfermedad de los vegetales como el malfuncionamiento de células y tejidos que resulta de su continua irritación por un agente patogénico o factor ambiental y que conduce al desarrollo de síntomas. La enfermedad es la condición que involucra cambios anormales en la forma, fisiología, integridad o comportamiento de una planta. Tales cambios pueden resultar en limitaciones parciales o muerte de la planta o sus partes (Agrios, 1988). Se considera que la enfermedad es un proceso continuo en el tiempo, y que puede incluir como causa tanto a factores bióticos como abióticos y que deben ser diagnosticadas de manera que se puedan generar medidas de control adecuadas.

Se reconocen dos aproximaciones al diagnóstico de una enfermedad vegetal. En primer lugar, se distingue el diagnóstico preliminar que se basa en el reconocimiento de los síntomas de las enfermedades ya conocidas. Este diagnóstico inicial es luego verificado o rechazado mediante la observación más detallada que permite constatar la presencia o ausencia de otros componentes de la enfermedad, especialmente el agente causal. También se considera la consistencia con otros factores de la enfermedad como lugar de ocurrencia, distribución y hospedero, de manera de incrementar la confiabilidad del diagnóstico.

En segundo lugar, se distingue un método para la determinación de enfermedades desconocidas. Este método se usa cuando una enfermedad no ha sido descrita, no es clara, o cuando no hay certeza sobre el supuesto agente causal y la enfermedad. Esta aproximación implica llevar a cabo una investigación para establecer la relación causal entre un agente y la enfermedad observada. Los pasos involucrados son la inoculación del agente causal en un tejido sano, la producción de síntomas, y el reisolamiento del patógeno inicialmente inoculado a partir de los tejidos afectados.

4.2 Objetivo

Determinar la patogenicidad y virulencia en vid de los aislamientos obtenidos de especies con acción poco conocida.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1. Patogenicidad y virulencia de *Botryosphaeria* spp.

Las especies de *Botryosphaeria* fueron las más frecuentemente aisladas en el curso de este estudio. En otros países algunas de las especies encontradas en Uruguay han sido consideradas como patógenas de la vid con virulencia variable. Por este motivo, se evaluó la patogenicidad de las cuatro especies aisladas de plantas de vid en el curso de este estudio: *Diplodia seriata* (*B. obtusa*), *Fusicoccum aesculi* (*B. dothidea*), *Neofusicoccum luteum* (*B. lutea*) y *Neofusicoccum parvum* (*B. parva*). En las especies que presentaban variación morfológica, se evaluaron más de un aislamiento: dos aislamientos de *F. aesculi* y cuatro de *N. parvum*.

Se inocularon discos de agar de 5 mm de diámetro con micelio en activo crecimiento en el xilema expuesto de sarmientos de un año de *Vitis vinifera* cv. Tannat en campo. Cada aislamiento fue inoculado en siete plantas, un sarmiento por planta. Se dejaron 7 plantas como testigos en las cuales se inoculó un disco de agar estéril sin patógeno. Los inóculos fueron cubiertos con Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA.). En paralelo, se colectaron sarmientos que fueron cortados en estacas de 15 cm y que fueron inoculados de igual forma en laboratorio, siete estacas por aislamiento, e incubados en la oscuridad en cámara húmeda a 25° C.

La evaluación del número de sarmientos con necrosis, largo de la necrosis y número de sarmientos de los que se reaisló el hongo inoculado se efectuó 30 días después de la inoculación en laboratorio y 60 días después de la inoculación a campo.

4.3.2 Patogenicidad y virulencia de *Greeneria uvicola* y *Cadophora luteo-olivacea*

Debido a que estos hongos fueron originalmente aislados tanto de cultivar como de portainjerto, los ensayos de patogenicidad se realizaron sobre plantines injertados. Los tratamientos consistieron en inocular dos aislamientos de *G. uvicola* y uno de *C. luteo-olivacea* en el xilema expuesto de 5 plantines de *V. vinifera* cvv. Tannat y Cabernet Sauvignon, y en los portainjertos SO4 (*V. berlandieri* x *V. riparia*) y 3309 Couderec (*V. riparia* x *V. rupestris*). Cinco plantines de cada cultivar y portainjerto fueron inoculados con ágar estéril y mantenidos como control.

La evaluación del número de plantas con necrosis, largo de necrosis y número de plantas en que hubo reaislamiento de los hongos inoculados se realizó 3 meses después de la inoculación.

4.3.3 Evaluación de síntomas y número de reaislamientos

Se contabilizó el número de muestras que mostraban necrosis y se midió el largo de las mismas.

Para el reaislamiento de los hongos inoculados, los sarmientos y plantines inoculados fueron cortados longitudinalmente y se les eliminó la corteza para medir la extensión de las lesiones. Posteriormente, fueron desinfectados superficialmente por inmersiones sucesivas en etanol 70% 1 min, NaClO 4% 2 min, lavados con agua destilada estéril y secados en papel estéril. Se obtuvieron ocho segmentos (3×2 mm) de la zona del inóculo, del borde de la lesión y del interior de la misma con un bisturí estéril. Cuando no hubo lesión, se obtuvieron dos segmentos del punto de inoculación y otros seis segmentos fueron tomados de otras partes del entrenudo. Los segmentos fueron inoculados en placas conteniendo PDA, incubados 25°C y ciclos de 12 horas de luz – oscuridad. Las placas fueron revisadas diariamente durante tres semanas.

4.3.4 Análisis de datos

Con los datos provenientes del número de plantas o sarmientos con lesiones y número de plantas o sarmientos de donde se pudieron reaislar los hongos inoculados se elaboró una tabla de contingencia y se calculó el Chi cuadrado o prueba de Fischer Exact Test ($P = 0,05$). Las diferencias entre tratamientos en el tamaño promedio de las lesiones fueron analizadas de acuerdo a la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov ($P = 0,05$) debido a que los datos no presentaron distribución normal.

4.4 Resultados

4.4.1 Patogenicidad y virulencia de *Botryosphaeria* spp.

Inoculación de sarmientos en laboratorio

Los cuatro aislamientos de *N. parvum* y el aislamiento de *N. luteum* resultaron ser los más virulentos según el largo de las necrosis producidas (Figura 47, Tabla 5). El número de sarmientos con necrosis y el número sarmientos con reaislamientos igualan a estas especies con los aislamientos de *F. aesculi*, que demostraron una virulencia intermedia. Si bien los dos aislamientos de esta especie se comportaron de forma similar, V52 fue muy variable y no se diferenció estadísticamente del control (Tabla 5, Anexo 14C). El aislamiento de *Diplodia seriata* no se diferenció del control en ninguno de los tres parámetros considerados (Tabla 3, Anexos 14B,C,D), y por lo tanto resultó no patogénica en el cultivar Tannat.

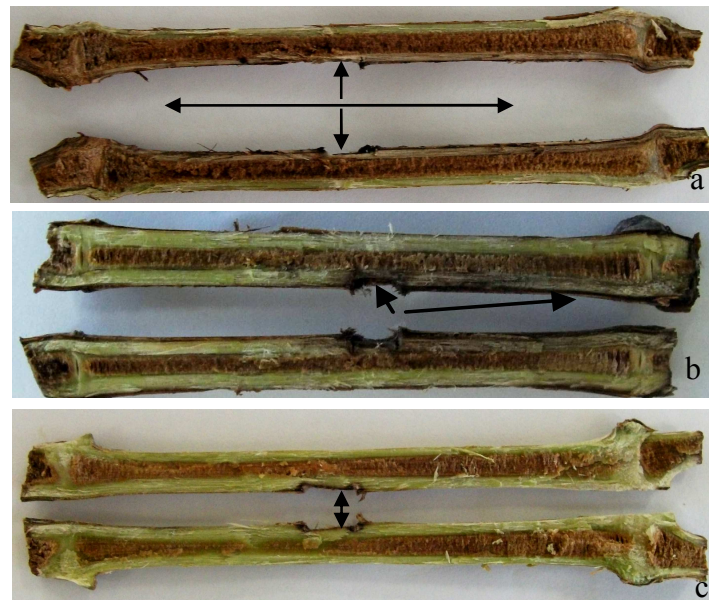


Figura 47. Necrosis en sarmientos inoculados. a: *N. parvum* V1, b: *N. luteum* V52, c: control inoculado con agar estéril

Tabla 5. Ensayo de patogenicidad de *Botryosphaeria* spp. en sarmientos del cv. Tannat

	Control	D. seriata V117	F. aesculi V52	F. aesculi V122	N. luteum V479	N. parv V2	N. parv V125	N. parv. V156	N. parv V339
Número de sarmientos con lesiones	1a	3ab	4abc	6bc	5bc	7c	7c	7c	7c
Largo lesiones cm	1,29±3,4 a	1,36±1,89 ab	3,57±4,08 abcd	3,21±1,98 bc	6,43±4,71 de	8,14±2,43 e	8,50±2,06 e	9,21±1,11 e	7,57±1,51 e
Número de sarmientos con reaislamiento	2 a	3 ab	5 abc	6 bc	6 bc	7 c	7 c	7 c	7 c

Dentro de cada fila valores con letras diferentes son significativamente diferentes. Kolmogorov Smirnov ($P < 0,05$) (Largo de lesiones) o Fisher exact test (Número de sarmientos con lesiones y Número de reaislamientos).

El largo de la lesión corresponde al promedio del largo de las lesiones presentes en 7 sarmientos

Inoculación de sarmientos en campo

Las inoculaciones a campo realizadas en invierno no produjeron necrosis. Si bien las especies inoculadas pudieron ser reaisladas, el reaislamiento ocurrió sólo a partir del punto de inoculación, y también se reaisló *Botryosphaeria* del testigo inoculado con agar estéril. (Anexos 15 A,B,C,D). Por lo tanto, ninguna de las especies inoculadas demostró ser patogénica en el cultivar Tannat en campo.

4.4.2 Patogenicidad y virulencia de *Greeneria uvicola*

Ensayo en plantines

Analizando todos los cultivares sumados, hubo diferencias significativas en número de plantas con necrosis, largo de las necrosis y número de reaislamientos entre ambas cepas de *G. uvicola* y el control inoculado con agar estéril, mientras que no se registraron diferencias significativas entre uno y otro aislamiento de *Greeneria* (Figura 48, Tabla 6).

El efecto de los aislamientos sobre los distintos cultivares considerados individualmente fue diferente (Tabla 7). El número de plantas que mostró decoloración fue significativamente diferente del control para todas las combinaciones de aislamiento fúngico-cultivar (Tabla 7), con excepción de FI 12007 inoculado en SO4 ($P = 0,24$) y Tannat ($P = 0,22$) y FI 12008 inoculado en Cabernet Sauvignon ($P = 0,08$) en los cuales los tratamientos no se diferenciaron del control (Anexo 16A,B).

El largo de las lesiones fue muy variable dentro de cada cultivar pero igualmente resultó significativamente diferente del control excepto en el cv. Tannat inoculado con *G. uvicola* FI12007 ($p = 0,31$) y en el cv. Cabernet Sauvignon inoculado con *G. uvicola* FI 12008 ($P = 0,53$) (Anexo 16D).

Al comparar portainjertos con cultivares, FI12008 mostró mayor virulencia, evaluada a través de largo de las lesiones, hacia los portainjertos, mientras que el aislamiento FI12007 no mostro diferencias en virulencia hacia uno u otro grupo.

El número de reaislamientos varió entre 0 y 3 dependiendo del cultivar, pero en ningún caso fue significativamente diferente del control, a pesar de que *G. uvicola* nunca fue reaislado de las plantas control (Tabla 7, Anexo 16E).



Figura 48. Inoculación con *G. uvicola*.

a: portainjerto inoculado con *G. uvicola* y necrosis que se extiende longitudinalmente desde los puntos de inoculación, b: control inoculado con agar estéril, sin necrosis.

Tabla 6. Ensayo de patogenicidad de aislamientos de *G. uvicola* para todos los cultivares combinados

	Todos los cultivares		
	Número de plantas con necrosis	Largo de Necrosis	Número de plantas con reaislamiento
<i>G. uvicola</i> (FI 12007)	13 a	21.7 ± 32.5 a	6 a
<i>G. uvicola</i> (FI 12008)	17 a	18.4 ± 15.8 a	6 a
Control	1 b	0.6 ± 2.6 b	0 b

Dentro de cada columna, valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según test de KolmogorovSmirnov test (Largo de Necrosis) o Chi-Square test (Número de Plantas con Necrosis y Número de plantas con reaislamiento).

Tabla 7. Ensayo de patogenicidad de aislamientos de *G. uvicola* para cada cultivar

	SO4			3309 Couderec			Tannat			Cabernet Sauvignon		
	NPN	LN	NR	NPN	LN	NR	NPN	LN	NR	NPN	LN	NR
<i>G. uvicola</i> (FI 12007)	3 ab	28.8±39.1 a	0 a	4 a	39.6±51.9 a	3 a	2 ab	7±9.7 ab	0 a	4 a	11.4±9 a	3 a
<i>G. uvicola</i> (FI 12008)	5 b	24.4±6.2 a	2 a	4 a	29.8±26.5 a	1 a	4 b	11.4±7.3 b	2 a	3 ab	8±7.6 ab	1 a
Control	1 a	2.4±5.3 b	0 a	0 b	0 b	0 a	0 a	0 a	0 a	0 b	0 b	0 a

NPN: número de plantas con necrosis

LN: Largo de la necrosis en mm (promedio de 5 observaciones ± desvío estándar).

NR: Número de plantas de las cuales el hongo inoculado pudo ser reaislado.

Dentro de cada columna, valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según test de Kolmogorov Smirnov (LN) o Fisher Exact Test (NPN y NR).

4.4.3 Patogenicidad y virulencia de *C. luteo-olivacea*

Ensayo en plantines

C. luteo-olivacea causó necrosis en una planta del portainjerto 3309C y una planta del cv. Cabernet Sauvignon, mientras que plantas de SO4 y Tannat no presentaron necrosis (Tabla 8, Anexo 17A). Las diferencias con las plantas control, dos de las cuales mostraron necrosis, no fue significativa ($P = 0,15$). *C. luteo olivacea* nunca fue reaislada de plantas inoculadas o plantas control (Tabla 8 y 9).

Tabla 8 Ensayo de patogenicidad de aislamientos de *C. luteo-olivacea* para todos los cultivares combinados

	Todos los cultivares		
	Número de plantas con necrosis	Largo de Necrosis	Número de plantas con reaislamiento
<i>C. luteo-olivacea</i>	2 a	4.3 ± 16.4 a	0 a
Control	2 a	3.1 ± 9.8 a	0 a

LN: Largo de la necrosis en mm (media ± desvío estandard).

NR: numero de plantas de las cuales el hongo inoculado pudo ser reaislado .

Dentro de cada columna, valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según test de KolmogorovSmirnov test (LN) o Chi-Square test (NPN and NR).

Tabla 9. Ensayo de patogenicidad de aislamientos de *C. luteo-olivacea* para cada cultivar

	SO4			3309Couderc			Tannat			Cabernet Sauvignon		
	NPN	LN	NR	NPN	LN	NR	NPN	LN	NR	NPN	LN	NR
<i>C. luteo - olivacea</i>	0 a	0 a	0 a	1 a	15±33.5 a	0 a	0 a	0 a	0 a	1 a	2.4±5.4 a	0 a
Control	0 a	0 a	0 a	2 a	12.6±18.3 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

NPN: Número de plantas con necrosis.

LN: Largo de la necrosis en mm (promedio de 5 observaciones ± desvío estandard).

NR: Número de plantas de las cuales el hongo inoculado pudo ser reaislado.

Dentro de cada columna, valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según test de Kolmogorov Smirnov test (LN) o Fisher Exact Test (NPN and NR).

4.5 Discusión

Botryosphaeria spp.

Los cuatro aislamientos de *N. parvum* y el aislamiento de *N. luteum* resultaron ser los más virulentos según el largo de las necrosis producidas. Esto coincide con lo observado por Úrbez-Torres & Gubler (2009), quienes adjudicaron la más alta virulencia a aislamientos de estas dos especies y a *Lasiodiplodia* spp. cuya presencia no fue detectada en Uruguay, y parcialmente con Van Niekerk *et al.* (2006) que encontraron a *B. parva*/*N. parvum* como altamente virulenta, pero no así a *B. lutea*/*N. luteum* que resultó poco virulenta. El número de sarmientos con necrosis y el número de reaislamientos obtenidos igualan a estas especies con los aislamientos de *F. aesculi*, que sólo demostró una virulencia intermedia, en coincidencia con lo observado por Van Niekerk *et al.* (2006). Si bien los dos aislamientos de esta especie fueron similares, V52 fue muy variable y no se diferenció estadísticamente del control. La variabilidad en la virulencia, evidenciada en los importantes registros de desvío estándar del aislamiento más virulento, *F. aesculi* V52, podría estar evidenciando que las lesiones no se debieron solamente a la actividad patogénica del aislamiento sino a otras causas que produjeron, ya sea sarmientos sin lesión alguna o sarmientos con extensas lesiones (Anexo 14A). Según Úrbez-Torres & Gubler (2009), esta especie se comportó como medianamente virulenta.

El aislamiento de *Diplodia seriata* no se diferenció del control en ninguno de los tres parámetros considerados, y por lo tanto no resultó patogénica en el cultivar Tannat. Van Niekerk *et al.*, (2006), encontraron gran variabilidad en la virulencia entre aislamientos de esta especie. Úrbez-Torres & Gubler (2009) encontraron que esta especie, si bien era patógena, era débilmente virulenta.

El invierno es una época propicia para la entrada y colonización por cepas de *Botryosphaeria* a través de los cortes de poda que exponen el xilema de los sarmientos (van Niekerk *et al.*, 2006). Sin embargo, la inoculación a campo no reprodujo los resultados obtenidos en laboratorio. Esto podría deberse a que la inoculación se llevó a cabo a fines de invierno, cuando la vid se encuentra próxima a iniciar los procesos de rehidratación. En forma similar, van Niekerk *et al.*, (1996), encontraron que el ordenamiento de los aislamientos según virulencia se modificaba según fuesen inoculados en brotes verdes y/o maduros en laboratorio o en campo. La patogenicidad demostrada en el ensayo de

laboratorio, en sarmientos desconectados física y fisiológicamente de la planta, puede entenderse como una indicación de patogenicidad potencial de las cepas evaluadas hacia el cultivar. Por otra parte, la ineffectividad de la inoculación a fines de invierno puede ser indicativa de un momento fenológico particularmente seguro para llevar a cabo la poda de las vides, cuando los múltiples cortes que se realizan por planta serían poco favorables a la entrada de este hongo.

G. uvicola

Se demostró la patogenicidad de aislamientos de *G. uvicola* en plantas de 2 años de edad.

Aún cuando uno de los aislamientos fue obtenido como endófito de varas sanas y el otro de tejidos enfermos, ambos resultaron con similar virulencia hacia plantas de *V. vinifera* y portainjertos. Esto podría ser una indicación de que la especie es un patógeno latente, capaz de generar síntomas sólo bajo condiciones particulares como, por ejemplo, estrés de las plantas, como ha sido observado para otros patógenos (Morton, 1999).

La mayor sensibilidad de los portainjertos y la variabilidad de los resultados en los diferentes cultivares posiblemente indiquen también una diferente sensibilidad de los mismos ante la presencia del hongo. El hecho de que los portainjertos sean más susceptible que los cultivares subraya la importancia de manejar correctamente las plantas madres de portainjertos en vivero para minimizar la dispersión de esta especie a través de injertos contaminados.

En otros países, *G. uvicola* causa la podredumbre amarga de las uvas (Farr *et al.*, 2001; Pfenning *et al.*, 2006; Steel *et al.*, 2007; Longland & Sutton, 2008). Sin embargo, no existen reportes de esta enfermedad en Uruguay. Si bien es posible que las condiciones agroclimáticas en Uruguay no sean conducentes al desarrollo de la podredumbre amarga, la presencia de *G. uvicola* en los viñedos asociada al síntoma de brazo muerto y como endófito debe ser considerada como una eventual fuente de inóculo para el desarrollo de la podredumbre amarga. De la misma forma, en países donde la podredumbre amarga de los racimos es una enfermedad frecuente, existiría el riesgo de una producción de inóculo que luego pueda infectar los troncos, como ha sido sugerido para Botryosphaeriaceae (Van Niekerk *et al.*, 2006).

Los canchros de la madera atribuidos a *E. lata* han sido separados de los canchros producidos por Botryosphaeriaceae debido a la ausencia de síntomas externos típicos causados por metabolitos fúngicos producidos por *E. lata* como la eutipina, que dan a las hojas la forma

típica de copa y brotes con escaso desarrollo (Castillo-Pando *et al.*, 2001). *G. uvicola* podría ser considerada una especie adicional que también puede causar canchros pero sin producir síntomas foliares específicos.

C. luteo-olivacea

El aislamiento de *C. luteo-olivacea* originalmente aislado de plantas con síntomas no produjo necrosis en los cultivares evaluados y tampoco pudo ser reaislado y por lo tanto este aislamiento puede ser considerado como no patogénico en los cultivares evaluados y en las condiciones usadas en el presente ensayo. Otros aislamientos de esta especie han sido capaces de causar decoloración y declinamiento de portainjertos, así como síntomas de enfermedad en inoculaciones a campo (Halleen *et al.*, 2007; Gramaje *et al.*, 2010). Los resultados divergentes podrían deberse a la diferencia en virulencia entre cepas de una misma especie, como ha sido demostrado para *Cadophora gregata* (Tabor *et al.*, 2007). También, los estados fenológico y fisiológico de las plantas de vid podrían no haber sido proclives al desarrollo de la infección, como ha ocurrido con *Botryosphaeriaceae* spp. inoculadas en momentos distintos al invierno (Úrbez-Torrez & Gubler, 2011).

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN GENERAL

La composición de la comunidad fúngica asociada a las enfermedades del tronco de la vid determinada en este estudio permitió separar por un lado al pie negro y, por otro, a la enfermedad de Petri, esca y brazo muerto.

La enfermedad de Petri, esca y brazo muerto se diferenciaron a su vez, de acuerdo a un gradiente de especies, algunas de las cuales se encontraron asociadas a una u otra dolencia, pero no en forma exclusiva. *Inocutis jamaicensis*, un Basidiomycete asociado a la podredumbre blanca de la esca, también fue aislado de plantas con síntomas de brazo muerto. Igualmente, *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* fueron aisladas principalmente a partir de plantas con síntomas de traqueomicosis, pero también lo fueron de brazos muertos. Esto parece indicar la existencia de un continuo de especies entre las traqueomicosis y el síntoma de brazo muerto.

La enfermedad de Petri que afecta plantas jóvenes de vid es causada por *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum*, que invaden los vasos del xilema, obturándolos y produciendo metabolitos tóxicos que se trasladan hasta las hojas, donde producen distintos síntomas. Eventualmente, las plantas mueren antes de entrar en plena producción. El estrés fisiológico de las vides provocado por cosechas excesivas en los primeros años de vida es considerado un factor predisponente al desarrollo de las traqueomicosis (Mugnai, 1999; Morton, 1999). Por otro lado, al ser la vid una liana trepadora, tiene vasos gruesos y extensos que permanecen viables por varios años, y por lo tanto resultan más favorables al ataque de patógenos vasculares (Ewers, 1985). La instalación de plantines libres de virus ha llevado a un incremento del vigor vegetativo, y es frecuente observar la formación de tallos con pocos entrenudos largos, y plantas que alcanzan su forma final en pocos años y con una edad fisiológica que les permite producir racimos tempranamente. El aumento observado en la incidencia de las traqueomicosis y en particular de la enfermedad de Petri a partir de los años 90 (Graniti *et al.*, 2000) podría estar influenciado por la presencia de vides con una estructura que favorece el desarrollo de hongos vasculares, y que se ven sometidas tempranamente a situaciones de estrés. La presencia de estos hongos en el material usado para la reproducción vegetativa de la vid podría ayudar a explicar la

repentina aparición de síntomas en viñedos jóvenes de todo el mundo. Los cebadores específicos seleccionados para ser usados en Uruguay fueron Pmo1f/Pmo2r basados en la región ITS del ADN ribosomal en el caso de *Pa. chlamydospora*, y los cebadores F2Bt/R1Bt basados en la secuencia parcial del gen que codifica para la β -tubulina en el caso de *P. aleophilum*. El uso de estos cebadores específicos en plantas madres de apariencia sana en viveros comerciales sirvió para demostrar la presencia de estos hongos en sarmientos usados para la injertación que visualmente no mostraban síntomas de la enfermedad. Si bien existen prácticas tendientes a reducir la cantidad de inóculo en los sarmientos injertados, como su calentamiento en agua a 50° C durante 30 minutos, o su hidratación en agua con antifúngicos (Fourie & Halleen, 2004), el uso de cebadores específicos debidamente evaluados como los que fueron seleccionados en este estudio resultará de mucha utilidad y conveniencia para determinar el estado sanitario de las plantas madre de las que se obtienen los sarmientos destinados a la propagación vegetativa de la vid.

Cadophora-luteo olivacea ha sido definida como una de las especies de acción menos conocidas asociadas a la enfermedad de Petri (Halleen *et al.*, 2007) y su patogenicidad ha sido demostrada (Halleen *et al.*, 2007; Gramaje *et al.*, 2010). Sin embargo, el aislamiento obtenido en este estudio de plantas sintomáticas no resultó virulento cuando se lo inoculó en plantines de cuatro cultivares de *Vitis* spp. La divergencia con los resultados obtenidos por otros investigadores podría deberse a la existencia de variabilidad en la virulencia entre aislamientos de especies patógenas.

La esca es definida como una traqueomicosis causada por la acción principal de *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum*, que es seguida de una podredumbre blanca de consistencia esponjosa causada por Basidiomycetes. En el follaje, aparecen hojas atigradas, que son consideradas típicas de la enfermedad. Si bien las dos primeras especies han sido asociadas a esta enfermedad en todos los continentes, *Inocutis jamaicensis* es el Basidiomycete aislado de plantas de vid con síntoma de “hoja de malvón” en Argentina (Bettucci *et al.*, 2005; Lupo *et al.*, 2006) y de la podredumbre blanca de la esca en Uruguay (Abreo *et al.*, 2008), pero no en otros continentes donde otras especies de este grupo son los responsables de la misma (Fischer, 2006).

En Uruguay, *I. jamaicensis* ha sido también aislado de árboles de *Eucalyptus* (Martínez, 2005) y de flora nativa, en los que produce podredumbre de los troncos. Estudios de

genética de poblaciones han indicado que se trata de una sólo población que coloniza estos hospederos de forma indistinta. La actividad de *I. jamaicensis* en árboles de *Eucalyptus* es problemática debido a que las podredumbres causan el debilitamiento del fuste y árboles de gran porte eventualmente se quiebran por la acción del viento (Perez *et al.*, 2008). Sin embargo, en la vid su asociación con la esca puede ser considerada de menor relevancia desde el punto de vista de la etiología de la enfermedad, ya que cuando la podredumbre blanca no se desarrolla la enfermedad igualmente se produce y es llamada esca joven. No obstante lo anterior, en Argentina, el síntoma hoja de malvón, similar a la esca, fue asociado a la producción de metabolitos por *I. jamaicensis* (Gatica *et al.*, 2004).

El brazo muerto de la vid comprende dos síntomas similares. En un corte transversal de los troncos afectados, se observa una necrosis sectorial, en forma de V, que con el paso de los años se extiende y termina por tomar todo el ancho de los brazos enfermos mientras crece también en forma longitudinal, hacia la base de los brazos, el tronco y raíces. Cuando los brazos mueren, la necrosis se encuentra ya muy extendida, y puede haber tomado el tronco principal. Esta sintomatología es común tanto para la Eutipiosis causada por *E. lata* como para el brazo negro muerto causado por especies de *Botryosphaeria*. La eutipiosis suele estar acompañada sin embargo, por la aparición de hojas en forma de copa en brotes de escaso desarrollo, que anteceden a la muerte del brazo. El brazo negro muerto puede presentar síntomas en el follaje, pero menos definidos.

En este estudio, las especies asociadas al brazo muerto fueron principalmente *N. parvum*, *N. luteum*, *F. aesculi* y *D. seriata* (anamorfos de *Botryosphaeria*). En los viñedos en el sur del país, se obtuvieron dos aislamientos sólomente de *Eutypella vitis*, mientras que en las otras regiones, ni esta especie ni *E. lata* pudieron ser aisladas de brazos muertos. Por lo tanto, el síntoma de brazo muerto en Uruguay se encuentra asociado principalmente a la presencia de *Botryosphaeria* spp. que se corresponde con la definición de brazo negro muerto y no eutipiosis. Los estudios de patogenicidad de una selección de aislamientos locales de *N. parvum*, *N. luteum*, *F. aesculi* y *Diplodia seriata* junto a dos aislamientos de *Greeneria uvicola*, (orden Diaporthales) frecuentemente aislados de brazos muertos, determinaron que *G. uvicola* es un patógeno capaz de causar la necrosis de tejidos en plantas de vid enteras, mientras que *N. parvum* y *N. luteum* resultaron potencialmente

patogénicas al causar necrosis de tejidos en sarmientos inoculados en laboratorio. *F. aesculi* resultó medianamente virulenta, y *D. seriata* resultó no virulenta.

El pie negro, que ocurre frecuentemente en viñedos jóvenes y en condiciones de suelos con poco drenaje, estuvo caracterizado por la presencia de *Cylindrocarpon* spp. y *Campylocarpon* spp. Especies de *Cylindrocarpon* han sido citadas previamente en Uruguay (Koch *et al.*, 1981) asociadas a canchales de los manzanos y perales, y en el mundo varias especies han sido señaladas como causantes del pie negro de la vid (Halleen *et al.*, 2004, 2006). Estos hongos penetran en las raíces y en el tronco a la altura de la unión del injerto y se extienden en los tejidos que rodean a los vasos sin penetrarlos. La formación de tilosis y la producción de sustancias fitotóxicas como la Brefeldina A y radicolin lleva a la muerte de la planta (Sweetingham, 1983).

Las 6 especies identificadas en este estudio asociadas al pie negro resultaron ser más de las esperadas, e incluyeron a *C. liriodendri* y *C. macrodidimum*, consideradas altamente patogénicas en vid, y a *Ca. pseudofasciculare*, por primera vez citada fuera de Sudafrica (Chaverri *et al.*, 2011) donde se la describió originalmente (Halleen *et al.*, 2004).

En términos de distribución geográfica, los aislamientos de *G. uvicola* fueron obtenidos principalmente de los viñedos del norte del país, mientras que *E. vitis* fue encontrada en un viñedo del sur aunque en poca frecuencia.

Además de *Cylindrocarpon* spp. y *Ca. pseudofasciculare*, *C. luteo-olivacea* y especies de *Fusarium* se asociaron a los portainjertos, mientras que *E. vitis* e *I. jamaicensis* se asociaron al cv. Cabernet Sauvignon.

En relación a los síntomas externos, los cultivares Tannat y Merlot se encontraron asociados a los síntomas de la enfermedad de Petri, los cultivares Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc y Cabernet Franc se vieron asociados al brazo muerto y esca, y el Marselan al brazo muerto. Estos últimos cultivares se encuentran genéticamente relacionados, debido a que se reconoce que Cabernet Franc y Sauvignon Blanc son los progenitores de Cabernet Sauvignon (Bowers & Meredith, 1997), y éste de Marselan (Bouquet & Boursiquot, 1999). Este grupo se encuentra más afectado por las enfermedades de lenta progresión y cuyos síntomas se presentan en plantas adultas.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

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.

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 continuo de especies entre la enfermedad de Petri, esca y brazo muerto. Dentro de este continuo: *I. jamaicensis*, *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum*, usualmente asociados a la esca y enfermedad de Petri, también fueron asociados al brazo muerto; las especies de *Botryosphaeria*, causantes del brazo negro muerto, también aparecieron asociadas a la esca.

E. vitis fue aislada sólo de plantas del cultivar Cabernet Sauvignon con síntomas de brazo muerto y si bien sólo se obtuvieron dos aislamientos, fue la única especie que resultó asociada en exclusividad con un síntoma y un cultivar.

Se demostró que *G. uvicola* es una especie patógena que causa la necrosis de tejidos en plantas de vid inoculadas y por lo tanto debe ser considerada una especie adicional asociada al síntoma del brazo negro muerto.

Se determinó la patogenicidad potencial de aislamientos obtenidos en este estudio de *N. parvum* y de *N. luteum* en coincidencia con los resultados generados en otros países. Por lo tanto es recomendable que los programas de manejo de enfermedades actualmente aplicados en los viñedos tengan en cuenta la abundante presencia de estas especies en los viñedos del Uruguay.

El aislamiento de *C. luteo-olivacea* obtenido en este estudio no resultó virulento en plantas de vid.

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.

Se detectó la presencia de *Pa. chlamydospora* y *P. aleophilum* como endófitos en sarmientos sanos usados para la reproducción vegetativa y por lo tanto los plantines constituyen una fuente inicial de dispersión de estos patógenos.

Se constató que los cebadores específicos generados y evaluados en sus regiones de origen pueden resultar inespecíficos cuando se los utiliza sobre material vegetal proveniente de otras localidades, que contiene organismos que no fueron considerados en origen. Por lo tanto deben ser evaluados localmente en forma previa a su uso sistemático en tareas de diagnóstico.

Por medio de este estudio se comprobó la presencia de todas las enfermedades del tronco de la vid en el territorio nacional y se identificaron por primera vez en nuestro país las especies de hongos patógenos asociados a los síntomas.

BIBLIOGRAFÍA

Abreo E, Lupo S, Martinez S, Bettucci L (2008) Fungal species associated with grapevine trunk diseases in Uruguay. *Journal of Plant Pathology* 90: 591.

Agrios G (1991) *Fitopatología*. 530 p. Noriega Editores, Mexico.

Alaniz S, León M, Vicent A, García-Jiménez J, Abad-Campos P, Armengol J (2007) Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with Black Foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 91: 1187–1193.

Alaniz S (2008) *Caracterización y control de Cylindrocarpon spp. agente causal del pie negro de la vid*. Tesis Doctoral. Universidad Politecnica de Valencia

Alaniz S, Armengol J, León 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 β -tubulin gene as the target sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 : 1131-1140.

Feliciano AJ, Gubler W (2001) Histological investigations on infection of grape roots and shoots by *phaeoacremonium* spp. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S387–S393.

Bell A (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology* 32: 21-81.

Betina V, Murin A (1964) Inhibition of mitotic activity of *Vicia faba* by the antibiotic cyanein. *Cytologia* 29: 370–374.

Bettucci L, Lupo S, Perez A, Martinez S, Cesari C, Escoriaza G, Gatica M (2005) Characterization and identification of the basidiomycetes fungus associated to "hoja de malvón" grapevine disease in Argentina. *Phytopathologia Mediterranea* 44: 88.

Bidartondo MY, Gardes M, (2005) Fungal diversity in molecular terms: profiling, identification, and quantification in the environment. In: The fungal community its organization and role in the ecosystem. Ed. Dighton, White, Oudemans. Taylor And Francis.

Bowers J, Meredith C (1997) The parentage of a classical wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature Genetics* 16: 84-87.

Bouquet A, Boursiquot J (1999) Safeguarding old varieties and developing recently obtained new cultivars: a joint step to conciliate tradition and innovation in France. *OIV Bulletin*: 753-761.

Bruno G, Sparapano L (2006) Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L. iii. enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 182-194.

Byrde R (1963) Natural inhibitors of fungal enzymes and toxins in disease resistance. In: perspectives in biochemical plant pathology. S. Rich Ed., Connecticut Agricultural Experimental Station Bulletin: 663.

Cabral A, Rego C, Nascimento T, Oliveira H, Groenewald JZ, Crous PW (2009) Multigene sequence analyses reveal novel *Cylindrocarpus* species associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Phytopathologia Mediterranea* 48: 159-188.

Camarda L, Merlini L, Nasini G (1976) Metabolites of *Cercospora*. Taiwapyrone, an α -pyrone of unusual structure from *Cercospora taiwanensis*. *Phytochemistry* 15: 537-539

Carmona MJ, Chaïb J, Martínez-Zapater JM, Thomas MR (2008) A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of Experimental Botany* 59: 2579–2596

Carter M (1957) Vines aid spread of apricot gummosis. *Journal of the Department of Agriculture, South Australia* 60: 482-483.

Carter M (1996) *Eutypa dieback*. In: *Compendium of grape diseases*. Eds Rc Pearson, Ac Goheen, 32–35.

Catal M, Jordan SA, Butterworth SC, Schilder AMC (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 AY, Samuels GJ (2011) Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (nectriaceae, hypocreales, ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Mycology* 68: 57-78.

Comont G, Corio-Costet MF, Larignon P, Delmotte F (2010) AFLP markers reveal two genetic groups in the French population of the grapevine fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora*. *European Journal of Plant Pathology* 127:451-464

Crous P, Gams W (2000) *Phaeomoniella chlamydospora* Gen. Et Comb. Nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 112-118.

Crous P, Slippers B, Wingfield M, Rheeder J, Marasas W, Phillips A, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald J (2006) Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55: 235-253.

Dai GH, Andary C, Mondolot-Cosson L, D. Boubals D (1995) Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V.*

rotundifolia and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46 : 177-188.

Del Río JA, González A, Fuster MD, Botía JM, Gómez P, Frías V, Ortuño A (2001) Tyloses formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S394–S399.

Del Río JA, Gómez P, Báidez A, Fuster MD, Ortuño A, Frías V (2004) Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 87–94.

Denman S, Crous P, Taylor JE, Kang JC, Pascoe I, Wingfield MW (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.

Deswarte C, Rouquier P, Roustan JP, Dargent R, Fallot J (1994) Ultrastructural changes produced in plantlet leaves and protoplasts of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon by eutypine, a toxin from *Eutypa lata*. *Vitis*, 33 :185-188.

Djoukeng J, Pollo S, Larignon P, Abou-Mansour E (2009) Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 124: 303-308.

Eriksson K, Blanchette R, Ander P (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Ewers F (1985) Xylem structure and water conduction in conifer trees, dicot trees, and lianas. *Iawa Bulletin* 6: 309-317. Michigan State University, U.S.A.

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 PH, Halleen F (2004) Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease* 88: 1241-1245.

Goffinet M (1999) The water and food conducting system of the grapevine. In: Black Goo- occurrence and symptoms of grapevine declines. IAS-ICGTD Proceedings 1998 (L. Morton Ed.) International Ampelography Society, USA.

Glass NL, Donaldson GC (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.

Gramaje D, García-Jiménez J, Armengol J (2010) Field evaluation of grapevine rootstocks inoculated with fungi associated with Petri disease and esca. *American Journal of Enology and Viticulture* 61: 512–520.

Graniti A, Surico G, Mugnai L (2000) Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? *Phytopathologia Mediterranea* 39: 16-20.

Graniti A (2006) From fire esca to esca of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S5–S11.

Grasso S, Di San Lio M, (1975) Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporum* su piante di vite in Sicilia. *Vitis* 14:38-39.

Hammer Ø, Harper DAT, and Ryan PD (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

Halleen F, Groenewald JZ, Crous PW (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 PH, Crous PW (2006a) A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S55 -S67.

Halleen F, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H, Crous PW (2006b) *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines. *Studies in Mycology* 55: 227–234.

Halleen F, Mostert L, Crous PW (2007) Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi of grapevines. *Australasian Plant Pathology* 36: 277–285.

Hawksworth DL (2001) The magnitude of fungal diversity: 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105:1422-1432

Hirsch P, Mauchline T, Mendum T, Kerry B (2000) Detection of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in nematode-infested plant roots using PCR. *Mycological Research* 104: 435-439

Jordan S, Schilder A (2005) *Eutypella vitis*, a potential pathogen of grapevines in Michigan. *Phytopathology* 95, 6.

Koch L, Boasso C, Riccio O, Gandolfo C (1981) Enfermedades de las plantas, hongos superiores y saprofitas en el Uruguay. Departamento de Comunicaciones. Dirección de Sanidad Vegetal. M. A. P. Uruguay.

Lee S, Taylor J (1990) Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. M.A. Innis, D. H. Gelfand, J.J. Snindky, T.J. White (ed.), Academic Press, San Diego, CA, USA, 282–287.

Lehoczky J (1974) Black Dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 9: 319 – 327.

Levadoux L (1956) Les populations sauvages et cultivées de *Vitis Vinifera* L. *Annales De L'amélioration Des Plantes*, 59-118.

Lupo S, Bettucci L, Pérez A, Martínez S, Césari C, Escoriaza G, Gatica M (2005) Characterization and identification of the basidiomycetous fungus associated to 'hoja de malvón' grapevine disease in Argentina. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S110-S116.

Maluta D, Larignon P (1991) Pied-noir: mieux vaut prévenir. *Viti*, 11 : 71-72.

Marchi G, Peduto F, Mugnai L, Di Marco S, Calzarano F, Surico G (2006) Some observations on the relationship of manifest esca and hidden esca to rainfall. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S117–S126.

Martin N, Damiano V, Rego C, Monteiro S, Oliveira H (2009) *Phaeomoniella chlamydospora* infection induces changes in phenolic compounds content in *Vitis vinifera* *Phytopathologia Mediterranea* 48: 101–116.

Martínez S (2005) *Inocutis jamaicensis*, the causal agent of Eucalyptus stem rot in Uruguay. *Mycotaxon* 91: 165–171.

Martos S, Andolfi A, Luque J, Mugnai L, Surico G, Evidente A (2008) Production of phytotoxic metabolites by five species of *Botryosphaeriaceae* causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology* 121:451–461.

Mauro MC, Vaillant V, Tey-Rulh P , Mathieu Y, Fallot J (1988) In vitro study of the relationship between *Vitis vinifera* and *Eutypa lata* (Pers.: Fr.) Tul. I. Demonstration of

toxic compounds secreted by the fungus. *American Journal of Enology and Viticulture* 39: 200-204.

Mirrington R, E Ritchie, C Shoppee, Sternhell S, Taylor WC (1966) Some metabolites of *Nectria radicicola* Gerlach & Nilsson (Syn. *Cylindrocarpon Radicicola* Wr.): the structure of radicol (monorden). *Australian Journal of Chemistry* 19: 1265 – 1284.

Moller WJ, English H, Davis J (1968) *Eutypa armeniacae* on grape in California. *Plant Disease Research* 52:751.

Moller WJ, Kasimatis AN (1978) Dieback of grapevines caused by *Eutypa armeniacae*. *Plant Disease Research* 62:254-258.

Moore JH, Davis ND, Diener UL (1972) Mellein and 4-hydroxymellein production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. *Applied Environmental Microbiology* 23: 1067-1072

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.

Morton L. 2000. *Viticulture and grapevine declines: lessons of black goo*. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 59–67.

Mostert L (2006) *Phylogeny and taxonomy of Phaeoacremonium and its relatives*. PhD Thesis. Wageningen University, The Netherlands. ISBN 90-8504- 460-X

Mugnai L, Graniti A, Surico G (1999) Esca (Black Measles) and brown wood-streakening: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 83: 404–418.

O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two different intragenomics rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics Evolution* 7: 103–116.

Overton BE, Stewart EL, Xinshun QU, Wenner NG, Christ BJ (2004) Qualitative real-time PCR SYBR Green detection of Petri disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 403–410.

Pavlic D, Slippers B, Coutinho T, Wingfield M (2009) Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: A case study on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 259-268.

Pérez G, Lupo S, Bettucci L (2008) Polymorphisms of the ITS region of *Inocutis jamaicensis* associated with *Eucalyptus globulus*, *Vitis vinifera* and native plants in Uruguay. *Sydowia* 60: 267-275.

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.

Plomion C, Leprovost G, Stokes A (2001) Wood formation in trees. *Plant Physiology*, 127: 1513–1523.

Pratt C (1974) Vegetative anatomy of cultivated grapes - A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 25: 131-150.

Rego MC, Oliveira H, Carvalho A, Phillips A (2000) Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 76–79.

Rolshausen PE, Greve LC, Labavitch JM, Mahoney NE, Molyneux RJ, Gubler WD (2007) Pathogenesis of *Eutypa lata* in grapevine: identification of virulence factors and biochemical characterization of cordon dieback. *Phytopathology* 98: 222-229.

Romanazzi G, Murolo S, Pizzichini L, Nardi S (2009) Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of associated fungi. *European Journal of Plant Pathology* 125: 277–290.

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.

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.

Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O (Eds) (1995) Introduction to Foodborne Fungi, fourth edition, CBS, Baarn, Netherlands, p. 85-119.

Santos C, Fragoeiro S, Valentim H, Phillips A (2006) Phenotypic characterisation of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* strains isolated from grapevines: enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses. *Scientia Horticulturae* 107: 123-130.

Scheck HJ, Vasquez SJ, Gubler WD (1998) First report of black-foot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporum*, of grapevine in California. *Plant Disease* 82: 448.

Schmit JP, Lodge DJ (2005) Classical methods and modern analysis for studying fungal diversity. In: the fungal community its organization and role in the ecosystem. Ed. Dighton, White, Oudemans, Taylor and Francis.

Scholander PF, Love WE, Kanwisher JW (1955) The rise of sap in tall grapevines. *Plant Physiology* 30, 93–104.

Schwarze F, Engels J, Mattheck C (2000) Fungal strategies of wood decay in trees. Springer Verlag, Berlin.

Seifert K (2009) Barcoding fungi. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9: 83-89

Smith JE, Molina R, Huso MMP, Luoma DL, McKay D, Castellano MA, Lebel T, Valachovic Y (2002) Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigeous ECM fungal sporocarps in young, rotation age, and old-growth stands of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the cascade range of Oregon, USA. *Canadian Journal of Botany* 80: 186-204

Sosnowski M, Loschiavo, A (2010). Final Report. Management of *Eutypa* dieback and *Botryosphaeria* canker in South-Western Australian Vineyards.
http://www.gwrdc.com.au/webdata/resources/project/RT_08-02-1.pdf

Surico G (2009) Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 5–10.

Sweetingham M (1983) Studies on the nature and pathogenicity of soilborne *Cylindrocarpon* spp. PhD Thesis, University of Tasmania, Australia.

Swofford DL (2003) PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.

Taylor JW (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21–32

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. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 134–149.

This P, Lacombe T, Thomas M (2006) Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* 22: 511-519

Trocchi L, Calamassi R, Mori B, Mugnai L, Surico G (2001) *Phaeomoniella chlamydospora* - grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S400–S406.

Úrbez-Torres JR, Leavitt GM, Voegel TM, Gubler WD (2006a) Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease* 90: 1490-1503.

Úrbez-Torres JR, Gubler WD, Peláez H, Santiago Y, Martín C, Moreno C (2006b) Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea*, and *B. parva* associated with grapevine trunk diseases in Castilla y León region, Spain. *Plant Disease* 90: 835.

Úrbez-Torres JR, Gubler W D (2009) Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease* 93:584-592.

Úrbez-Torres JR, Adams P, Kama J, Gubler WD (2009) Identification, incidence and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas. *American Journal of Enology and Viticulture* 60: 497–507.

Van Niekerk JM, Fourie P, Halleen F, Crous PW (2006) *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S43–S54.

Vidhyasekaran P (1988) *Physiology of disease resistance in plants*. Vol. II, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA.

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.

Vivier M, Pretorius IS (2002) Genetically tailored grapevines for the wine industry. Trends in Biotechnology 20: 472-478

Weiland JJ, Sundsbak JL (2000) Differentiation and detection of sugar beet fungal pathogens using PCR amplification of actin coding sequences and the ITS region of the rRNA gene. Plant Disease 84:475-482.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (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.

Zanzotto A, Autiero F, Bellotto D, Dal Cortivo G, Lucchetta G, Borgo M (2007) Occurrence of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* in grape propagation materials and young grapevines. European Journal of Plant Pathology 119: 183–192.

Zimmermann M, Jeje A (1981) Vessel-length distribution in stems of some American woody plants. Canadian Journal of Botany 59: 1882-1892.

Zohry D (1996) The mode of domestication of the founder crops of southwest asian agriculture. In: The origins and spread of agriculture and pastoralism in Eurasia, David R. Harris.

Zohary D, Hopf M (2000) Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in west Asia, Europe, and the Nile. Valley Oxford University Press. 316 p.

ANEXOS

Anexo 1. Lista de aislamientos

Código	Género	Síntoma	Región	Cultivar
V1	Botryosphaeria	Brazo muerto	Canelones	CabSauv
V4	Botryosphaeria	Brazo muerto	Canelones	CabSauv
V6	Alternaria	Petri	Canelones	Portainjerto
V7	Alternaria	Petri	Canelones	portainjerto
V8	Eutypella	Brazo muerto	Canelones	CabSauv
V9	Fusarium	Petri	Canelones	portainjerto
V13	Fusarium	Petri	Canelones	CabFranc
V15	Penicillium	Petri	Canelones	portainjerto
V16	Gliocladium	Petri	Canelones	CabFranc
V17	Microphaeropsis	Petri	Canelones	Tannat
V20	Eupenicillium	Petri	Canelones	portainjerto
V24	Phaeoacremonium	Petri	Canelones	portainjerto
V25	Phaeomoniella	Petri	Canelones	portainjerto
V29	Phaeomoniella	Petri	Canelones	Tannat
V30	Eutypella	Brazo muerto	Canelones	CabSauv
V32	Fusarium	Pie negro	Montevideo	Raiz
V35	Crinipellis	Pie negro	Montevideo	Raiz
V37	Cylindrocarpon	Pie negro	Montevideo	Raiz
V38	Cladosporium	Pie negro	Montevideo	Raiz
V39	Fusarium	Pie negro	Montevideo	Raiz
V40	Periconia	Pie negro	Montevideo	Raiz
V44	Phomopsis	Petri	Canelones	n.d.
V45	Phaeomoniella	Petri	Canelones	Inj
V46	Phaeomoniella	Petri	Canelones	Portainjerto
V47	Cadophora	Petri	Canelones	n.d.
V48	Phaeomoniella	Petri	Florida	n.d.
V49	Phaeomoniella	Petri	Montevideo	n.d.
V51	Fusarium	Petri	Montevideo	n.d.
V52	Botryosphaeria	Brazo muerto	Canelones	n.d.
V60	Cadophora	Petri	Colonia	n.d.
V64	Phaeomoniella	Petri	Florida	n.d.
V65	Phaeomoniella	Esca	Canelones	n.d.
V66	Phaeomoniella	Esca	Canelones	Gewurt
V67	Phaeoacremonium	Esca	Canelones	Gewurt
V68	Phaeomoniella	Esca	Canelones	Gewurt
V69	Phaeomoniella	Esca	Canelones	Gewurt
V70	Phaeomoniella	Brazo muerto	Canelones	n.d.
V71	Acremonium	Brazo muerto	Canelones	n.d.
V72	Phaeomoniella	Brazo muerto	Canelones	n.d.
V73	Cladosporium	Brazo muerto	Canelones	n.d.
V74	Phaeoacremonium	Esca	Canelones	n.d.
V76	Phoma	Esca	Canelones	n.d.
V78	Inocutis	Esca	Canelones	Sauvblanc
V79	Basidiomycete	Brazo muerto	Canelones	n.d.
V80	Basidiomycete	Esca	Colonia	CabSauv
V81	Fusarium	Esca	Colonia	CabSauv

V82	Phaeomoniella	Esca	Colonia	CabSauv
V85	Botryosphaeria	Esca	Colonia	CabSauv
V87	Phaeoacremonium	Esca	Colonia	CabSauv
V89	Botryosphaeria	Esca	Colonia	CabSauv
V90	Phaeoacremonium	Petri	Colonia	CabSauv
V92	Phaeomoniella	Petri	Colonia	CabSauv
V96	Botryosphaeria	Esca	Colonia	CabSauv
V97	Inocutis	Esca	Colonia	CabSauv
V99	Phomopsis	Brazo muerto	Colonia	Sirah
V100	Phaeoacremonium	Brazo muerto	Colonia	Sirah
V101	Phaeomoniella	Brazo muerto	Colonia	Sirah
V103	Botryosphaeria	Brazo muerto	Colonia	Sirah
V105	Phaeoacremonium	Brazo muerto	Colonia	Sirah
V106	Phomopsis	Esca	Colonia	Marselan
V108	Phaeomoniella	Esca	Colonia	CabSauv
V110	Phaeoacremonium	Esca	Colonia	CabSauv
V111	Phaeomoniella	Petri	Colonia	CabSauv
V112	Botryosphaeria	Esca	SanJose	Chardonnay
V115	Botryosphaeria	Brazo muerto	SanJose	n.d.
V116	Botryosphaeria	Brazo muerto	Paysandu	MoscOtonel
V118	Botryosphaeria	Brazo muerto	Paysandu	MoscOtonel
V119	Microphaeropsis	Esca	Paysandu	n.d.
V120	Greeneria	Esca	Paysandu	n.d.
V121	Phomopsis	Brazo muerto	Paysandu	MoscOtonel
V125	Botryosphaeria	Esca	Paysandu	Sirah
V126	Trichoderma	Brazo muerto	Paysandu	Grenache
V127	Greeneria	n.d.	Paysandu	Grenache
V129	Botryosphaeria	n.d.	Artigas	Italia
V131	Greeneria	n.d.	Artigas	Italia
V133	Botryosphaeria	Esca	Artigas	Italia
V134	Penicillium	Esca	Artigas	Italia
V135	Trichoderma	Esca	Artigas	Italia
V137	Penicillium	Esca	Artigas	Italia
V142	Greeneria	falta	Artigas	CabSauv
V143	Botryosphaeria	falta	Artigas	CabSauv
V151	Botryosphaeria	Brazo muerto	Artigas	CabSauv
V154	Phaeoacremonium	Brazo muerto	Paysandu	MoscOtonel
V156	Botryosphaeria	Brazo muerto	Artigas	n.d.
V160	Phaeoacremonium	Petri	Artigas	Tannat
V163	Trichoderma	Petri	Artigas	Tannat
V164	Inocutis	Brazo muerto	Paysandu	CabSauv
V169	Cadophora	Brazo muerto	Paysandu	CabSauv
V170	Fusarium	Brazo muerto	Paysandu	CabSauv
V173	Botryosphaeria	Brazo muerto	Paysandu	Tannat
V175	Phomopsis	Brazo muerto	Paysandu	Tannat
V177	Phomopsis	Esca	Paysandu	viña vieja bodega
V182	Phomopsis	Petri	Salto	Sirah
V185 186	Botryosphaeria	Petri	Salto	n.d.
V197	Phaeoacremonium	Petri	Artigas	CabSauv
V200	Phaeomoniella	Petri	Artigas	Tannat
V203	Phaeomoniella	Brazo muerto	Artigas	n.d.

V204	Inocutis	Brazo muerto	Paysandu	CabSauv
V205	Phaeoacremonium	Brazo muerto	Paysandu	CabSauv
V206	Phaeoacremonium	Brazo muerto	Paysandu	Tannat
V210	Verticillium	n.d.	n.d.	n.d.
V211	Phomopsis	n.d.	n.d.	n.d.
V212	Fusarium	n.d.	n.d.	n.d.
V214	Basidiomycete	n.d.	n.d.	n.d.
V215	Phaeoacremonium	n.d.	n.d.	n.d.
V218	Phaeomoniella	n.d.	n.d.	n.d.
v223	Inocutis	Brazo muerto	Paysandu	Grenache
v226	Phaeomoniella	Brazo muerto	Artigas	n.d.
v233	Eupenicillium	Petri	Colonia	Chardonnay
v234	Campylocarpon	Petri	Colonia	Chardonnay
v238	Fusarium solani	Petri	Colonia	Chardonnay
v239	Cylindrocarpon	Petri	Colonia	Chardonnay
v240	Fusarium	Petri	Colonia	Chardonnay
v245	Phaeomoniella	Petri	Salto	Portainjerto
v247	Botryosphaeria	Petri	Tacuarembó	desconocido
v248	Greeneria	Petri	Tacuarembó	desconocido
V250	Cylindrocarpon	Petri	Colonia	Chardonnay
V252	Botryosphaeria	n.d.	Tacuarembó	n.d.
V253	Inocutis	Brazo muerto	Tacuarembó	CabSauv
V260	Phaeomoniella	Petri	Tacuarembó	n.d.
V261	Phaeomoniella	Brazo muerto	Tacuarembó	n.d.
V265	Phaeomoniella	Petri	Tacuarembó	n.d.
V266	Acremonium	Petri	Tacuarembó	n.d.
V271	Inocutis	Brazo muerto	Durazno	Marselan
V273	Botryosphaeria	Brazo muerto	Durazno	CabSauv
V275	Inocutis	Brazo muerto	Durazno	CabSauv
V278	Phaeomoniella	Brazo muerto	Durazno	CabSauv
V282	Botryosphaeria	Brazo muerto	Durazno	CabFranc
V283	Cadophora	Petri	Durazno	Portainjerto
V286	Botryosphaeria	Petri	Durazno	desconocido
V288	Fusarium	Petri	Rivera	Portainjerto
V290	Botryosphaeria	Petri	Rivera	Portainjerto
V293	Botryosphaeria	Petri	Rivera	Portainjerto
V300	Botryosphaeria	Petri	Rivera	Portainjerto
V302	Botryosphaeria	Brazo muerto	Rivera	desconocido
V303	Botryosphaeria	Brazo muerto	Rivera	desconocido
V305	Phaeomoniella	Brazo muerto	Rivera	desconocido
V306	Alternaria	Petri	Rivera	desconocido
V309	Botryosphaeria	Petri	Rivera	desconocido
V310	Pestalotiopsis	Brazo muerto	Rivera	desconocido
V312	Phaeoacremonium	Brazo muerto	Rivera	desconocido
V315	Verticillium	Brazo muerto	Tacuarembó	desconocido
V317	Inocutis	Brazo muerto	Tacuarembó	CabSauv
V318	Greeneria	Petri	Artigas	CabSauv
V319	Phaeomoniella	Petri	Rivera	desconocido
V322	Phaeoacremonium	Petri	Rivera	Portainjerto
V323	Phaeomoniella	Brazo muerto	Rivera	desconocido

V324	Phaeoacremonium	Petri	Rivera	desconocido
V325	Botryosphaeria	Brazo muerto	Tacuarembó	Viognier
V327	Phaeoacremonium	Petri	Rivera	desconocido
V329	Pestalotiopsis	Petri	Maldonado	Merlot
V330	Aureobasidium	Petri	Maldonado	Merlot
V335	Basidiomycete	Petri	Maldonado	R99
V336	Fusarium	Petri	Maldonado	Portainjerto
V339	Botryosphaeria	Petri	Maldonado	Portainjerto
V345	Botryosphaeria	Plantin seco	Maldonado	Portainjerto
V351	Cadophora	Petri	Maldonado	Portainjerto
V352	Phaeomoniella	Petri	Maldonado	desconocido
V356	Fusarium	Petri	Maldonado	Portainjerto
V358	Inocutis	Petri	Rivera	desconocido
V359	Phaeoacremonium	Petri	Maldonado	Portainjerto
V360	Phaeomoniella	Petri	Maldonado	Portainjerto
V361	Cadophora	Petri	Maldonado	Portainjerto
V363	Phaeomoniella	Petri	Maldonado	Portainjerto
V365	Aureobasidium	Petri	Maldonado	Portainjerto

n.d.: no disponible

Anexo 2 A. Abundancia¹ de géneros según síntomas

	Código de Género	Síntoma			
		Brazo muerto	Esca	Petri	Pie negro
Acremonium	1	1	0	1	0
Alternaria	2	0	0	3	0
Aureobasidium	3	0	0	2	0
Botryosphaeria	5	16	6	6	0
Cadophora	6	1	0	4	0
Cladosporium	7	1	0	0	1
Crinipellis	8	0	0	0	1
Cylindrocarpon	9	0	0	1	3
Eupenicillium	10	0	0	1	1
Eutypella	11	2	0	0	0
Fusarium	12	1	1	5	3
Fusarium solani	13	0	0	1	0
Gliocladium	14	0	0	1	0
Greeneria	15	3	1	2	0
Inocutis	16	7	2	1	0
Microphaeropsis	17	0	1	1	0
Penicillium	18	0	2	1	0
Periconia	19	0	0	0	1
Pestalotiopsis	20	1	0	1	0
Phaeoacremonium	21	6	4	8	0
Phaeomoniella	22	9	6	17	0
Phoma	23	0	1	0	0
Phomopsis	24	3	2	2	0
Trichoderma	25	1	1	1	0
Verticillium	26	1	0	0	0
TOTAL		53	27	59	10

¹ Número de aislamientos

Anexo 2 B. Densidad relativa² de géneros según síntomas

	Código de Género	Brazo muerto	Esca	Petri	Pie negro
Acremonium	1	0,019	0,000	0,017	0,000
Alternaria	2	0,000	0,000	0,051	0,000
Aureobasidium	3	0,000	0,000	0,034	0,000
Botryosphaeria	5	0,302	0,222	0,102	0,000
Cadophora	6	0,019	0,000	0,068	0,000
Cladosporium	7	0,019	0,000	0,000	0,100
Crinipellis	8	0,000	0,000	0,000	0,100
Cylindrocarpon	9	0,000	0,000	0,017	0,300
Eupenicillium	10	0,000	0,000	0,017	0,100
Eutypella	11	0,038	0,000	0,000	0,000
Fusarium	12	0,019	0,037	0,085	0,300
Gliocladium	14	0,000	0,000	0,017	0,000
Greeneria	15	0,057	0,037	0,034	0,000
Inocutis	16	0,132	0,074	0,017	0,000
Microphaeropsis	17	0,000	0,037	0,017	0,000
Penicillium	18	0,000	0,074	0,017	0,000
Periconia	19	0,000	0,000	0,000	0,100
Pestalotiopsis	20	0,019	0,000	0,017	0,000
Phaeoacremonium	21	0,113	0,148	0,136	0,000
Phaeomoniella	22	0,170	0,222	0,288	0,000
Phoma	23	0,000	0,037	0,000	0,000
Phomopsis	24	0,057	0,074	0,034	0,000
Trichoderma	25	0,019	0,037	0,017	0,000
Verticillium	26	0,019	0,000	0,000	0,000

Anexo 2 C. Eigenvalue y porcentaje de la variación explicada

Eje	Eigenvalue	%del total
1	0,81707	73,02
2	0,181425	16,213
3	0,120479	10,767

² Dr = núm. de aislamientos de un género/ núm. de aislamientos totales

Anexo 2 D. Score³

Score	Axis 1	Axis 2	Axis 3
Brazo muerto	-0,58343	0,44234	0,42156
Esca	-0,59172	0,18416	-0,53487
Petri	-0,38415	-0,70463	0,1268
Pie negro	1,5564	0,065349	-0,013705
1	-0,54133	-0,2331	0,81351
2	-0,42498	-1,6543	0,36532
3	-0,42498	-1,6543	0,36532
4	-0,59798	0,099633	-0,36372
5	-0,61252	0,38441	0,10863
6	-0,47369	-1,0594	0,55294
7	1,3439	0,29474	0,16074
8	1,7219	0,15342	-0,039483
9	1,6068	0,05648	-0,017774
10	1,41	-0,10924	0,019335
11	-0,64544	1,0385	1,2145
12	1,017	-0,12781	-0,031784
14	-0,42498	-1,6543	0,36532
15	-0,58988	0,15304	0,19676
16	-0,63124	0,6311	0,25087
17	-0,58096	-0,23694	-0,92951
18	-0,61025	0,029257	-1,1727
19	1,7219	0,15342	-0,039483
20	-0,54133	-0,2331	0,81351
21	-0,57307	-0,1109	-0,095495
22	-0,55444	-0,30453	-0,035471
23	-0,65462	0,43236	-1,541
24	-0,60404	0,21414	-0,18337
25	-0,59798	0,099633	-0,36372
26	-0,64544	1,0385	1,2145

³ Valor de los ejes 1,2, 3

Anexo 2 E. Relay Index

	Brazo muerto	Esca	Petri	Pie negro
Relay indx	1,3822	1	10,566	100
23	0	100	0	0
11	100	0	0	0
26	100	0	0	0
16	59,633	32,569	7,7982	0
5	48,525	35,082	16,393	0
18	0	80,682	19,318	0
24	35	44,375	20,625	0
25	26,389	50	23,611	0
4	26,389	50	23,611	0
15	44,8	28,8	26,4	0
17	0	67,925	32,075	0
21	28,682	36,951	34,367	0
22	25,151	32,229	42,62	0
20	52,778	0	47,222	0
1	52,778	0	47,222	0
6	22,093	0	77,907	0
3	0	0	100	0
14	0	0	100	0
2	0	0	100	0
12	4,3379	8,2192	18,95	68,493
7	15,966	0	0	84,034
10	0	0	14,53	85,47
9	0	0	5,3628	94,637
19	0	0	0	100
8	0	0	0	100

Anexo 3 A. Abundancia de Géneros según cultivares.

	Código de Género	Otros cultivares	Cabernet Sauv.	Portainjertos
Botryosphaeria	1	7	8	5
Cadophora	2	0	1	3
Cylindrocarpon	3	3	0	4
Eupenicillium	4	1	0	1
Eutypella	5	0	2	0
Fusarium	6	1	2	6
Greeneria	7	2	2	0
Inocutis	8	3	6	0
Phaeoacremonium	9	6	5	3
Phaeomoniella	10	6	5	5
Phomopsis	11	5	0	0
TOTAL		34	31	27

Anexo 3 B. Densidad relativa de Géneros según cultivares

	Código de Género	Otros cultivares	Cabernet Sauv.	Portainjertos
Botryosphaeria	1	0,206	0,258	0,185
Cadophora	2	0,000	0,032	0,111
Cylindrocarpon	3	0,088	0,000	0,148
Eupenicillium	4	0,029	0,000	0,037
Eutypella	5	0,000	0,065	0,000
Fusarium	6	0,029	0,065	0,222
Greeneria	7	0,059	0,065	0,000
Inocutis	8	0,088	0,194	0,000
Phaeoacremonium	9	0,176	0,161	0,111
Phaeomoniella	10	0,176	0,161	0,185
Phomopsis	11	0,147	0,000	0,000

Anexo 3 C. Eigenvalue y porcentaje de la variación explicada

Eje	Eigenvalue	%del total
1	0,255127	62,199
2	0,155051	37,801

Anexo 3 D. Score

Score	Axis 1	Axis 2
Otros cultivos	-0,26526	0,51765
Cabernet Sauvignon	-0,44135	-0,43697
Portainjertos	0,70722	-0,079285
1	-0,11493	-0,081277
2	0,89131	-0,40462
3	0,68225	0,36393
4	0,55419	0,46476
5	-0,87379	-1,1097
6	0,75573	-0,24908
7	-0,7079	0,04379
8	-0,76499	-0,3532
9	-0,17341	0,06776
10	0,049662	0,02961
11	-0,52515	1,3146

Anexo 3 E. Relay Index

	Otros cultivos	Cabernet Sauv.	Portainjertos
Relay indx	16,178	1	100
5	0	100	0
8	31,206	68,794	0
7	47,581	52,419	0
11	100	0	0
9	39,286	35,938	24,777
1	31,741	39,753	28,505
10	33,716	30,843	35,441
4	43,939	0	56,061
3	37,288	0	62,712
6	9,1772	20,57	70,253
2	0	22,378	77,622

Anexo 4 A. Abundancia de géneros según departamento

	Código de Género	Artigas	Canelones	Colonia	Durazno	Florida	Maldonado	Montevideo	Paysandu
Acremonium	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Aureobasidium	2	0	0	0	0	0	2	0	0
Botryosphaeria	3	5	3	4	3	0	2	0	4
Cadophora	4	0	1	1	1	0	2	0	1
Eupenicillium	5	0	0	1	0	0	0	0	0
Eutypella	6	0	2	0	0	0	0	0	0
Fusarium	7	0	2	3	0	0	2	3	1
Greeneria	8	3	0	0	0	0	0	0	2
Inocutis	9	0	1	1	2	0	0	0	3
Phaeoacremonium	10	2	3	5	0	0	1	0	3
Phaeomoniella	11	3	10	5	1	2	3	1	0
Phoma	12	0	1	0	0	0	0	0	0
Phomopsis	13	0	1	2	0	0	0	0	3
TOTAL		13	25	22	7	2	12	4	17

Anexo 4 B. Densidad relativa de géneros según departamento

	Código de Género	Artigas	Canelones	Colonia	Durazno	Florida	Maldonado	Montevideo	Paysandu
Acremonium	1	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Aureobasidium	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000
Botryosphaeria	3	0,385	0,120	0,182	0,429	0,000	0,167	0,000	0,235
Cadophora	4	0,000	0,040	0,045	0,143	0,000	0,167	0,000	0,059
Eupenicillium	5	0,000	0,000	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Eutypella	6	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Fusarium	7	0,000	0,080	0,136	0,000	0,000	0,167	0,750	0,059
Greeneria	8	0,231	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,118
Inocutis	9	0,000	0,040	0,045	0,286	0,000	0,000	0,000	0,176
Phaeoacremonium	10	0,154	0,120	0,227	0,000	0,000	0,083	0,000	0,176
Phaeomoniella	11	0,231	0,400	0,227	0,143	1,000	0,250	0,250	0,000
Phoma	12	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Phomopsis	13	0,000	0,040	0,091	0,000	0,000	0,000	0,000	0,176

Anexo 4 C. Eigenvalue y porcentaje de variación

Eje	Eigenvalue	%del total
1	0,514913	32,419
2	0,365416	23,007
3	0,223799	14,091
4	0,175014	11,019
5	0,152564	9,6056
6	0,108906	6,8568
7	0,0476774	3,0018

Anexo 4 D. Score

Scores	Axis1	Axis2	Axis3	Axis4	Axis5	Axis6	Axis7
Artigas	-0,63204	0,089556	-0,53737	-0,72458	0,19458	-0,38126	-0,12374
Canelones	0,10926	0,45282	-0,17502	0,53035	-0,64173	-0,46346	0,0020821
Colonia	-0,12256	-0,16024	-0,22574	0,074403	-0,29519	0,56447	-0,38817
Durazno	-0,76575	-0,15699	0,57425	0,51902	0,5788	-0,15826	-0,12868
Florida	0,58843	1,2779	-0,041435	-0,030871	0,3577	0,26981	0,12708
Maldonado	0,20119	-0,13621	0,96287	-0,54777	-0,37173	0,0064837	0,068853
Montevideo	1,4347	-0,87583	-0,23683	0,073708	0,27081	-0,11997	0,020509
Paysandu	-0,81308	-0,49158	-0,32249	0,10674	-0,094326	0,28413	0,4219
1	0,15227	0,74909	-0,36995	1,2677	-1,643	-1,4044	0,0095355
2	0,28037	-0,22532	2,0354	-1,3094	-0,9517	0,019647	0,31533
3	-0,67798	-0,15906	0,086879	-0,071669	0,18255	-0,19904	-0,18885
4	-0,38376	-0,23064	0,96254	0,071621	-0,13437	0,01387	0,0060993
5	-0,1708	-0,26507	-0,47719	0,17785	-0,75575	1,7105	-1,7778
6	0,15227	0,74909	-0,36995	1,2677	-1,643	-1,4044	0,0095355
7	1,2319	-0,9634	-0,14285	0,045419	0,094467	-0,082469	-0,0032786
8	-0,96611	-0,17689	-0,98234	-1,0601	0,24808	-0,47359	0,2782
9	-0,92545	-0,36447	0,34902	0,83811	0,51476	0,064302	0,16801
10	-0,43723	-0,1438	-0,3667	-0,18158	-0,54406	0,25658	-0,16242
11	0,42224	0,77246	-0,019602	-0,012915	0,13971	0,089041	0,027748
12	0,15227	0,74909	-0,36995	1,2677	-1,643	-1,4044	0,0095355
13	-0,68038	-0,44717	-0,58045	0,36417	-0,57653	0,81763	0,58199

Anexo 4 E. Relay Index

	Artigas	Canelones	Colonia	Durazno	Florida	Maldonado	Montevideo	Paysandu
Relay indx	8,9738	41,623	31,413	3,0849	62,728	45,672	100	1
8	66,189	0	0	0	0	0	0	33,811
9	0	7,3126	8,2267	52,285	0	0	0	32,176
13	0	13,029	29,642	0	0	0	0	57,329
3	25,362	7,9051	11,989	28,261	0	11,001	0	15,481
10	20,263	15,789	29,868	0	0	10,921	0	23,158
4	0	8,8106	9,9119	31,498	0	36,784	0	12,996
5	0	0	100	0	0	0	0	0
6	0	100	0	0	0	0	0	0
1	0	100	0	0	0	0	0	0
12	0	100	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	100	0	0
11	9,2363	15,994	9,0764	5,7177	39,984	9,996	9,996	0
7	0	6,7114	11,409	0	0	14,01	62,919	4,9497

Anexo 5 A. Abundancia de géneros según departamento excluyendo departamentos y géneros submuestreados

	Código de Género	Artigas	Canelones	Colonia	Durazno	Maldonado	Paysandu
Botryosphaeria	3	5	3	4	3	2	4
Cadophora	4	0	1	1	1	2	1
Eutypella	6	0	2	0	0	0	0
Fusarium	7	0	2	3	0	2	1
Greeneria	8	3	0	0	0	0	2
Inocutis	9	0	1	1	2	0	3
Phaeoacremonium	10	2	3	5	0	1	3
Phaeomoniella	11	3	10	5	1	3	0
Phomopsis	13	0	1	2	0	0	3
TOTAL	71	13	23	21	7	10	17

Anexo 5 B. Densidad relativa de géneros según departamento excluyendo departamentos y géneros submuestreados

	Código de Género	Artigas	Canelones	Colonia	Durazno	Maldonado	Paysandu
Botryosphaeria	3	0,385	0,130	0,190	0,429	0,200	0,235
Cadophora	4	0,000	0,043	0,048	0,143	0,200	0,059
Eutypella	6	0,000	0,087	0,000	0,000	0,000	0,000
Fusarium	7	0,000	0,087	0,143	0,000	0,200	0,059
Greeneria	8	0,231	0,000	0,000	0,000	0,000	0,118
Inocutis	9	0,000	0,043	0,048	0,286	0,000	0,176
Phaeoacremonium	10	0,154	0,130	0,238	0,000	0,100	0,176
Phaeomoniella	11	0,231	0,435	0,238	0,143	0,300	0,000
Phomopsis	13	0,000	0,043	0,095	0,000	0,000	0,176

Anexo 5 C. Eigenvalue y porcentaje de variación

Eje	Eigenvalue	%del total
1	0,254324	36,717
2	0,194492	28,079
3	0,133732	19,307
4	0,0926089	13,37
5	0,0175021	2,5268

Anexo 5 D. Score

Score	Axis1	Axis2	Axis3	Axis4	Axis5
Artigas	0,39647	-0,71663	-0,46605	-0,087558	0,02192
Canelones	-0,66212	-0,086339	-0,082103	0,52719	-0,058782
Colonia	-0,24869	-0,088631	0,38753	-0,10926	0,24621
Durazno	0,46772	0,76885	-0,3218	0,099456	0,060962
Maldonado	-0,54728	0,19939	-0,080412	-0,49434	-0,12756
Paysandu	0,5923	-0,07694	0,56402	0,065624	-0,14309
3	0,31558	0,068888	-0,24062	-0,055951	0,070296
4	-0,19321	0,63158	-0,076274	-0,42225	-0,24451
6	-1,3129	-0,19577	-0,22451	1,7324	-0,44432
7	-0,67994	0,070263	0,36611	-0,43515	-0,059685
8	0,91747	-1,1345	-0,32206	-0,11753	-0,25602
9	0,70856	0,81344	0,11029	0,3412	0,021077
10	-0,086199	-0,38724	0,34615	-0,036392	0,15527
11	-0,51954	-0,091628	-0,24621	0,11958	0,04792
13	0,32932	-0,1854	1,1544	0,24948	-0,10403

Anexo 5 E. Relay Index

	Artigas	Canelones	Colonia	Durazno	Maldonado	Paysandu
Relay indx	84,545	1	33,628	90,168	10,063	100
6	0	100	0	0	0	0
7	0	17,791	29,243	0	40,9	12,065
11	17,149	32,294	17,669	10,616	22,272	0
4	0	8,7221	9,7363	29,006	40,568	11,968
10	19,298	16,291	29,825	0	12,531	22,055
3	24,538	8,2855	12,11	27,342	12,747	14,978
13	0	13,694	30,255	0	0	56,051
9	0	7,7758	8,6799	51,718	0	31,826
8	66,189	0	0	0	0	33,811

Anexo 6 A. Número de plantas con síntoma externo según cultivar.

Variedad	Petri	Brazo muerto	Esca	Num. Plantas
Sauvignon Blanc	0	19	11	631
Tannat	104	0	0	300
Cabernet Sauvignon	0	20	28	550
Tannat	0	21	3	621
Cabernet Sauvignon	0	53	6	734
Sauvignon Blanc	10	44	2	652
Tannat	12	0	0	664
Tannat	7	24	0	697
Cabernet Sauvignon	0	44	1	652
Marcelan	2	97	0	623
Sauvignon Blanc	1	24	0	370
Tannat	9	0	0	480
Cabernet Sauvignon	39	0	0	564
Tannat	27	0	0	504
Cabernet Sauvignon	14	0	0	540
Merlot	18	0	0	664
Tannat	2	0	0	594
Tannat	19	0	0	486
Cabernet Franc	0	14	3	465
Cabernet Sauvignon	0	30	0	636
Cabernet Sauvignon	32	42		694
Tannat	2	0	0	694
Cabernet Sauvignon	0	52	0	300
Tannat	18	0	0	528
Cabernet Sauvignon	0	59	2	308
Cabernet Sauvignon	0	75	0	320
Cabernet Franc	0	42	0	300
Sauvignon Blanc	0	78	0	162
Cabernet Franc	25	0	0	568
Tannat	11	0	0	497
Tannat	61	0	9	522
Cabernet Sauvignon	0	70	0	440

Anexo 6 B. Frecuencia absoluta de síntomas según cultivares base 100

Datos	Cabernet Franc	Cabernet Sauv	Marcelan	Merlot	Sauv Blanc	Tannat	Total general
Suma de Petri	4,4	14,1	0,3	2,7	1,8	66,6	89,9
Suma de Brazo Muerto	17,0	104,2	15,6	0,0	64,4	6,8	208,0
Suma de Esca	0,6	6,7	0,0	0,0	2,1	2,2	11,6

Anexo 6 C. Frecuencia relativa de síntomas según cultivares

	Código de síntoma	Cabernet Franc	Cabernet Sauv	Marcelan	Merlot	Sauv. Blanc	Tannat
Petri	1	0,049	0,157	0,004	0,030	0,020	0,740
Brazo Muerto	2	0,082	0,501	0,075	0,000	0,310	0,033
Esca	3	0,056	0,578	0,000	0,000	0,177	0,190

Anexo 6 D. Eigenvalue y porcentaje de variación

Eje	Eigenvalue	%de variación
1	0,473186	91,211
2	0,0455974	8,7893

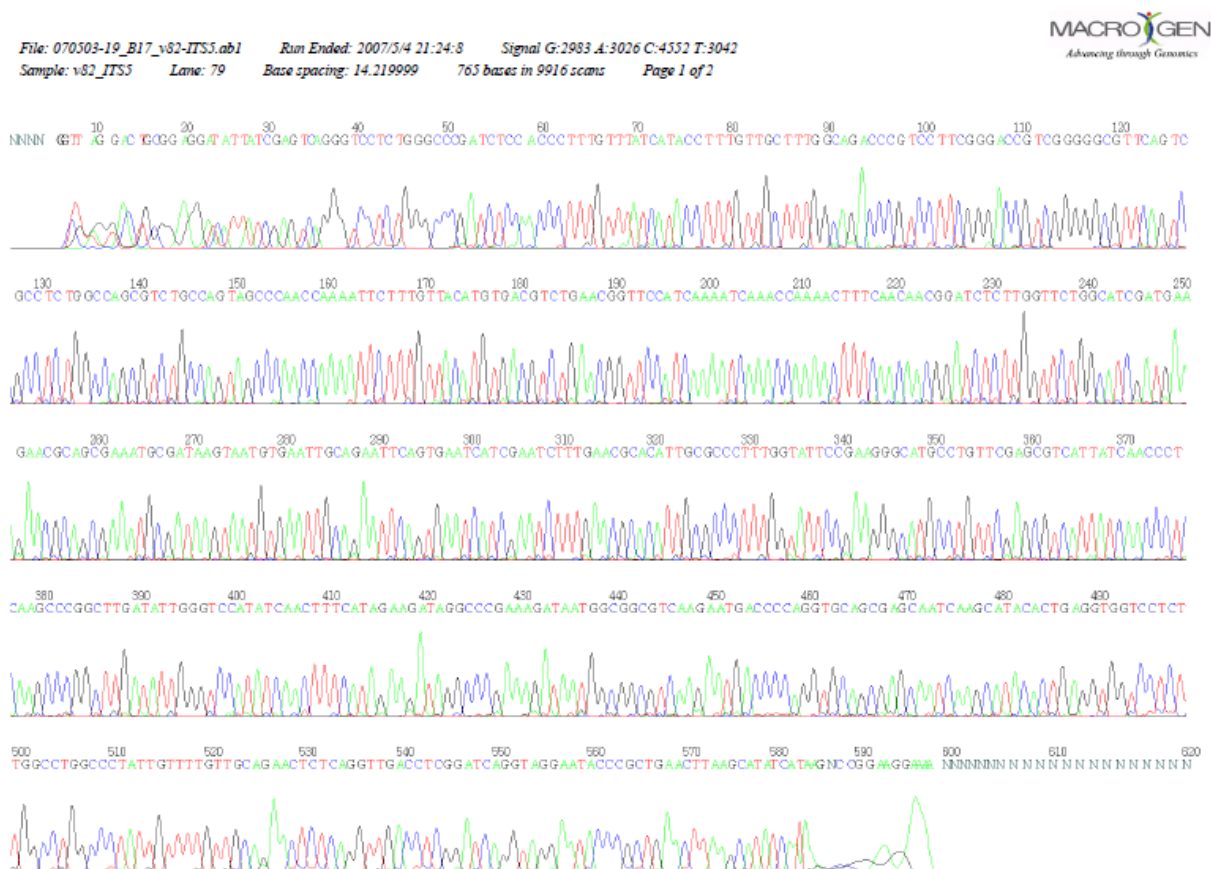
Anexo 6 E. Score

Score		Axis 1	Axis 2
Cabernet_Franc		-0,1871	-0,12932
Cabernet_Sauvignon		-0,40639	0,17849
Marcelan		-0,8596	-0,98579
Merlot		1,374	-0,33788
Sauvignon_Blanc		-0,68174	-0,16315
Tannat		0,94456	-0,02669
1		0,94515	-0,072149
2		-0,67325	-0,21788
3		-0,27095	0,28996

Anexo 6 F. Relay Index

		Relay indx	2	3	1
Cabernet_Franc		30,807	8,1918	5,5944	4,9
Cabernet_Sauvignon		21,088	50,05	57,742	15,7
Marcelan		1	7,4925	0	0,4
Merlot		100	0	0	3
Sauvignon_Blanc		8,8832	30,969	17,682	2
Tannat		80,966	3,2967	18,981	74

Anexo 7 A. Ejemplo de secuencia de *Pa. chlamydospora* aislamiento V82 con cebador ITS5



Anexo 7 B. Blast de secuencia V82 / ITS4

AB278179.1| *Phaeomoniella chlamydospora* gene for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: CBS 239.74

Score = 1051 bits (569), Expect = 0.0, Identities = 580/585 (99%), Gaps = 4/585 (0%)

Strand=Plus/Minus

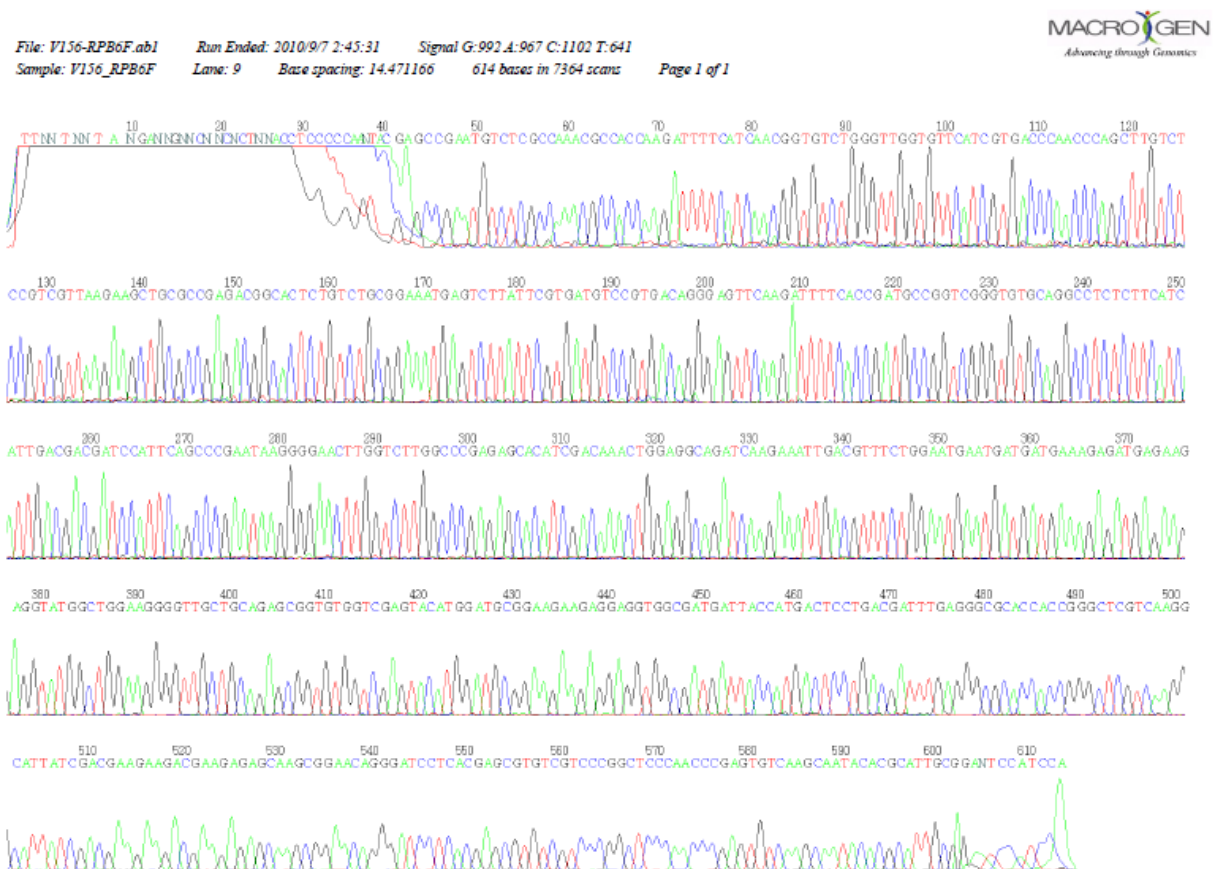
Query	6	TCCT - CCTGAT - CGAGGTC - ACCTGAGAGTTCTGCAACAAAACAATAGGGCCAGGCCAAG	62
Sbjct	1782	TCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAGAGTTCTGCAACAAAACAATAGGGCCAGGCCAAG	1723
Query	63	AGGACCACCTCAGTGTATGCTTGATTGCTCGCTGCACCTGGGGTCATTCTTGACGCCGCC	122
Sbjct	1722	AGGACCACCTCAGTGTATGCTTGATTGCTCGCTGCACCTGGGGTCATTCTTGACGCCGCC	1663
Query	123	ATTATCTTTTCGGGCCTATCTTCTATGAAAGTTGATATGGACCCAATATCAAGCCGGGCTT	182
Sbjct	1662	ATTATCTTTTCGGGCCTATCTTCTATGAAAGTTGATATGGACCCAATATCAAGCCGGGCTT	1603
Query	183	GAGGGTTTGATAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTCGGAATACCAAAGGGCGCAATGTG	242
Sbjct	1602	GAGGGTTTGATAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTCGGAATACCAAAGGGCGCAATGTG	1543
Query	243	CGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCT	302
Sbjct	1542	CGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCT	1483
Query	303	GCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTGGTTTGATTTTG	362

```

Sbjct 1482 |||||
Query 363 ATGGAACCGTTCAGACGTCACATGTAACAAAGAATTTTGGTTGGGCTACTGGCAGACGCT 422
Sbjct 1422 ATGGAACCGTTCAGACGTCACATGTAACAAAGAATTTTGGTTGGGCTACTGGCAGACGCT 1363
Query 423 GGCCAGAGGCGACTGAACGCCCCGACGGTCCCAGAGGACGGGTCTGCCAAAGCAACAAA 482
Sbjct 1362 GGCCAGAGGCGACTGAACGCCCCGACGGTCCCAGAGGACGGGTCTGCCAAAGCAACAAA 1303
Query 483 GGTATGATAACAAAGGGTTGGAGATCGGGCCAGAGGACCCTGACTCGATAATGATCCT 542
Sbjct 1302 GGTATGATAACAAAGGGTTGGAGATCGGGCCAGAGGACCCTGACTCGATAATGATCCT 1243
Query 543 TCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTACGANTTTTAACCTCC 587
Sbjct 1242 TCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTACGACTTTTA-CTTCC 1199

```

Anexo 8 A. Secuencia de *N. parvum* aislamiento V156 con cebador RPB6F



Anexo 8 B. Blast de secuencia V156 / RPB6F

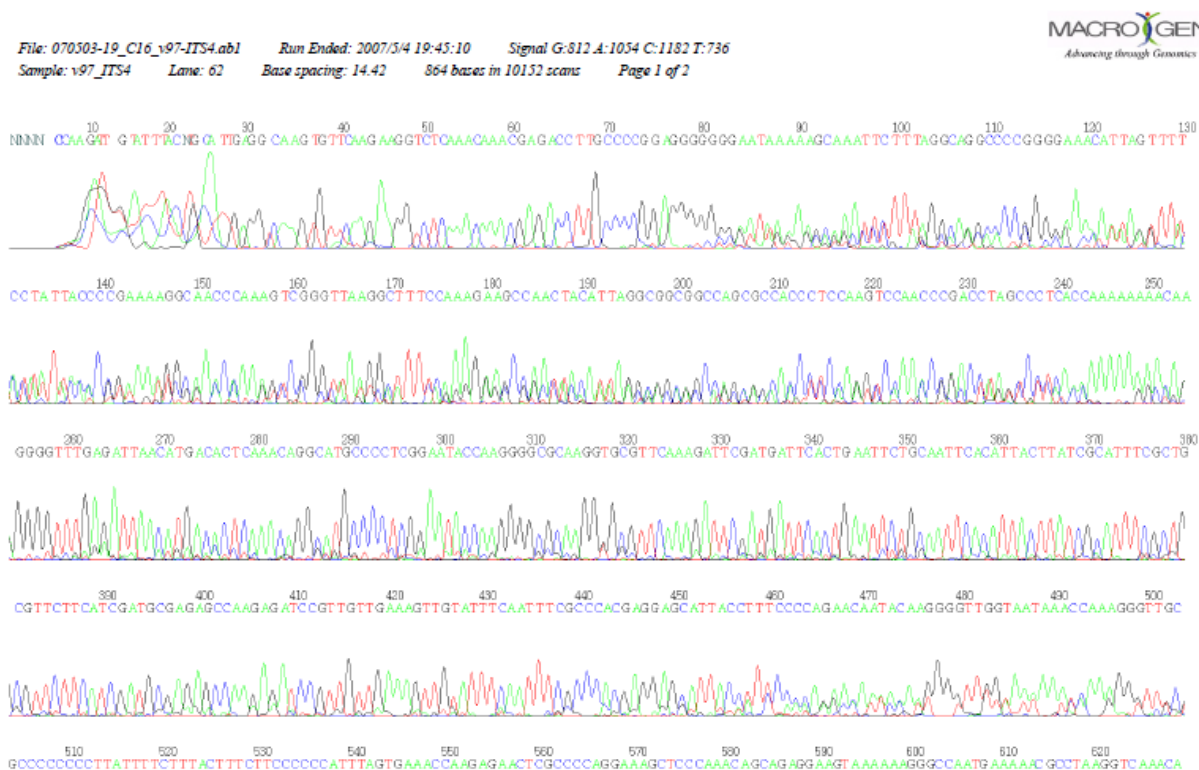
gb|EU863176.1| Neofusicoccum parvum isolate UY37 RNA polymerase II subunit 2
gene, partial cds Length=572
Score = 1046 bits (566), Expect = 0.0 Identities = 571/573 (99%), Gaps = 2/573 (0%) Strand=Plus/Plus

Query	16	AGCCGAATGTCTCGCCAAACGCCACCAAGATTTTCATCAACGGTGTCTGGGTTGGTGTTT	75
Sbjct	1	AGCCGAATGTCTCGCCAAACGCCACCAAGATTTTCATCAACGGTGTCTGGGTTGGTGTTT	60
Query	76	ATCGTGACCCAACCCAGCTTGTCTCCGTCGTTAAGAAGCTGCGCCGAGACGGCACTCTGT	135
Sbjct	61	ATCGTGACCCAACCCAGCTTGTCTCCGTCGTTAAGAAGCTGCGCCGAGACGGCACTCTGT	120
Query	136	CTGCGGAAATGAGTCTTATTCGTGATGTCCGTGACAGGGAGTTCAAGATTTTCACCGATG	195
Sbjct	121	CTGCGGAAATGAGTCTTATTCGTGATGTCCGTGACAGGGAGTTCAAGATTTTCACCGATG	180
Query	196	CCGGTGGGTGTGACAGGCCTCTCTTCATCATTGACGACGATCCATTAGCCCGAATAAGG	255
Sbjct	181	CCGGTGGGTGTGACAGGCCTCTCTTCATCATTGACGACGATCCATTAGCCCGAATAAGG	240
Query	256	GGAACCTTGGTCTTGCCCCGAGAGCACATCGACAACTGGAGGCAGATCAAGAAATTGACG	315
Sbjct	241	GGAACCTTGGTCTTGCCCCGAGAGCACATCGACAACTGGAGGCAGATCAAGAAATTGACG	300
Query	316	TTTCTGGAATGAATGATGATGAAAGAGATGAGAAGAGGTATGGCTGGAAGGGGTTGCTGC	375
Sbjct	301	TTTCTGGAATGAATGATGATGAAAGAGATGAGAAGAGGTATGGCTGGAAGGGGTTGCTGC	360
Query	376	AGAGCGGTGTGGTCGAGTACATGGATGCGGAAGAAGAGGAGGTGGCGATGATTACCATGA	435
Sbjct	361	AGAGCGGTGTGGTCGAGTACATGGATGCGGAAGAAGAGGAGGTGGCGATGATTACCATGA	420
Query	436	CTCCTGACGATTTGAGGGCGCACCACCGGGCTCGTCAAGGCATTATCGACGAAGAAGACG	495
Sbjct	421	CTCCTGACGATTTGAGGGCGCACCACCGGGCTCGTCAAGGCATTATCGACGAAGAAGACG	480
Query	496	AAGAGAGCAAGCGGAACAGGGATCCTCACGAGCGTGTCTGTCCTCCGGCTCCCAACCCGAGTG	555
Sbjct	481	AAGAGAGCAAGCGGAACAGGGATCCTCACGAGCGTGTCTGTCCTCCGGCTCCCAACCCGAGTG	540
Query	556	TCAAGCAATACACGATTGCG - GANTCCATCCA	587
Sbjct	541	TCAAGCAATACACGATTGCGAGA - TCCATCCA	572

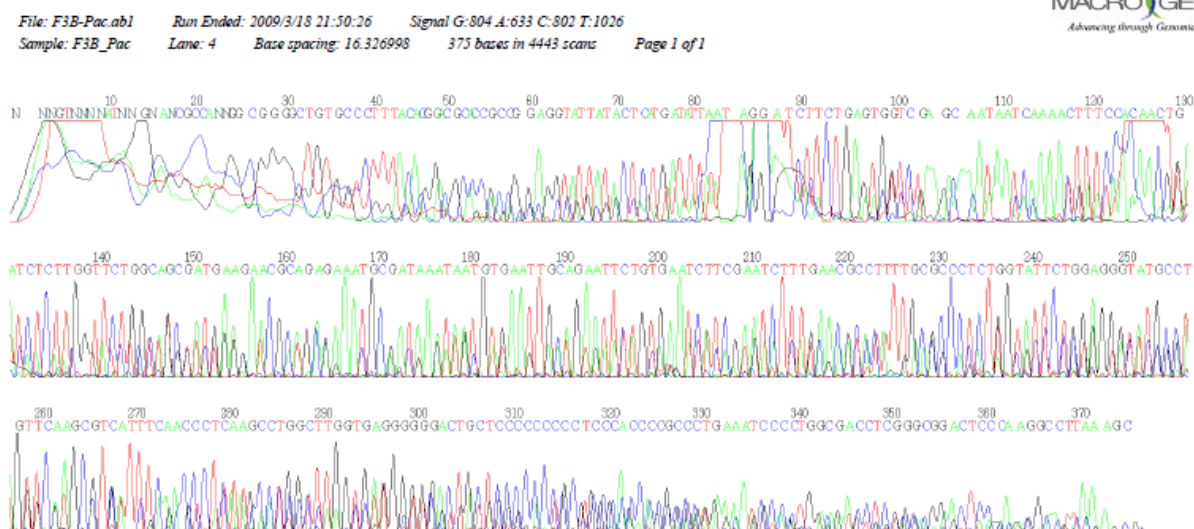
Anexo 9. Secuencia de *Eutypella vitis* aislamiento V8

ggacactctgggaaaannnaactgacacgattccnagnactataaaaattaggggttagtggttagatgccagcgtaacactact
aaagcgagaaggatttttacgcttagggtctccgcgactctgccgntatatntgaggagtatcccgaattgcagggttaagctcca
acgccaagcaataaggcttgatggcgaatgacgctcgaacaggcatgccactagaataactaatgggcgcaatgtcggtcaa
agattcgatgattcactgaattctgaattcacattacttatcgatttcgctgcgtttctcatcgatccagaaccaagagatccgttggt
gaaagttaattattaagttaaactcagaagttcatagaaaaacagagttaattggtccgtcgacgagtattccttacagggtag
ctacagggtagctaccgggtagttccccgccgaggcaacataggttaagttcacatgggttgggagttgtgtaaaaactactcttta
atgatccctccgctggttcaccaacggagaccttggtacgacttttacttccaaa

Anexo 10. Secuencia de *Inocutis jamaicensis* aislamiento V97 con cebador ITS4





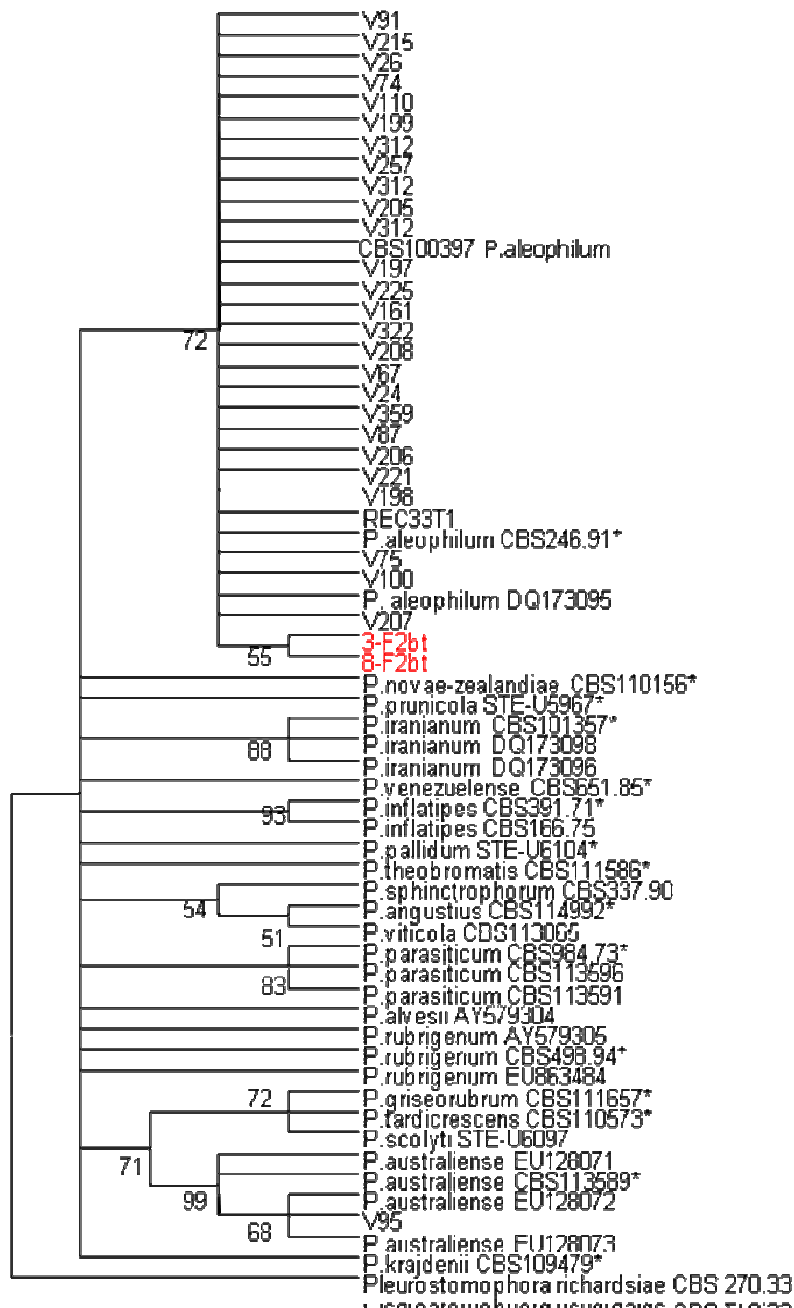


F3B_Pac > [gb|GQ250215.1](#) Phomopsis viticola isolate 115 18S ribosomal RNA gene, partial

sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene; and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=547, Score = 309 bits (167), Expect = 8e-81, Identities = 221/247 (89%), Gaps = 3/247 (1%), Strand=Plus/Plus

Query	90	AAT - AATCAAAACTTTCCACAAC TGATCTCTTG GTTCTGGCAGCGATGAAGAACGCAGAG	148
Sbjct	180	AATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG	239
Query	149	AAATGCGATAAATAATGTGAATTGCAGAATTCTGTGAATCTTCGAATCTTTGAACGC-CT	207
Sbjct	240	AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC-	298
Query	208	TTTGCGCCCTCTGGTATTCTGGAGGGTATGCCTGTTCAAGCGTCATTTCAACCCTCAAGC	267
Sbjct	299	ATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGC	358
Query	268	CTGGCTTGGTGAGGGGGGACTGCTcccccccccTCCCACCCGCCCTGAAATCCCCTGGC	327
Sbjct	359	CTGGCTTGGTGATGGGGCACTGCTCCCCCCCCGGGGAGCAGGCCCTGAAATCCAGTGGC	418
Query	328	GACCTCG 334	
Sbjct	419	GAGCTCG 425	

Anexo 13. Árbol filogenético en base a secuencias de productos de PCR obtenidos con cebadores F2Bt/R1Bt a partir de ADN total de sarmientos sanos



Anexo 14 A. Efecto de inoculación de *Botryosphaeria* spp. en sarmientos en laboratorio

	Presencia de necrosis	Largo de necrosis cm	Núm. reaslamientos
N. parvum V2	1	11	3
N. parvum V2	1	4	1
N. parvum V2	1	8	3
N. parvum V2	1	8.5	3
N. parvum V2	1	10	3
N. parvum V2	1	6	3
N. parvum V2	1	9.5	3
F. aesculi V 52	1	4	2
F. aesculi V 52	0	0	3
F. aesculi V 52	0	0	1
F. aesculi V 52	1	3	1
F. aesculi V 52	1	10	1
F. aesculi V 52	0	0	0
F. aesculi V 52	1	8	0
N. parvum V 125	1	8	3
N. parvum V 125	1	6	3
N. parvum V 125	1	10	3
N. parvum V 125	1	12	3
N. parvum V 125	1	8	3
N. parvum V 125	1	6.5	3
N. parvum V 125	1	9	3
N. parvum V156	1	10	3
N. parvum V156	1	10.5	2
N. parvum V156	1	9.5	2
N. parvum V156	1	7.5	2
N. parvum V156	1	9	2
N. parvum V156	1	10	2
N. parvum V156	1	8	3
N. parvum V 339	1	9.5	3
N. parvum V 339	1	8	2
N. parvum V 339	1	6	2
N. parvum V 339	1	6	3
N. parvum V 339	1	6.5	3
N. parvum V 339	1	7.5	3
N. parvum V 339	1	9.5	3
N. luteum V 479	1	10	3
N. luteum V 479	1	9.5	3
N. luteum V 479	1	11	3
N. luteum V 479	1	9	3
N. luteum V 479	0	0	1
N. luteum V 479	1	5.5	3
N. luteum V 479	0	0	0
D. seriata V 117	0	0	0
D. seriata V 117	1	4	0
D. seriata V 117	0	0	0
D. seriata V 117	1	4	2
D. seriata V 117	1	1.5	1
D. seriata V 117	0	0	1
D. seriata V 117	0	0	0
F. aesculi V 122	1	5.5	1
F. aesculi V 122	1	3	1
F. aesculi V 122	0	0	0
F. aesculi V 122	1	1.5	3
F. aesculi V 122	1	3	1
F. aesculi V 122	1	4.5	3
F. aesculi V 122	1	5	3
Control	1	9	3
Control	0	0	0
Control	0	0	0
Control	0	0	0
Control	0	0	0
Control	0	0	2
Control	0	0	0

Anexo 14 B. Efecto del tratamiento sobre el número de sarmientos con necrosis. Fisher

Exact test

	F. aesculi V 52	N. parvum V 125	N. parvum V156	N. parvum V 339	N. luteum V 479	D. seriata V 117	F. aesculi V 122	Control
N. parvum V2	P = 0.096	P = 1.000	P = 1.000	P = 1.000	P = 0.231	P = 0.035	P = 0.500	P = 0.002
F. aesculi V 52		P = 0.096	P = 0.096	P = 0.096	P=0.367	P=0.500	P=0.245	P=0.133
N. parvum V 125			P = 1.000	P = 1.000	P = 0.231	P = 0.035	P = 0.500	P = 0.002
N. parvum V156				P = 1.000	P = 0.231	P = 0.035	P = 0.500	P = 0.002
N. parvum V 339					P = 0.231	P = 0.035	P = 0.500	P = 0.002
N. luteum V 479						P=0.296	P=0.404	P=0.051
D. seriata V 117							P=0.122	P=0.280
F. aesculi V 122								P=0.015

Anexo 14 C. Efecto del tratamiento sobre el largo de la necrosis. Kolmogorov Smirnov

	F. aesculi V 52	N. parvum V 125	N. parvum V156	N. parvum V 339	N. luteum V 479	D. seriata V 117	F. aesculi V 122	Control
N. parvum V2	D=0.57 P=0.012	D=0.14 P=0.99	D=0.28 P=0.54	D=0.28 P=0.54	D=0.28 P=0.54	D: 0.85 P=0.00	D: 0.85 P=0.00	D: 0.85 P=0.00
F. aesculi V 52		D=0.71 P=0.001	D=0.71 P=0.001	D=0.71 P=0.001	D=0.42 P=0.11	D=0.28 P=0.54	D=0.28 P=0.54	D=0.42 P=0.11
N. parvum V 125			D=0.28 P=0.54	D=0.28 P=0.54	D=0.42 P=0.11	D=1.00 P=0.00	D=1.00 P=0.00	D=0.85 P=0.00
N. parvum V156				D=0.42 P=0.11	D=0.42 P=0.11	D=1.00 P=0.00	D=1.00 P=0.00	D=0.85 P=0.00
N. parvum V 339					D=0.42 P=0.11	D=1.00 P=0.00	D=1.00 P=0.00	D=0.85 P=0.00
N. luteum V 479						D=0.71 P=0.001	D=0.57 P=0.012	D=0.57 P=0.012
D. seriata V 117							D=0.42 P=0.11	D=0.28 P=0.54
F. aesculi V 122								D=0.71 P=0.001

Anexo 14 D. Efecto del tratamiento sobre el número de sarmientos con reaslamiento.

Fisher Exact test

	F. aesculi V 52	N. parvum V 125	N. parvum V156	N. parvum V 339	N. luteum V 479	D. seriata V 117	F. aesculi V 122	Control
N. parvum V2	P=0.231	P=1	P=1	P=1	P=0.500	P=0.035	P=0.500	P=0.010
F. aesculi V 52		P=0.231	P=0.231	P=0.231	P=0.404	P=0.296	P=0.404	P=0.143
N. parvum V 125			P=1	P=1	P=0.500	P=0.035	P=0.500	P=0.010
N. parvum V156				P=1	P=0.500	P=0.035	P=0.500	P=0.010
N. parvum V 339					P=0.500	P=0.035	P=0.500	P=0.010
N. luteum V 479						P=0.133	P=0.538	P=0.051
D. seriata V 117							P=0.122	P=0.500
F. aesculi V 122								P=0.051

Anexo 15 A. Efecto de la inoculación de *Botryosphaeria* spp. en sarmientos en campo

	Presencia de necrosis	Largo de necrosis mm	Núm. reaslamientos
N. parvum V2	1	35	1
N. parvum V2	0	0	0
N. parvum V2	0	0	1
N. parvum V2	0	0	1
N. parvum V2	0	0	0
N. parvum V2	0	0	0
N. parvum V2	0	0	0
F. aesculi V 52	0	0	1
F. aesculi V 52	0	0	1
F. aesculi V 52	0	0	1
F. aesculi V 52	0	0	1
F. aesculi V 52	0	0	1
F. aesculi V 52	0	0	1
N. parvum V 125	0	0	1
N. parvum V 125	1	5	1
N. parvum V 125	0	0	1
N. parvum V 125	0	0	1
N. parvum V 125	0	0	1
N. parvum V 125	0	0	1
N. parvum V 125	0	0	1
N. parvum V156	1	30	1
N. parvum V156	0	0	1
N. parvum V156	0	0	0
N. parvum V156	0	0	1
N. parvum V156	0	0	0
N. parvum V156	0	0	1
N. parvum V156	0	0	1
N. parvum V 339	0	0	1
N. parvum V 339	0	0	1
N. parvum V 339	0	0	1
N. parvum V 339	0	0	1
N. parvum V 339	0	0	0
N. parvum V 339	0	0	1
N. luteum V 479	0	0	1
N. luteum V 479	0	0	1
N. luteum V 479	0	0	0
N. luteum V 479	0	0	1
N. luteum V 479	0	0	0
N. luteum V 479	0	0	1
N. luteum V 479	0	0	1
D. seriata V 117	0	0	1
D. seriata V 117	0	0	1
D. seriata V 117	0	0	1
D. seriata V 117	0	0	1
D. seriata V 117	0	0	1
D. seriata V 117	0	0	1
F. aesculi V 122	0	0	0
F. aesculi V 122	0	0	1
F. aesculi V 122	0	0	1
F. aesculi V 122	0	0	1
F. aesculi V 122	1	10	1
F. aesculi V 122	0	0	1
F. aesculi V 122	0	0	1
Control	0	0	1
Control	0	0	1
Control	0	0	1
Control	0	0	1
Control	0	0	0
Control	0	0	1
Control	0	0	1

Anexo 15 B. Efecto del tratamiento sobre el número de sarmientos con cancro. Fischer

Exact test

	F. aesculi V 52	N. parvum V 125	N. parvum V156	N. parvum V 339	N. luteum V 479	D. seriata V 117	F. aesculi V 122	Control
N. parvum V2	P=0.500	P= 0.538	P= 0.538	P=0.500	P= 0.500	P=0.500	P= 0.538	P=0.500
F. aesculi V 52		P=0.500	P=0.500	P=1	P=1	P=1	P=0.500	P=1
N. parvum V 125			P= 0.538	P=0.500	P=0.500	P=0.500	P= 0.538	P=0.500
N. parvum V156				P=0.500	P=0.500	P=0.500	P= 0.538	P=0.500
N. parvum V 339					P=1	P=1	P=0.500	P=1
N. luteum V 479						P=1	P=0.500	P=1
D. seriata V 117							P=0.500	P=1
F. aesculi V 122								P=0.500

Anexo 15 C. Efecto del tratamiento sobre el largo de la necrosis. Kolmogorov-Smirnov

test.

	F. aesculi V 52	N. parvum V 125	N. parvum V156	N. parvum V 339	N. luteum V 479	D. seriata V 117	F. aesculi V 122	Control
N. parvum V2	P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99
F. aesculi V 52		P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99
N. parvum V 125			P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99
N. parvum V156				P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99
N. parvum V 339					P>0.99	P>0.99	P>0.99	P>0.99
N. luteum V 479						P>0.99	P>0.99	P>0.99
D. seriata V 117							P>0.99	P>0.99
F. aesculi V 122								P>0.99

Anexo 15 D. Efecto del tratamiento sobre el número de sarmientos con reaslamientos.

Fischer Exact test

	F. aesculi V 52	N. parvum V 125	N. parvum V156	N. parvum V 339	N. luteum V 479	D. seriata V 117	F. aesculi V 122	Control
N. parvum V2	P=0.035	P=0.035	P=0.245	P=0.122	P=0.245	P=0.035	P=0.122	P=0.122
F. aesculi V 52		P=1	P=0.231	P=0.500	P=0.231	P=1	P=0.500	P=0.500
N. parvum V 125			P=0.231	P=0.500	P=0.231	P=1	P=0.500	P=0.500
N. parvum V156				P=0.404	P=0.441	P=0.231	P=0.404	P=0.404
N. parvum V 339					P=0.500	P=0.500	P=0.538	P=0.538
N. luteum V 479						P=0.231	P=0.404	P=0.404
D. seriata V 117							P=0.500	P=0.500
F. aesculi V 122								P=0.538

Anexo 16 A. Presencia, largo de necrosis, y número de reislamientos por planta inoculada con dos cepas de *G. uvicola*

	Presencia de necrosis	Largo necrosis (mm)	Núm. reislamientos
120 T1	0	0	0
120 T2	1	15	0
120 T3	0	0	0
120 T4	0	0	0
120 T5	1	20	0
443 T6	1	10	0
443 T7	0	0	0
443 T8	1	20	0
443 T9	1	13	1
443 T10	1	14	1
control T11	0	0	0
control T12	0	0	0
control T13	0	0	0
control T14	0	0	0
control T15	0	0	0
120 CS1	1	7	1
120 CS2	1	24	4
120 CS3	1	16	2
120 CS4	1	10	0
120 CS5	0	0	0
443 CS6	1	11	4
443 CS7	1	17	0
443 CS8	0	0	0
443 CS9	1	12	0
443 CS10	0	0	0
control CS11	0	0	0
control CS12	0	0	0
control CS13	0	0	0
control CS14	0	0	0
control CS15	0	0	0
120 3309 1	1	12	0
120 3309 2	0	0	0
120 3309 3	1	130	1
120 3309 4	1	24	2
120 3309 5	1	32	2
443 3309 6	1	30	1
443 3309 7	1	68	0
443 3309 8	0	0	0
443 3309 9	1	40	0
443 3309 10	1	11	0
control 3309 11	0	0	0
control 3309 12	0	0	0
control 3309 13	0	0	0
control 3309 14	0	0	0
control 3309 15	0	0	0
120 SO4 1	1	29	1
120 SO4 2	1	20	0
120 SO4 3	1	95	0
120 SO4 4	0	0	0
120 SO4 5	0	0	0
443 SO4 6	1	30	3
443 SO4 7	1	26	6
443 SO4 8	1	20	0
443 SO4 9	1	30	0
443 SO4 10	1	16	0
control SO4 11	0	0	0
control SO4 12	0	0	0
control SO4 13	1	12	0
control SO4 14	0	0	0
control SO4 15	0	0	0

Anexo 16 B. Número de plantas con y sin necrosis inoculadas con cepas de *G. uvicola*

	Num. plantas c/ necrosis	Num. Plantas s/ necrosis
120 Tannat	2	3
443 Tannat	4	1
Control Tannat	0	5
120 CS	4	1
443 CS	3	2
control CS	0	5
120 3309	4	1
443 3309	4	1
control 3309	0	5
120 SO4	3	2
443 SO4	5	0
control SO4	1	4

Anexo 16 C. Efecto del tratamiento sobre el número de plantas con necrosis. Fischer Exact test

	120 Tannat	443 Tannat	Control Tannat	443 CS	control CS	443 3309	control 3309	443 SO4	control SO4
120 Tannat		$p = 0.238$	$p = 0.222$						
443 Tannat			$p = 0.024$						
120 CS				$p = 0.500$	$p = 0.024$				
443 CS					$p = 0.083$				
120 3309						$p = 0.556$	$p = 0.024$		
443 3309							$p = 0.024$		
120 SO4								$p = 0.222$	$p = 0.262$
443 SO4									$p = 0.024$

Anexo 16 D. Efecto del tratamiento sobre el largo de la necrosis. Kolmogorov Smirnov

	G.u 120/ T	G.u 443/ T	Tannat control	G.u 443/ CS	CSControl	G. u 443/ SO4	SO4Control	G. u 443/ 3309	3309 Control
G.u 120/ T		D=0,4 P=0,313	D=0,4 P=0,313						
G.u 443/ T			D=0,8 P=0,001						
G.u 120/ CS				D=0,2 P=0,975	D=0,8 P=0,001				
G.u 443/ CS					D=0,8 P=0,001				
G. u 120/ SO4						D=0,4 P=0,313	D=0,6 P=0,031		
G. u 443/ SO4							D=1 P=0		
G. u 120/ 3309								D=0,2 P=0,975	D=0,8 P=0,001
G. u 443/ 3309									D=0,8 P=0,001

Anexo 16 E. Número de plantas con y sin reaislamiento del hongo inoculado

	Num. plantas c/ reaislamiento	Num. Plantas s/ reaislamiento
120 Tannat	0	5
443 Tannat	2	3
Control Tannat	0	5
120 CS	3	2
443 CS	1	4
control CS	0	5
120 3309	3	2
443 3309	1	4
control 3309	0	5
120 SO4	1	4
443 SO4	2	3
control SO4	0	5

Anexo 16 F. Efecto del tratamiento sobre el número de plantas con reaislamiento. Fischer

Exact test

	120 Tannat	443 Tannat	Control Tannat	443 CS	control CS	443 3309	control 3309	443 SO4	control SO4
120 Tannat		P = 0.222	P=1.000						
443 Tannat			P = 0.222						
120 CS				P=0.262	P = 0.083				
443 CS					P = 0.500				
120 3309						P=0.238	P = 0.083		
443 3309							P = 0.500		
120 SO4								P=0.417	P = 0.500
443 SO4									P=0.222

Anexo 17 A. Plantines inoculados con *C. luteo-olivacea*

	Presencia de necrosis	Largo de necrosis mm	Número de reaslamientos
T1	0	0	0
T2	0	0	0
T3	0	0	0
T4	0	0	0
T5	0	0	0
control T6	0	0	0
control t 7	0	0	0
control T8	0	0	0
control T9	0	0	0
control T10	0	0	0
CS1	0	0	0
CS2	0	0	0
CS3	1	12	0
CS4	0	0	0
CS5	0	0	0
control CS6	0	0	0
control CS7	0	0	0
control CS8	0	0	0
control CS9	0	0	0
control CS10	0	0	0
3309 1	0	0	0
3309 2	1	75	0
3309 3	0	0	0
3309 4	0	0	0
3309 5	0	0	0
control 3309 6	0	0	0
control 3309 7	1	40	0
control 3309 8	0	0	0
control 3309 9	1	23	0
control 3309 10	0	0	0
SO4 1	0	0	0
SO4 2	0	0	0
SO4 3	0	0	0
SO4 4	0	0	0
SO4 5	0	0	0
control SO4 6	0	0	0
control SO4 7	0	0	0
control SO4 8	0	0	0
control SO4 9	0	0	0
control SO4 10	0	0	0

Anexo 17 B. Efecto del tratamiento sobre el número de plantas con necrosis

	Control T	Control CS	control 3309	control SO4
T	P=1			
CS		P=0.500		
3309			P=0.417	
SO4				P=1

Anexo 17 C. Efecto del tratamiento sobre el largo de la necrosis

	Control T	Control CS	control 3309	control SO4
T	D=0 P=1			
CS		D=0.200 P=0.975		
3309			D=0.200 P=0.975	
SO4				D=0 P=1